



**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 18/04 – 03/08

Date de validation : 28.03.2008

Fin de validité : 28.03.2012

La Société

OXOID Thermofisher
6, route de Paisy
69571 DARDILLY cedex
France

Site de production

DuPont Qualicon
ESL Building 400
PO Box 80400
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 :

SYSTEME BAX® *E. coli* O157:H7 MP

Références du protocole :

- Guide de l'utilisateur : **2CQ-049.4-0307/ FR0908-2 (BAX Q7)**
- Notice Technique : **BAX QB0673-0908**
- Protocole de confirmation pour *E. coli* O157 :H7 : **Bulletin Technique 23C-013-0804 FR0908**
- Schéma explicatif résumé : **2C-016.7-0306/FR1207**
- Version du logiciel : **2.4 (BAX Q7)**

DOMAINE D'APPLICATION

les viandes crues de bœuf, le lait cru, les fruits et végétaux et les plats cuisinés, les viandes crues de porc, d'ovin et de poulet

PRECAUTIONS D'EMPLOI

L'attention de l'utilisateur est attirée sur le fait que la méthode PCR nécessite une grande rigueur de manipulation afin de s'affranchir de toute source de contamination. Il est recommandé de suivre strictement le guide de l'utilisateur.

METHODE DE REFERENCE

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

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

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 système BAX[®] pour la détection de *Salmonella* 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.

La technologie PCR permet au système BAX[®] de réaliser une amplification rapide et spécifique de l'ADN. 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 résultats positifs doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- à partir du bouillon d'enrichissement, sur gélose sélective CT SMAC, avec confirmation des colonies suspectes par le test Latex Wellcolex *E. coli* O157:H7
- Par le protocole de confirmation Qualicon (Cf. référence en première page) dans le cas de la non confirmation par le protocole précédent.

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

Selon les produits à analyser, 2 protocoles sont définis, ils ont tous les deux été testés lors de l'étude de validation:

Pour la viande crue de bœuf, un enrichissement en bouillon Bax *E. coli* pendant 8h à 24h et transfert de 20 microlitres pour la lyse.

Pour toutes les autres matrices, un enrichissement en bouillon mTSB + novobiocine pendant 18h à 24h et transfert de 5 microlitres pour la lyse.

Le protocole "viandes crues de bœuf" a été testé à 8h et à 24h pour tous les échantillons.

Egalement, les deux cycles de PCR ont été testés : *E. coli* MP (3h30) et *E. coli* MP Express (2h30)

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 266 échantillons de produits alimentaires, dont 3 échantillons naturellement contaminés, 150 artificiellement contaminés et 123 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Viandes crues de bœuf, lait cru, fruits et végétaux, divers (plats cuisinés, viandes crues de porc, d'ovin et de poulet)

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

Tableaux de résultats (Cf. tab 1 norme NF EN ISO 16140) pour toutes matrices :

1/ avec mTSB ou Bax 8 heures, et protocole MP :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 110 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 22 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 127 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

2/ avec mTSB ou Bax 8 heures, et protocole MPE :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 103 ⁽¹⁾	Déviations positive A+ / R- PD = 14 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négative A- / R+ ND = 13 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 136 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

3/ avec mTSB ou Bax 24 heures, et protocole MP :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 113 ⁽¹⁾	Déviations positive A+ / R- PD = 27 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négative A- / R+ ND = 3 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 123 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

4/ avec mTSB ou Bax 24 heures, et protocole MPE :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 110 ⁽¹⁾	Déviations positive A+ / R- PD = 19 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négative A- / R+ ND = 6 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 131 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

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

Protocole	Exactitude relative : AC	Spécificité relative : SP	Sensibilité relative : SE
mTSB / Bax 8 h / MP	89,1	85,2	94,0
mTSB / Bax 8 h / MPE	89,8	90,7	88,8
mTSB / Bax 24h / MP	88,7	82,0	97,4
mTSB / Bax 24h / MPE	90,6	87,3	94,8

Note : une spécificité relative (SP) 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) :

Protocole	Sensibilité relative : SE	
	Méthode alternative (PA + PD) / (PA + PD + ND) = %	Méthode de référence (PA + ND) / (PA + PD + ND) = %
mTSB / Bax 8 h / MP	95,0	84,2
mTSB / Bax 8 h / MPE	90,0	89,2
mTSB / Bax 24h / MP	97,9	81,1
mTSB / Bax 24h / MPE	95,6	85,9

