



**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 : ADN 33/02 – 04/10

Date de validation : 02.04.2010

Fin de validité : 02.04.2014

La société **ADNucleis**
(siège social) 30 Chemin des Mouilles
69290 Grézieu La Varenne

Site de production **ADNucleis**
3 routes des Pierres Blanches
69290 Grézieu La Varenne

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

HQS *Cronobacter* spp Sybr

Référence du protocole : Version Avril 2010 v02.01

DOMAINE D'APPLICATION

Produits laitiers.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

ISO/TS 22964 (Février 2006) – Lait et produits laitiers - Détection de l'*Enterobacter sakazakii*.

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode HQS *Cronobacter* spp Sybr repose sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) basée sur la technique SYBR® Green. Elle permet la détection des *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) à partir d'un bouillon de culture en eau peptonnée tamponnée préchauffé à 37°C+/-1°C suivi d'un enrichissement de 24 heures à 37°C+/-1°C.

Le kit est constitué d'un mélange réactionnel d'extraction des ADN génomiques, d'un kit de purification des ADN et de tubes de réaction PCR destinés à l'obtention d'amplicons spécifiques de *Cronobacter* spp. L'interprétation des résultats se fait à partir des graphiques et données de la qPCR.

Le kit HQS *Cronobacter* spp Sybr est certifié AFNOR VALIDATION pour son utilisation avec les thermocycleurs suivants : ABI 7000/7300/7500/7900 (Applied Biosystems), RotorGene (Qiagen), Realplex (Eppendorf) et MX3005P (Stratagene).

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) à partir des bouillons après 24 heures d'enrichissement.
- Utilisation de toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode HQS *Cronobacter* spp Sybr. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

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

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2009 sur 68 échantillons de produits dont 1 naturellement contaminés, 30 artificiellement contaminés et 37 non contaminés, appartenant à la grande catégorie « Produits laitiers ».

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**. Deux lectures (à 12 heures et 24 heures d'incubation) ont été effectuées. Les résultats sont repris dans deux tableaux distincts.

Tableau de résultats « lecture à 12 heures »
Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 30 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 37 ⁽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

Tableau de résultats « lecture à 24 heures »
 Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 31 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 0 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 37 ⁽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 :

	Lecture à 12 heures	Lecture à 24 heures
Exactitude relative : AC %	98,5	100
Spécificité relative : SP %	100	100
Sensibilité relative : SE %	96,8	100

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 (SE %) (PA + PD) / (PA + PD + ND) =		Méthode de référence (SE %) (PA + ND) / (PA + PD + ND) =
Lecture à 12 heures	Lecture à 24 heures	100%
96,8%	100%	

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2009, sur la combinaison produit alimentaire/souche décrite dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent la catégorie « Produits laitiers ».

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/30g ou 30 ml)	
		Méthode alternative (Lectures à 12h et 24h)	Méthode de référence
Poudre de lait infantile	<i>Cronobacter</i> spp	0,3 [0,2 – 0,5]	0,3 [0,2 – 0,5]

(3) LOD₅₀ : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas. FDA. 2006. *Final Report and Executive Summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology. Appendix K. Statistics Working Group (Tholen, D. W., D. S. Paulson, B. Jarvis, D. M. Mettler, B. Lombard, K. Newton, M. A. Mozola, and A. D. Hitchins.) Report Part 4a - LOD50.*

Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative (lectures à 12h et à 24h) est identique à celui de la méthode de référence et se situe entre **0,3 et 0,5 UFC/30g**.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Cronobacter* spp ont été détectées sur 50 testées. Des souches de *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*, *Cronobacter sakazakii subsp malonaticus* et *Cronobacter muytjensii* ont été testées.
- L'étude de 32 souches non *Cronobacter* spp 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 :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 5 jours avec la méthode alternative, comme avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 3 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 5 jours.
- **Formation du personnel :** La mise en œuvre de la méthode HQS *Cronobacter* spp Sybr nécessite une formation de 4 jours pour un technicien formé aux techniques classiques de microbiologie, et de 2 jours pour un technicien formé aux techniques de biologie moléculaire. Une formation supplémentaire d'une ½ journée aux précautions à prendre pour la biologie moléculaire est nécessaire (port de gants, contamination aérienne, etc.).

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait infantile, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Cronobacter* spp aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/30 mL
- 3 UFC/30 mL
- 30 UFC/30 mL

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

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	96	96	88	0	0	88	88
1	96	96	88	1	1	87	87
2	96	96	88	0	0	88	88

* Les résultats d'un laboratoire ont été exclus pour cause d'intercontamination d'échantillons.

Calculs

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

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) :

$$\text{Méthode alternative :} \\ (PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99\%$$

$$\text{Méthode de référence :} \\ (PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99\%$$

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 répliqués 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 répliqués donnant le même résultat.

Odds ratio (COR) : il est défini par la formule suivante :

$$\text{COR} = \text{degré d'accord} \times (100 - \text{concordance}) / \text{concordance} \times (100 - \text{degré d'accord})$$

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

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

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est identique 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