



**Méthodes alternatives d'analyse pour l'agroalimentaire
Performances analytiques certifiées**

**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE
SUIVANT LA NORME NF EN ISO 16140 : 2003**

N° attestation : GEN – 25/06 – 11/08

**Date de validation : 28.11.2008
Dates d'extension : 27.01.2009
04.02.2010
Fin de validité : 28.11.2012**

La Société
(siège social, distributeur et site de production)

Pall GeneSystems
Centre d'affaires CICEA
1, rue du Courtil
F-35170 BRUZ

est autorisée à faire référence à la marque **AFNOR VALIDATION** pour la méthode alternative qualitative d'analyse ci-dessous :

GeneDisc *E.coli* O157:H7

Référence des protocoles :

Nom du produit	Référence SAP	Nouvelle version de la notice (SAP)	Ancienne version de la notice
Extraction Pack FOOD 1	PFOOD1100	PEFOOD_Salmo_01.FR	PEFOOD01/100_Slm.FR
GeneDisc Pathogenic <i>E.coli</i> O157 & <i>Salmonella</i> spp 06	GECOSLM206006	GECOSLM_01.FR	GDSTEC02_03.FR
GeneDisc Pathogenic <i>E.coli</i> O157 & <i>Salmonella</i> spp 06	GECOSLM 212006		
GeneDisc Pathogenic <i>E.coli</i> O157 06	GECO157106006	GECO157_01.FR	GDSTEC04_03.FR
GeneDisc Pathogenic <i>E.coli</i> O157 12	GECO157112006		
GeneDisc EHEC5 ID 06	GEHECID106006	GEHECID_01.BL	GDEHEC01_03.BL

DOMAINE D'APPLICATION : Viandes crues de bœuf (dont surgelées, assaisonnées), produits laitiers et produits végétaux.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 16654 (2001) – Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00
certification@afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test de recherche GeneDisc *Escherichia coli* O157 :H7 est un système automatisé et miniaturisé qui permet la détection de *Escherichia coli* O157 :H7 par amplification génique par PCR en temps réel. Des sondes TaqMan[®] marquées par un fluorophore permettent de détecter les séquences nucléiques spécifiques du genre. Le signal est ensuite mesuré optiquement par les GeneDisc Cyclus 6 ou 12 secteurs d'analyse.

La méthode est basée sur l'utilisation :

- d'un pack d'extraction d'ADN bactérien (Extraction Pack FOOD 1), basée sur une lyse des cellules par traitement thermique ;
- des kits de détection par PCR en temps réel suivants :
 - GeneDisc Pathogenic *E.coli* O157 & *Salmonella* spp 06 et 12
 - GeneDisc Pathogenic *E.coli* O157 06 et 12
 - GeneDisc EHEC5 ID, pour la détection des *E.coli* O157 :H7, dans le cas de résultats positifs pour *E.coli* O157 obtenus avec l'un des kits précédents.

La méthode GeneDisc *Escherichia coli* O157 :H7 est certifiée AFNOR Validation pour l'analyse des produits suivants : (i) viandes crues de bœuf (protocole « Viande crue de bœuf » et protocole « Autres catégories alimentaires ») ; (ii) produits laitiers (protocole « produits laitiers ») ; (iii) produits végétaux (protocole « Autres catégories alimentaires »).

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés à partir de l'Eau Peptonée Tamponnée (\pm acriflavine) :

- Selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) ;
- Par isolement direct de 10 μ l sur gélose CT-SMAC, suivi d'un test latex O157 et H7 sur colonie après isolement sur gélose nutritive.
- Par isolement sur gélose CT-SMAC, après réalisation d'une IMS sur 0,5 ml de bouillon d'enrichissement, suivi d'un test latex O157 et H7 sur colonies après isolement sur gélose nutritive ;

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

Historique de validation

1/ En janvier 2009, la validation a été étendue à deux nouvelles versions de GeneDisc, comportant 12 secteurs d'analyse, permettant de réaliser les analyses en simplex (1 puits PCR par cible PCR) :

- GeneDisc pathogenic *E.coli* O157 & *Salmonella* spp (GDSTEC02-12)
- GeneDisc *E.coli* O157 & *Salmonella* spp (GDSTEC03-12)

Des performances comparables ont été obtenues avec ces nouveaux GeneDisc, par rapport aux versions GDSTEC02-06 et GDSTEC03-06 (analyses en duplicate). Les résultats ne sont pas détaillés dans la présente attestation.

