

Contacts:

Stéphanie SAMMARTANO
Ingénierie certification
stephanie.sammartano@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 62 39

Audrey VERNEL
Chargée de clientèle
audrey.vernel@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 60 63

Réf.: SSO/AYV/NF102/Clients/ADNucleis/
Avis BT_Prolongation_HQS E. coli O157 :H7_2014-03-20

Objet : Marque NF VALIDATION

SAS ADNucleis
Docteur Michel FRANCK
30 Chemin des Mouilles
69290 GREZIEU LA VARENNE

La Plaine Saint-Denis, le 25 mars 2014

Monsieur,

Le droit d'usage de la marque NF VALIDATION de la méthode alternative d'analyse suivante :

HQS <i>E. coli</i> O157 :H7 Sybr	Réf. ADN 33/01-02/10
----------------------------------	----------------------

Est arrivé à expiration le 5 février 2014 avant que les résultats de l'étude de reconduction ne puissent être présentés au Bureau Technique « Microbiologie agroalimentaire » de la marque NF VALIDATION (NF102).

C'est pourquoi, sur avis positif du Bureau Technique concerné, je vous accorde une prolongation du droit d'usage de la marque NF VALIDATION pour cette méthode jusqu'au 5 Août 2014.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, mes salutations distinguées.



Directrice Générale
Florence MÉAUX





**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 : ADN 33/01 – 02/10

Date de validation : 05.02.2010

Fin de validité : 05.02.2014

La société (siège social)	ADNucleis 30 Chemin des Mouilles 69290 Grézieu La Varenne	Site de production	ADNucleis 3 routes des Pierres Blanches 69290 Grézieu La Varenne
------------------------------	---	--------------------	--

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

HQS *E.coli* O157H7 Sybr

Référence du protocole : Version Avril 2010 v02.01

DOMAINE D'APPLICATION

Produits laitiers et produits carnés.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 16654 (Juillet 2001) – Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.

Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jacques Beslin".

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode HQS *E.coli* O157H7 Sybr repose sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) basée sur la technique SYBR® Green. Elle permet la détection des *E.coli* O157 :H7 après enrichissement de 12 à 24 heures à 37±1°C en bouillon PCRone®.

Le kit est constitué d'un mélange réactionnel d'extraction des ADN génomiques, d'un kit de purification des ADN et de tubes de réaction PCR destinés à l'obtention d'amplicons spécifiques d'*E.coli* O157 :H7. L'interprétation des résultats se fait à partir des graphiques et données de la qPCR.

Le kit HQS *E.coli* O157H7 Sybr est certifié AFNOR VALIDATION pour son utilisation avec les thermocycleurs suivants : ABI 7000/7300/7500/7900 (Applied Biosystems), Rotorgene (Qiagen), Realplex (Eppendorf) et MX3005P (Stratagene).

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 :

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) à partir des bouillons enrichissement 12h à 24h.
- Utilisation de toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode HQS *E.coli* O157H7 Sybr. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

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 2009 sur 121 échantillons de produits dont 3 naturellement contaminés, 58 artificiellement contaminés et 60 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : « Produits laitiers et produits carnés ».

Tous les échantillons ont été analysés en simple par les deux méthodes. Deux lectures (à 12 heures et 24 heures d'incubation en bouillon PCRone®) ont été effectuées. Les résultats sont repris dans deux tableaux distincts.

Tableau de résultats « lecture à 12 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 = 57 ⁽¹⁾	Déviation positive A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviation négative A- / R+ ND = 3 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 60 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

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

Tableau de résultats « lecture à 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 = 59 ⁽¹⁾	Déviation positive A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviation négative A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 60 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun 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 :

	Lecture à 12 heures	Lecture à 24 heures
Exactitude relative : AC %	96,7	98,3
Spécificité relative : SP %	98,4	98,4
Sensibilité relative : SE %	95,0	98,3

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 (SE %) (PA + PD) / (PA + PD + ND) =		Méthode de référence (SE %) (PA + ND) / (PA + PD + ND) =
<i>Lecture à 12 heures</i>	<i>Lecture à 24 heures</i>	
95,1%	98,4%	98,4%

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2009, sur les 2 combinaisons produit alimentaire/souche décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : « Produits laitiers et produits carnés ».

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
		Lecture à 12 h	Lecture à 24 h	
Viande hachée	<i>E. coli</i> O157 :H7	1,2 [0,7 – 2,0]	1,0 [0,6 – 1,7]	0,9 [0,5 – 1,5]
Lait cru	<i>E. coli</i> O157 :H7	1,3 [0,8 – 2,0]	1,0 [0,6 – 1,6]	0,8 [0,6 – 1,2]

(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 0,7 et 2,0 UFC/25 g pour une lecture à 12 heures et entre 0,6 et 1,7 UFC/25 g pour une lecture à 24 heures.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,5 et 1,5 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *E.coli* O157 :H7 ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 33 souches non *E.coli* O157 :H7 n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 4 jours avec la méthode alternative contre 4 à 5 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 2 à 3 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 4 jours.
- **Formation du personnel** : La mise en œuvre de la méthode nécessite une formation de 4 jours pour un technicien formé aux techniques classiques de microbiologie, et de 2 jours pour un technicien formé aux techniques de biologie moléculaire. Une formation supplémentaire d'une ½ journée aux précautions à prendre pour la biologie moléculaire est nécessaire (port de gants, contamination aérienne, etc.).

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de viande hachée, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *E.coli* O157 :H7 aux 3 niveaux suivants :

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

Les laboratoires ont testé, par les deux méthodes, 8 répliquats 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	96	96	96	96	96	0	0
1	96	96	96	2	7	94	89
2	96	96	96	0	0	96	96

Calculs

- L'exactitude relative est de 97%
- La spécificité est de 100%
- La sensibilité est de 96%

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96\%$$

Méthode de référence :

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

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	100%	100%	1,0
L1	89%	86%	1,3
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	100%	100%	1,0
L1	96%	96%	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