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

	Y = PD + ND	D = IPD - NDI	$X^2 = d^2/y$	Conclusion (test de Mac Nemar)
mTSB / Bax 8 h / MP	30	15	7,5	Les 2 méthodes sont différentes* à $\alpha < 0,05$
mTSB / Bax 8 h / MPE	27	1	0,04	Les 2 méthodes ne sont pas différentes à $\alpha < 0,05$
mTSB / Bax 24h / MP	30	24	19,2	Les 2 méthodes sont différentes* à $\alpha < 0,05$
mTSB / Bax 24h / MPE	25	13	6,76	Les 2 méthodes sont différentes* à $\alpha < 0,05$

* les différences sont en faveur de 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 2007, sur les 4 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous. Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : viandes crues de bœuf, lait cru, fruits et végétaux, et divers.

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Matrice / protocole	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)		
		Méthode alternative (MP)	Méthode alternative (MPE)	Méthode de référence
Steak haché / Bax 8h	<i>E. coli</i> O157:H7	1,1 [0,7 – 1,5]	1,1 [0,7 – 1,5]	0,3 [0,1 – 0,8]
Steak haché / Bax 24h	<i>E. coli</i> O157:H7	0,9 [0,7 – 1,3]	1,2 [0,9 – 1,7]	0,3 [0,1 – 0,8]
Lait cru	<i>E. coli</i> O157:H7	0,4 [0,1 – 1,3]	0,4 [0,1 – 1,3]	0,4 [0,1 – 1,3]
Piémontaise au jambon	<i>E. coli</i> O157:H7	0,4 [0,1 – 0,6]	0,4 [0,1 – 0,6]	0,4 [0,1 – 0,6]
Cidre fermier	<i>E. coli</i> O157:H7	0,3 [0,1 – 1,1]	0,3 [0,1 – 1,1]	0,3 [0,1 – 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 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

Les niveaux de détection de la méthode alternative se situent entre 0,1 et 1,7 UFC/gramme.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,1 et 1,6 UFC/gramme.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- Les 50 souches *E. coli* O157:H7 testées ont toutes donné des résultats positifs, avec un aspect caractéristique sur gélose CT SMAC
 - Parmi 35 souches **non** *E. coli* O157:H7 testées, une souche *E. coli* O55:H7 a donné un test PCR positif, mais présente des colonies non caractéristiques sur géloses de confirmation
- Il est à noter que 2 souches *E. coli* O157:H-, testées avec le protocole d'inclusivité, montrent un résultat négatif avec le test Bax et donnent des résultats caractéristiques sur gélose CT SMAC

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 jours (Bax 8h) à 4 jours (Bax 24h et mTSB) avec la méthode alternative (en incluant la confirmation) contre 3 à 4 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en moins d'un jour (Bax 8h) à 1 jour (Bax 24h et mTSB) 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 jours
- **Formation du personnel :**
Une formation aux pratiques liées à l'analyse par PCR et à la manipulation de l'automate d'au moins deux jours est recommandée.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 15 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons d'épinards hachés crus surgelés, contaminés artificiellement avec une souche non pathogène d'*E. coli* O157:H7 ATCC 43888 aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0/25g
- niveau 10/25g
- niveau 40/25g

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 24 analyses au total par laboratoire participant.

C'est le protocole relatif à l'analyse des végétaux avec un enrichissement en mTSB à 41,5°C pendant 18 à 24 heures, qui a été réalisé par l'ensemble des laboratoires.

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	120	104	96	94	95	2	1
1	120	104	96	4	4	92	92
2	120	104	96	0	0	96	96

* 2 laboratoires ont reçu les échantillons hors délai et n'ont pas réalisé les analyses

** 1 laboratoire a trouvé tous les échantillons non inoculés, positifs par la méthode de référence, ses résultats ont donc été exclus

Calculs

- L'exactitude relative est de **99,7%**
- La spécificité est de **99,0%**
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 **97,9%**

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	98,0	97,0	1,0
L1	94,0	92,0	1,0
L2	100,0	100,0	1,0

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	96,0	96,0	1,0
L1	94,0	92,0	1,0
L2	100,0	100,0	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