



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

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

N° attestation : AES 10/12 – 10/11

Date de validation : 06.10.2011

Fin de validité : 06.10.2015

La Société AES CHEMUNEX
rue Maryse Bastié
Ker Lann - CS 17219
35172 BRUZ cedex
France

Site de production AES Chemunex Canada
CDBL
500 boulevard Cartier Ouest, Suite 262
H7V5B7, LAVAL, QUEBEC
Canada

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

ADIAFOOD *Escherichia coli* O157 :H7

Référence du protocole : ADIAF – ESC – Rev 0

DOMAINE D'APPLICATION

Viandes crues de bœuf

RESTRICTIONS

Aucune

METHODE DE REFERENCE

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'FM', with a long horizontal stroke extending to the right.

**Directrice Générale
Florence MÉAUX**



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

www.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode ADIAFOOD *Escherichia coli* O157:H7 repose sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel. Le système automatisé permet la détection rapide des *Escherichia coli* O157:H7 en identifiant leur séquence d'ADN en série d'étapes : préparation et enrichissement de l'échantillon, extraction de l'ADN et détection des pathogènes. Le kit est disponible en deux formats : microplaques ou barrettes de tubes.

Les thermocycleurs Stratagene MX3000P et MX3005P, et le logiciel Sentinel sont inclus dans le champ d'application du protocole validé.

Dans le cadre de la marque NF 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 à partir des colonies isolées (en incluant l'étape de purification) en repartant de l'enrichissement primaire en EPT PCR.
- Par réalisation d'un test latex O157 et d'un test latex H7 sur colonies purifiées, en suivant les étapes décrites dans la notice technique de la méthode alternative. Le résultat ADIAFOOD est confirmé si les deux tests latex sont positifs. Si ce n'est pas le cas, suivre la procédure recommandée dans la notice technique.
- Par toute autre méthode certifiée NF VALIDATION dont le principe est différent de la méthode ADIAFOOD *Escherichia coli* O157:H7. L'intégralité du protocole de détection de cette seconde méthode devra être respectée. 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 œuvre 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 2011 sur 61 échantillons de produits dont aucun naturellement contaminé, 30 artificiellement contaminés et 31 non contaminés, appartenant à la catégorie :

- « viandes crues de bœuf » (produits frais, produits congelés, produits avec additifs).

Les deux temps d'incubation de la méthode alternative ont été testés.

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

Incubation 7 heures - Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 10 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 16 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 31 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

Incubation 24 heures - Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 13 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 16 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 31 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) (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 :

	Incubation 7 heures	Incubation 24 heures
Exactitude relative : AC	67,2%	72,1%
Spécificité relative : SP	71,4%	92,9%
Sensibilité relative : SE	66,0%	66,0%

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) :

Méthode alternative : (PA + PD) / (PA + PD + ND)		Méthode de référence : (PA + ND) / (PA + PD + ND)
Incubation 7 heures	Incubation 24 heures	
86,7%	96,7%	46,7%

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

Temps d'incubation 7 h

PD = 16, ND = 4, Y = PD + ND = 20 ; $6 \leq Y \leq 22$, m = 4, M = 5, donc m < M

Temps d'incubation 24 h

PD = 16, ND = 1, Y = PD + ND = 17 ; $6 \leq Y \leq 22$, m = 1, M = 4, donc m < M

Conclusion

Le test conclut à une différence statistiquement significative entre les deux méthodes pour les deux temps d'incubation de la méthode alternative testée.

Ces différences sont justifiées par le nombre élevé de déviations positives rencontrées pendant l'étude, ce qui traduit une performance de la méthode alternative supérieure à celle de la méthode de référence.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2011, sur la combinaison produit alimentaire/souche décrite dans le tableau ci-dessous.

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/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Viande hachée	<i>E. coli</i> O157:H7	0,6 [0,4 - 0,9]	0,7 [0,5 - 1,1]

(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 0,4 et 0,9 UFC/25 g, quel que soit le temps d'incubation testé (7h et 24 h).

Le niveau de détection de la méthode de référence est compris entre 0,5 et 1,1 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Escherichia coli* O157 :H7 ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 34 souches non *Escherichia coli* O157 :H7 n'a pas mis en évidence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- Délai d'obtention des résultats :
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 4 jours (en fonction de la durée d'enrichissement) avec la méthode alternative, contre 5 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait dans la journée ou en 1 jour (en fonction de la durée d'enrichissement) 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 3 à 4 jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2011 avec 14 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/25 g
- 3 UFC/25 g
- 30 UFC/25 g

Les laboratoires ont testé, par la **méthode alternative** (mise en œuvre du protocole en 7h d'incubation) et par la **méthode de référence**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 48 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	112	104	96	96	0	0	
1	112	104	96	0	0	96	96
2	112	104	96	0	0	96	96

* Un laboratoire n'a pas réalisé les essais.

** Les résultats d'un laboratoire n'ont pas été pris car il n'a pas respecté les conditions d'incubation des échantillons.

Calculs

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

Interprétation

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

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 :

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

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	100%	100%	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