2/ En février 2010, des essais complémentaires tierce-partie ont permis d'étendre le champ d'application AFNOR VALIDATION de la méthode GeneDisc *E.coli* O157 :H7 à l'analyse des produits végétaux (mise en oeuvre du protocole « Autres catégories alimentaires »). Les paramètres suivants ont été testés : exactitude/spécificité/sensibilité relative. Les résultats de cette étude sont repris dans cette attestation.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative

Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Etude de 2008 :

Des essais ont été effectués en 2008 sur 213 échantillons de produits dont 10 naturellement contaminés, 99 artificiellement contaminés et 104 non contaminés, appartenant aux catégories suivantes : Viandes crues de bœuf (surgelées, assaisonnées) et produits laitiers (laits crus, fromages au lait cru, crèmes, laits fermentés, ...).

Pour cette étude, les GeneDisc GDSTEC02-06, GDSTEC03-06, associés au GDEHEC01-06 ont été testés pour chacun des protocoles spécifiques. Les protocoles spécifiques de confirmation ont été mis en œuvre.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**.

Tableau de résultats – Analyse des « viandes crues de bœuf »
avec le protocole spécifique (incubation 10h±2h)
(Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

GeneDisc	GDSTEC02-06 / GDEHEC01-06		GDSTEC03-06 / GDEHEC01-06	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA = 32 ⁽¹⁾	PD = 6 ⁽¹⁾	PA = 32 ⁽¹⁾	PD = 5 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	ND = 5 ⁽²⁾	NA = 32 ⁽³⁾	ND = 5 ⁽²⁾	NA = 33 ⁽³⁾

PA : Accord positif A+/R+ ; PD : Déviation positive A+/R-
ND : Déviation négative A-/R+ ; NA : Accord négatif A-/R-

- (1) il s'agit de positifs confirmés
(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation
(3) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

Tableau de résultats – Analyse des « viandes crues de bœuf »
avec le protocole « Autres catégories alimentaires » (incubation 18h±2h)
(Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

GeneDisc	GDSTEC02-06 / GDEHEC01-06		GDSTEC03-06 / GDEHEC01-06	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA = 19 ⁽¹⁾	PD = 10 ⁽¹⁾	PA = 20 ⁽¹⁾	PD = 11 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	ND = 6 ⁽²⁾	NA = 33 ⁽³⁾	ND = 5 ⁽²⁾	NA = 32 ⁽³⁾

PA : Accord positif A+/R+ ; PD : Déviation positive A+/R-
ND : Déviation négative A-/R+ ; NA : Accord négatif A-/R-

- (1) il s'agit de positifs confirmés
(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation
(3) dont 5 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation
(3') dont 6 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

**Tableau de résultats – Analyse des « produits laitiers »
avec le protocole spécifique (incubation 18h±2h)
(Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)**

GeneDisc	GDSTEC02-06 / GDEHEC01-06		GDSTEC03-06 / GDEHEC01-06	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA = 18 ⁽¹⁾	PD = 9 ⁽¹⁾	PA = 19 ⁽¹⁾	PD = 10 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	ND = 4 ⁽²⁾	NA = 39 ⁽³⁾	ND = 3 ⁽²⁾	NA = 38 ⁽³⁾

PA : Accord positif A+/R+ ; *PD* : Déviation positive A+/R-
ND : Déviation négative A-/R+ ; *NA* : Accord négatif A-/R-

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont 3 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Les pourcentages obtenus, par rapport à la méthode de référence, sont les suivants :

GeneDisc	Exactitude relative AC (%)		Spécificité relative SP (%)		Sensibilité relative SE (%)	
	STEC02-06	STEC03-06	STEC02-06	STEC03-06	STEC02-06	STEC03-06
Protocole spécifique viandes crues de bœuf (10h±2h)	85,3	86,7	84,2	86,8	86,5	86,5
Protocole « toutes catégories alimentaires » (18h±2h) - Viandes crues de bœuf	76,5	76,5	76,7	74,4	76	80
Protocole spécifique produits laitiers (18h±2h)	81,4	81,4	81,3	79,2	81,8	86,4

Note : une **spécificité relative** inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs.

