



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 : QUA 18/07-07/10

Date de validation : 02.07.2010

Fin de validité : 02.07.2014

La Société OXOID Thermo Fisher Scientific
6, route de Paisy – BP13
69571 DARDILLY cedex
FRANCE

Site de DuPont Qualicon
production ESL Building 400
Route 141 & Henry Clay Road
Wilmington DE 19880-0400 USA

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

BAX® Real-Time PCR Assay *E.coli* O157:H7

Référence du protocole : Part D14203648 – Rev 23QC-017.3-1110

DOMAINE D'APPLICATION

Viandes crues de bœuf et végétaux frais

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

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

Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode BAX[®] Real-Time PCR Assay *E.coli* O157:H7 pour la détection de *E.coli* O157:H7 est un kit pratique de détection utilisant la technologie PCR (Polymerase Chain Reaction). Il se compose d'un protocole en 3 étapes : préparation de l'ADN, amplification et détection. Après l'étape de lyse, le thermo-cycleur/détecteur du système BAX[®] effectue à la fois l'amplification et la détection automatique.

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 MP par l'une des manières suivantes :

- Selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonie (en incluant l'étape de purification)
- Par étalement de 50 µl du bouillon d'enrichissement sur gélose CT-SMAC incubée 18-24 heures à 35-37°C, et confirmation des colonies caractéristiques par le test Latex Wellcolex[™] *E.coli* O157:H7 (référence Oxoid R30959601).

Si aucune colonie caractéristique n'est mise en évidence sur gélose CT-SMAC, appliquer le protocole de confirmation QUALICON pour récupérer les *E.coli* O157:H7 par une étape d'IMS (référence Oxoid 23C-013-0804 FR0908). Dans certains cas, une seconde étape d'IMS peut s'avérer nécessaire.

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 2010 sur 148 échantillons de produits dont 4 naturellement contaminés, 81 artificiellement contaminés et 63 non contaminés, appartenant aux deux grandes catégories d'aliments suivantes :

- Viandes crues (fraîches, assaisonnées, surgelées)
- Végétaux frais (bruts, surgelés, frais prêts à l'emploi, prêts à cuire)

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

Deux temps d'incubation ont été testés durant cette étude (en 7/8 heures – 7 heures pour les viandes de bœuf et 8 heures pour les végétaux – et 24 heures).

Incubation en 7/8 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 = 39 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 26 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 12 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 71 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

Incubation en 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 = 46 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 34 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 63 ⁽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 :

	<u>Incubation 7/8 heures</u>	<u>Incubation 24 heures</u>
Exactitude relative (AC)	74,3%	73,6%
Spécificité relative (SP)	73,2%	64,9%
Sensibilité relative (SE)	76,5%	90,2%

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)
<u>Incubation 7/8 heures</u>	84,4%	66,2%
<u>Incubation 24 heures</u>	94,1%	60,0%

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

<u>Incubation 7/8 heures</u>	Y = PD + ND = 38 : Y > 22 Test de Mc Nemar : $D = PD-ND = 14$; $x^2 = d^2/y = 5,15$; $x^2 > 3,841$
<u>Incubation 24 heures</u>	Y = PD + ND = 39 : Y > 22 Test de Mc Nemar : $D = PD-ND = 29$; $x^2 = d^2/y = 21,6$; $x^2 > 3,841$

Conclusion

Les résultats montrent que les performances de la méthode alternative sont supérieures à celles 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 2010, sur les 2 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous. Ces produits représentent les deux catégories suivantes d'aliments :

- Viandes crues (fraîches, assaisonnées, surgelées)
- Végétaux frais (bruts, surgelés, frais prêts à l'emploi, prêts à cuire)

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 ₆₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	Souche	Méthode alternative (incubation 7/8h et 24h)	Méthode de référence
Viande hachée de bœuf	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,6 [0,4 – 1,0]	0,2 [0,1 – 0,7]
Epinaud surgelé	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,3 [0,1 – 0,8]	0,4 [0,2 – 0,9]

(3) **LOD₆₀** : 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 de référence se situe entre 0,1 et 0,9 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,1 et 1,0 UFC/25 g (quel que soit le temps d'incubation).

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- Les 50 souches de *E.coli* O157 :H7 testées ont été détectées..
- L'étude de 50 souches non *E.coli* O157 :H7 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 2 à 3 jours avec la méthode alternative et en 3 à 4 jours pour la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait dans la journée ou en 1 jour 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 3 à 4 jours.
- **Formation du personnel :** une formation d'au moins deux jours est recommandée pour les techniciens non formés aux pratiques liées à l'analyse par PCR.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de viande hachée de bœuf, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *E.coli* O157:H7 aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25 ml
- 5 UFC/25 ml
- 25 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	112	96	80	78	80	2	0
1	112	96	80	7	0	73	80
2	112	96	80	2	0	78	80

* Deux laboratoires n'ont pas réalisés les essais (l'un n'a pas reçu les échantillons et l'autre n'a pas pu réaliser les analyses)

** Les résultats de deux laboratoires n'ont pas été pris en compte (protocole d'essai non respecté)

Calculs

- L'exactitude relative est de 95,4%
- La spécificité est de 100%
- La sensibilité est de 100%

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire sont comparables 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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100,0%	100,0%	1,00
L1	100,0%	100,0%	1,00
L2	100,0%	100,0%	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	96,3%	95,0%	1,01
L1	87,2%	83,7%	1,04
L2	95,6%	95,1%	1,01

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