



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 07/15-06/08

Date de validation :	30.06.2008
Extensions le :	25.09.2008
	26.01.2009
	05.02.2010
Fin de validité :	30.06.2012

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

**BIO-RAD**  
3 Boulevard 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 :

**iQ-Check™ *E.coli* O157:H7 (Ref 357-8114)**

Référence du protocole : 808466 – Rev. E

**DOMAINE D'APPLICATION**

Viandes crues de bœuf.

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune.

**METHODE DE REFERENCE**

**Norme 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](mailto:certification@afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

## PRINCIPE DE LA METHODE

Le test iQ-Check *E.coli* O57:H7 repose sur la technique PCR en temps réel. La détection et l'analyse des résultats sont réalisés avec un thermocycleur (Chromo4™, iQ™5, iCycler iQ™ et MiniOpticon™).

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés à partir du bouillon d'enrichissement d'eau peptonée :

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- soit par isolement sur gélose CT-SMAC (avec ou sans immuno-séparation) suivi d'un test latex O157 et d'un test latex H7 sur colonie.
- soit par un protocole impliquant une étape d'immuno-séparation (IMS) suivie d'un isolement sur gélose RAPID'*E.coli* O157 :H7 suivi d'un test latex O157 et d'un test latex H7 sur colonie.

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

## NOTE (Historique de validation)

1/ L'étude d'extension de septembre 2008 porte sur l'ajout d'un protocole alternatif d'enrichissement :

- Enrichissement de 20 heures en Eau Peptonée Tamponnée (EPT), à 37°C.

L'étude initiale de validation de juin 2008 a été complétée pour la partie exactitude relative, sensibilité relative et spécificité relative sur 31 échantillons positifs et 31 échantillons négatifs interprétables appartenant à la catégorie viandes crues de bœuf et pour la partie niveau de détection relatif. Le protocole EN ISO 16140 a été mis en œuvre pour l'analyse de ces échantillons.

**Avertissement :** *Durant cette étude, 16,6% des échantillons testés n'ont pas été confirmés par isolement direct sur CT-SMAC, mais ont pu être confirmés par un protocole impliquant une étape d'IMS.*

2/ En janvier 2009, une nouvelle étude a permis d'étendre la validation à l'utilisation d'une nouvelle version du logiciel Opticon Monitor™ intégrant, en plus de la possibilité d'analyse manuelle, une option de retraitement automatique des résultats

Des tests, effectués en interne et par tierce partie, ont été réalisés à partir du protocole d'enrichissement en eau peptonée tamponnée à 8h et 24h, suivi de la mise en œuvre du protocole simplifié II. Par ailleurs, toutes les PCR ont été réalisées par Chromo4™, puis traitées en parallèle à la fois par analyse manuelle et par analyse automatique du logiciel Opticon Monitor™.

Les essais ont permis de démontrer que les traitements automatique et manuel des échantillons ont donné les mêmes résultats.

Pour plus de clarté, l'ensemble de ces résultats n'est pas détaillé dans la présente attestation.

3/ En février 2010, les extensions suivantes ont été validées par le bureau technique AFNOR VALIDATION :

- Modifications de l'étape d'extraction, avec utilisation d'un nouveau format de consommable plastique « plaque Deepwell » (en plus du format « tube » déjà validé).

Des tests effectués en interne ont permis de conclure que ces modifications n'avaient pas d'impact sur les résultats rendus.

- Utilisation du thermocycleur CFX96™ et son logiciel CFX Manager™, et pilotage du MiniOpticon™ par le logiciel CFX Manager™.

Des essais réalisés en interne ont permis de conclure que les résultats obtenus avec ces nouveaux équipements étaient équivalents à ceux obtenus avec les automates et logiciels déjà validés.

L'ensemble de ces résultats n'apparaît pas dans la présente attestation.

## 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 mars 2008 sur 67 échantillons de produits dont 1 naturellement contaminé, 35 artificiellement contaminés et 31 non contaminés, appartenant à la catégorie viandes crues de bœuf.

L'enrichissement en Eau Peptonée Tamponnée (EPT) à 8 heures et à 24 heures à 41,5°C et les trois protocoles de confirmation suivants ont été testés :

- isolement direct sur gélose CT SMAC suivi d'un test latex O157 et d'un test H7 sur colonie.
- IMS suivi d'un isolement sur gélose RAPID'E.coli O157 :H7 suivi d'un test latex O157 et d'un test H7 sur colonie.
- IMS suivi d'un isolement sur gélose CT SMAC suivi d'un test latex O157 et d'un test H7 sur colonie.