La **sensibilité** a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

GeneDisc	Méthode alternative (PA + PD) / (PA + PD + ND) =		Méthode de référence (PA + ND) / (PA + PD + ND) =	
	STEC02-06	STEC03-06	STEC02-06	STEC03-06
Protocole spécifique viandes crues de bœuf (10h±2h)	88,4%	88,1%	86%	88,1%
Protocole « toutes catégories alimentaires » (18h±2h) : Analyse des viandes crues de bœuf	82,9%	86,1%	71,4%	69,4%
Protocole spécifique produits laitiers (18h±2h)	87,1%	90,6%	71%	68,8%

Analyse des discordants (selon l'annexe F de la norme EN ISO 16140) :

Résultats pour le protocole spécifique « Viandes crues de bœuf » (10h±2h)

GD STEC02-06	PD=6 et ND=5 ; y = PD + ND ; y = 11 : 6 ≤ y ≤ 22 ; m = 5 et M = 1 ; m > M
GD STEC03-06	PD=5 et ND=5 ; y = PD + ND ; y = 10 : 6 ≤ y ≤ 22 ; m = 5 et M = 1 ; m > M

Résultats pour le protocole « toutes catégories alimentaires » (18h±2h) – Viandes crues de bœuf

GD STEC02-06	PD=10 et ND=6 ; y = PD+ ND ; y = 16 : 6 ≤ Y ≤ 22 ; m = 6 et M = 3 ; m > M
GD STEC03-06	PD=11 et ND=5 ; y = PD+ ND ; y = 16 : 6 ≤ Y ≤ 22 ; m = 5 et M = 3 ; m > M

Résultats pour le protocole spécifique « Produits laitiers » (18h±2h)

GD STEC02-06	PD=9 et ND=4 ; y = PD+ ND ; y = 13 : 6 ≤ Y ≤ 22 ; m = 4 et M = 2 ; m > M
GD STEC03-06	PD=10 et ND=3 ; y = PD+ ND ; y = 13 : 6 ≤ Y ≤ 22 ; m = 3 ; M = 2 ; m > M

Conclusion : Pour tous les trois protocoles (quels que soient le test de confirmation utilisé), les méthodes ne sont pas différentes à $\alpha < 0,05$.

Etude de 2010 :

Des essais complémentaires ont été réalisés en 2010 sur 65 échantillons de produits dont aucun naturellement contaminés, 34 artificiellement contaminés et 31 non contaminés, appartenant à la catégorie « produits végétaux ».

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par la méthode de référence et par la méthode alternative (mise en œuvre du protocole « toutes catégories alimentaires » en 18h±2h d'incubation).

**Tableau de résultats – Analyse des « produits végétaux »
avec le protocole « toutes catégories alimentaires » (incubation 18h±2h)
(Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)**

GeneDisc	GDSTEC02-12 / GDEHEC01-06	
Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 22 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 10 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 2 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 31 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

Les pourcentages obtenus, par rapport à la méthode de référence, sont les suivants :

Résultats pour le protocole « toutes catégories alimentaires » (18h±2h) – Végétaux

GeneDisc	STEC02-06 et STEC03-06
Exactitude relative (AC)	81,5%
Spécificité relative (SP)	75,6%
Sensibilité relative (SE)	91,7%

Note : une **spécificité relative** inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs.

La **sensibilité** a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Résultats pour le protocole « toutes catégories alimentaires » (18h±2h) – Végétaux

Méthode alternative : $(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 94,1\%$ Méthode de référence : $(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 70,6\%$

Analyse des discordants (selon l'annexe F de la norme EN ISO 16140) :

Résultats pour le protocole « toutes catégories alimentaires » (18h±2h) – Végétaux

	Isolement direct sur CT SMAC	IMS – CT SMAC
Y = PD + ND	Y = 5 + 9 = 14	Y = 2 + 10 = 12
m	5	2
M	2	2
Conclusion :	m > M : les méthodes ne sont pas différentes à $\alpha < 0,05$	m ≥ M : les méthodes sont différentes à $\alpha < 0,05$

Conclusion : Dans le cas d'une confirmation par IMS suivie d'un isolement sur CT SMAC, le test statistique montre que les deux méthodes sont différentes mais ceci en faveur de la méthode alternative pour laquelle dix déviations positives sont observées.

