



**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 : BIO 12/30 – 05/10

Date de validation : 21.05.2010

Fin de validité : 21.05.2014

La Société **BIOMERIEUX**
69280 MARCY L'ETOILE
FRANCE

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

Gélose CampyFood (Gélose CFA) – Réf. 43 471

Référence du protocole : 13250 version F

DOMAINE D'APPLICATION

Produits carnés et prélèvements d'environnement

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 10272-1 (Avril 2006) - Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Campylobacter* spp. - Partie 1 : méthode de recherche

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Beslin" with a stylized flourish and the initials "P/B" written below it.

**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

La méthode Gélose CampyFood (CFA) est un milieu sélectif pour la détection de la plupart des espèces de *Campylobacter*. La gélose CFA contient des activateurs spécifiques favorisant la croissance des *Campylobacter*, un mélange sélectif inhibant la plupart des contaminants, et un indicateur colorant les colonies caractéristiques en rouge.

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 :

- Par identification de 1 à 5 colonies caractéristiques selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification)
- Par isolement, de 1 à 5 colonies, sur deux géloses Columbia au sang incubées à 41,5°C, l'une en aérobiose et l'autre en microaérobiose. L'étude de morphologie et le test oxydase sont réalisés en complément sur les colonies n'ayant pas présenté de croissance en aérobiose.
- Par le test VIDAS *Campylobacter* réalisé à partir d'une colonie isolée ou non (en respectant les conditions décrites dans la notice de la méthode CFA)

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 2010 sur 208 échantillons de produits dont 44 naturellement contaminés, 55 artificiellement contaminés et 109 non contaminés, appartenant aux catégories « produits carnés (viandes crues, congelées et préparation à base de viande) et prélèvements d'environnement ».

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

Tableaux de résultats (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)
(Quel que soit le protocole de confirmation utilisé)

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 83 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 14 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 2 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 109 ⁽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 (quel que soit le protocole de confirmation utilisé) :

- Exactitude relative : **AC** = 92,3%
- Spécificité relative : **SP** = 88,6%

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

- Sensibilité relative : **SE** = 97,6%

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 :
 $(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 98,0\%$

Méthode de référence :
 $(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 85,9\%$

Analyse des discordants (selon l'annexe F de la norme NF EN ISO 16140) :
 (Quel que soit le protocole de confirmation utilisé)

$PD = 14, ND = 2, Y = PD + ND = 16 ; 6 \leq Y \leq 22 ; m = 2, M = 3 ; m < M$

Conclusion

Les méthodes sont considérées différentes en terme statistique. Les résultats s'expliquent par un nombre important de résultats positifs supplémentaires obtenus par la méthode alternative.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2010, sur les 3 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories d'aliments « Produits carnés et prélèvements d'environnement ».

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 de volaille	<i>Campylobacter jejuni</i>	0,7 [0,3 – 1,8]	0,9 [0,3 – 2,4]
Viande de porc	<i>Campylobacter jejuni</i>	0,9 [0,4 – 1,8]	0,9 [0,4 – 1,8]
Eau de process	<i>Campylobacter coli</i>	0,3 [0,2 – 0,4]	0,3 [0,2 – 0,4]

(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 se situe entre 0,2 et 1,8 UFC/25 g.
 Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 2,4 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Campylobacter* (*C. coli*, *C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. lari*) ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 30 souches non *Campylobacter* et *Campylobacter* non thermotolérantes (*C. fetus*) n'a pas mis en évidence de réactions croisées.

Remarque 1 : Les souches suivantes se sont développées sur gélose CFA, leur aspect n'était pas caractéristique de *Campylobacter* : une souche d'*Enterobacter cloacae*, une d'*E.coli* et une d'*Acinetobacter baumannii* ont donné des colonies de couleur lie de vin à bords irréguliers. Une souche d'*Aeromonas hydrophila* a donné des colonies rouges violacées sans reflet métallique.

Remarque 2 : Les souches de *C. fetus* testées n'ont pas montré de croissance sur gélose CFA après une incubation à 41.5°C puisqu'elles sont thermosensibles.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 4 à 7 jours avec la méthode alternative contre 6 à 8 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 4 jours avec la méthode alternative comme pour 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 4 à 7 jours.
- **Autres** : La méthode alternative permet notamment de trier les échantillons négatifs des échantillons suspects et d'alléger l'étape de confirmation.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 17 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de viande hachée de volaille, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Campylobacter jejuni* aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25g
- 3 UFC/25g
- 30 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.

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	136	128	88	73	81	15	7
1	136	128	88	65	2	23	86
2	136	128	88	47	0	41	88

* Un laboratoire n'a pas réalisé les essais : les échantillons ont été reçus hors délai et leur température de réception n'était pas conforme.

** Les résultats de 5 laboratoires ont été exclus (l'un d'entre eux a reçu les échantillons hors délai et leur température de transport était non-conforme ; pour un autre laboratoire, la température de réception des échantillons n'était pas conforme ; trois autres laboratoires ont réalisé les essais hors délai)

Calculs

- L'exactitude relative est de 52,3%

Note : Ce pourcentage s'explique par une meilleure détection des échantillons positifs avec la méthode alternative par rapport à la méthode de référence, comme le confirme le nombre élevé (114) de résultats positifs supplémentaires obtenus par la méthode alternative. La présence d'une charge bactérienne très élevée dans la matrice alimentaire a contribué à la difficulté de l'analyse en limitant la croissance des *Campylobacter* dans le bouillon d'enrichissement et en les masquant sur les géloses sélectives traditionnelles.

- La spécificité est de 92,1%

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

- La sensibilité est de 98,8%

Interprétation

L'étude interlaboratoire montre des résultats non équivalents entre la méthode de référence et la méthode alternative du fait des performances supérieures obtenues par la méthode alternative.

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

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 93,8\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 40,9\%$$

En tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés, le résultat de **sensibilité** obtenu lors de l'étude interlaboratoire est du même ordre que celui obtenu lors de l'étude préliminaire pour la méthode alternative, alors que pour la méthode de référence la sensibilité est diminuée d'un facteur 2.

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 répliquats 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 répliquats 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	87%	85,2%	1,02
L1	96%	95,5%	1.13
L2	100%	100,0%	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	84%	70,5%	1,20
L1	76%	59,9%	2,17
L2	75%	47,7%	3,33

Conclusion

Les valeurs de degrés d'accord, concordance, odds ratio de la méthode alternative ne sont pas équivalentes à celles obtenues pour la méthode de référence. La variabilité de la méthode alternative est plus faible que celle de la méthode de référence.

Dans des conditions très défavorables de rapport de concentration souche cible/flore de compétition (flore totale d'environ 10^9 UFC/g), la méthode alternative se révèle plus performante que 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