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

#### Protocole 8 heures, 41,5°C

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 = 28 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 4 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 31 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

#### Protocole 24 heures, 41,5°C

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 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 4 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 31 <sup>(3)</sup>

(2) il s'agit de positifs confirmés

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

Des essais complémentaires ont été effectués en septembre 2008 sur 62 échantillons de produits dont 1 naturellement contaminé, 30 artificiellement contaminés et 31 non contaminés, appartenant à la catégorie viandes crues de bœuf.

L'enrichissement de 20 heures en Eau Peptonée Tamponnée (EPT) à 37°C et les trois protocoles de confirmation suivants ont été testés :

- isolement direct sur gélose CT SMAC, suivi d'un test latex sur colonie après isolement sur TCS ;
- IMS suivi d'un isolement sur gélose RAPID'E.coli O157 :H7, suivi d'un test latex sur colonie après isolement sur TCS ;
- IMS suivi d'un isolement sur gélose CT SMAC, suivi d'un test latex sur colonie après isolement sur TCS.

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

**Protocole 20 heures, 37°C**

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 = 28 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 1 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 2 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 31 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 1 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 :

	Exactitude relative AC (%)	Spécificité relative SP (%)	Sensibilité relative SE (%)
Protocole 8 heures (41,5°C)	88,1	88,6	87,5
Protocole 24 heures (41,5°C)	92,5	88,6	96,9
Protocole 20 heures (37°C)	95,2	96,9	93,3

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) =
Protocole 8 heures (41,5°C)	88,9	88,9
Protocole 24 heures (41,5°C)	97,2	88,9
Protocole 20 heures (37°C)	93,5	96,8

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

Protocole	Résultats	Conclusion
Protocole 8 heures (41,5°C)	PD = 4 ; ND = 4 ; Y = PD + ND = 8 ; 6 ≤ Y ≤ 22 M = 0 ; M = 4 ; donc m > M	Les deux méthodes ne sont pas différentes en terme statistique.
Protocole 24 heures (41,5°C)	PD = 4 ; ND = 1 ; Y = PD + ND = 5 ; Y < 6	Aucun test statistique n'est disponible.
Protocole 20 heures (37°C)	PD = 1 ; ND = 2 ; Y = PD + ND = 3 ; Y < 6	Aucun test statistique n'est disponible.

**Conclusion**

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques, quelque soit le protocole utilisé.

## NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en mars et septembre 2008, sur la combinaison steak haché / *E.coli* O157 :H7.

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 <sub>50</sub> <sup>(3)</sup> Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
			Méthode alternative	Méthode de référence
Protocole 8 heures (41,5°C)	Steak haché	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,7 [ 0,2 – 2,2 ]	0,5 [ 0,2 – 1,9 ]
Protocole 24 heures (41,5°C)	Steak haché	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,4 [ 0,1 – 1,7 ]	0,5 [ 0,2 – 1,9 ]
Protocole 20 heures (37°C)	Steak haché	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,2 [ 0,1 – 0,7 ]	0,3 [ 0,1 – 1,0 ]

<sup>(3)</sup> LOD<sub>50</sub> : 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 10<sup>th</sup> 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 1,9 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.
- L'étude de 36 souches *E.coli* non O157:H7 ou non *E.coli* 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 1 jour (protocole 8 heures) ou 2 jours (protocole 24 heures) avec la méthode alternative contre 3 à 4 jours avec la méthode de référence.
  - L'obtention des résultats négatifs se fait le jour même (protocole 8 heures) ou en 1 jour (protocole 24 heures) avec la méthode alternative contre 1 jour 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 (protocole 8 heures) ou 2 jours (protocole 24 heures).

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en juin 2008 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de viande hachée, contaminés artificiellement avec une souche d'*E.coli* O157 :H7 aux 3 niveaux suivants :

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

Les laboratoires ont testé, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 24 analyses au total pour chacune des **deux méthodes** et 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	104	96**	101**	8**	3**
1	112	104	104	3	0	101	104
2	112	104	104	0	0	104	104

\* Un laboratoire n'a pas effectué les analyses.

\*\* Des intercontaminations sont suspectées pour trois laboratoires, car les résultats positifs obtenus sur les échantillons non contaminés ont été confirmés.

### Calculs

- L'exactitude relative est de **97,4%**
- La spécificité est de **97,1%**
- 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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,7\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,6\%$$

### 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	95%	89%	1,1
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	91%	85%	1,1
L1	95%	94%	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](http://www.afnor-validation.org)