NIVEAU DE DETECTION relatif

Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2008 (validation initiale), puis en 2010 (extension), sur au total les 4 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : viandes crues de bœuf, produits laitiers et produits végétaux.

Le produit a été analysé **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants (pour GDSTEC02-06 et GDSTEC03-06, combinés au GDEHEC01-06) :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Steack haché	<i>E.coli</i> O157 :H7 Ad 485	0,3 [0,1 – 1,2]	0,1 [0,1 – 0,4]
Steack haché	<i>E.coli</i> O157 :H7 Ad 485	0,4 [0,1 – 1,3]	0,2 [0,1 – 0,9]
Lait cru	<i>E.coli</i> O157 :H7 R33-9	0,5 [0,1 – 1,7]	1,0 [0,4 – 2,8]
Epinard haché surgelé	<i>E.coli</i> O157 :H7 Ad 557	0,3 [0,1 – 1,1]	0,2 [0,1 – 0,9]

(3) LOD₅₀ : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas

"Hitchins A. Proposed Used of a 50% Limit of detection Value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of presence-Absence Microbial detection Methods, Draft 10th December, 2003"

Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,1 et 1,9 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,1 et 2,8 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Pour cette étude, seul le GDSTEC03-06 associé au GDEHEC01-06 a été testé.

- Deux protocoles ont été testés pour l'inclusivité :
 - Enrichissement 10h±2 h à 41,5°C±1°C : 50 souches de *E. coli* O157 :H7 ont été détectées sur 50 testées.
 - Enrichissement 18h±2 h à 41,5°C±1°C : 50 souches de *E. coli* O157 :H7 ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 32 souches non *E. coli* O157 :H7 n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats** (identiques pour tous les GeneDisc) :
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 3 à 4 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait dans la journée avec la méthode alternative contre 1 à 2 jours avec la méthode de référence.
 - Dans le cas de résultats présumés positifs par la méthode alternative, mais rendus négatifs après confirmation, les résultats négatifs sont obtenus en 1 jour.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de viande hachée, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *E.coli* O157 :H7 aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25g
- 1 – 10 UFC/25g
- 5 – 50 UFC/25g

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 24 analyses au total par laboratoire participant.

Le protocole spécifique « viandes de bœuf crues », comportant un enrichissement en eau peptonée tamponnée préchauffée 10h±2h à 41,5°C±1°C, a été mis en oeuvre. Les protocoles spécifiques de confirmations ont été testés.

Résultats :

Niveaux de contamination	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats exploités*	Nombre de résultats négatifs		Nombre de résultats positifs	
				REF	ALT	REF	ALT
0	104	104	96	95	96	1**	0
1	104	104	96	0	0	96	96
2	104	104	96	0	0	96	96

* Les résultats d'un laboratoire ont été exclus, inexploitable pour cause de contamination.

** Un laboratoire a trouvé un échantillon positif pour cause de contamination.

Calculs

- L'exactitude relative est de 99,7%
- La spécificité est de 100%
- La sensibilité est de 100%

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

La **sensibilité** a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Méthode alternative :	Méthode de référence :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,5\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100\%$

Degré d'accord, concordance et odds ratio :

Degré d'accord : % de chance de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés par le même laboratoire dans des conditions de répétabilité. C'est la moyenne des probabilités que deux réplicats donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Concordance : % de chance de trouver le résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité). C'est le % de toutes les paires de réplicats donnant le même résultat.

Odds ratio (COR) : il est défini par la formule suivante :
 $COR = \text{degré d'accord} \times (100 - \text{concordance}) / \text{concordance} \times (100 - \text{degré d'accord})$

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode alternative** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,0
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode de référence** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	98,2%	97,9%	1,0
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est équivalente à celle de la méthode de référence.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire
sur le site www.afnor-validation.org