



**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 : BRD 07/14 – 09/07

Date de validation : 27.10.2007

Fin de validité : 27.10.2011

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

BIO-RAD
3 Bld Raymond Poincaré
92430 Marnes la Coquette
France

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

RAPID'E.coli O157 :H7

Référence du protocole : V1

DOMAINE D'APPLICATION

Produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

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

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

AFAQ AFNOR Certification

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France
Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40
certification@afaq.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le milieu RAPID'*E.coli* O157:H7 est un milieu sélectif combinant à la fois des substrats chromogéniques et des indicateurs biochimiques. Cette association permet l'identification présomptive directe des *E.coli* O157:H7, incluant les souches atypiques, parmi la flore interférente sur la base des profils enzymatiques et métaboliques spécifiques observés.

La sélectivité du milieu est augmentée par l'ajout d'agents sélectifs : novobiocine et tellurite de potassium.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés à partir des colonies isolées sur milieu chromogénique selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification) ou par la combinaison de deux tests latex spécifiques *E.coli* O157 et H7.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR, ou par la combinaison de deux tests latex spécifiques *E.coli* O157 et H7), 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 2007 sur 331 échantillons de produits dont 156 artificiellement contaminés et 175 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, divers et prélèvements d'environnement.

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

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 = 140 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 9 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 175 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 2 échantillons présumés positifs non confirmés

(3) dont 3 échantillons présumés positifs, présentant des colonies caractéristiques bleu nuit sans halo, non confirmées par la réalisation des tests latex. Ces isolats ont été identifiés à l'espèce *Escherichia fergussoni*. 18 autres échantillons ont également été soumis aux tests de confirmation. Toutefois, les colonies de couleur bleue à bleu-vert n'apparaissent pas caractéristiques ; les tests latex, tous négatifs, ont été réalisés dans le but de garantir l'exclusivité du milieu.

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

- Exactitude relative : **AC = 95,2**

- Spécificité relative : **SP = 95,1**

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

- Sensibilité relative : **SE = 95,2**

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 :
 $(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 95,5$

Méthode de référence :
 $(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 94,2$

Conclusion

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

PD = 9 , ND = 7 donc Y = PD + ND = 16 ; $6 \leq Y \leq 22$ m = 7, M = 3 donc m > M

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

NIVEAU DE DETECTION Relatif

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

Des essais ont été effectués en 2007, sur les cinq combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, divers 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 :

		Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Steack haché	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,9 [0,6 – 1,2]	0,6 [0,4 – 0,8]
Lait cru	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,8 [0,5 – 1,3]	0,7 [0,5 – 1,0]
Cidre fermier	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,1 [0,1 – 0,2]	0,3 [0,1 – 0,9]
Salade composée	<i>E.coli</i> O157 :H7	1,2 [0,7 – 2,2]	0,5 [0,2 – 1,3]
Eau de process	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,7 [0,2 – 2,2]	0,4 [0,1 – 1,7]

(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 Use 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 2,2 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,1 et 1,7 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *E.coli* O157 :H7 ont été détectées sur 50 testées.
- Sur 36 souches non *E.coli* O157 :H7 testées : deux souches *E.coli* de sérotypes O92:H33 et O55:H6 ont montré des colonies caractéristiques sans halo. Elles présentent toutes deux des tests latex négatifs. Deux souches *E.coli* O157 et H négatif ont été testées : elles présentent des colonies non caractéristiques de couleur gris-vert.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en trois jours avec la méthode alternative contre trois à quatre jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en deux jours avec la méthode alternative contre un à deux 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 trois jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 21 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche *E.coli* O157:H7 ATCC 700728 aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25 ml
- 1 – 10 UFC/25 ml
- 5 – 50 UFC/25 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	168	144	96	92***	93***	3	2
1	168	144	96	0	0	96	96
2	168	144	96	0	0	96	96

* trois laboratoires n'ont pas réalisé les analyses et un laboratoire a démarré les analyses à J+2

**cinq laboratoires ont été exclus car ils ont obtenu des résultats traduisant des intercontaminations

*** 1 flacon cassé lors du transport

Calculs

- L'exactitude relative est de 99,7%
- La spécificité est de 97,9 %
- La sensibilité est de 100 %

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

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,5 \%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100 \%$$

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	94%	93%	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	93%	92%	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 AFAQ AFNOR Certification toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition un document de synthèse des études préliminaire et collaborative