



**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 : BIO 12/08 – 07/00

Date de validation :	05.07.2000
Dates de reconduction*:	23.09.2004*
	23.05.2008
	10.05.2012
Dates d'extensions :	24.05.2007*
	17.01.2008*
Fin de validité :	05.07.2016

* Le protocole EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la reconduction en 2004 et lors de l'extension en 2007 pour l'étude préliminaire, et en 2008 pour l'étude interlaboratoire.

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

bioMérieux SA
Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE, France

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

VIDAS® *E.coli* O157 (ECO)

Référence du protocole : Réf. 30 112 – version 07292 P

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine.

RESTRICTIONS

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

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

A blue ink signature of the name "Florence Méaux".

Directrice Générale
Florence MÉAUX



PRINCIPE DE LA METHODE

Le test VIDAS® *E.coli* O157 (ECO) est un test immuno-enzymatique permettant la détection d'antigènes d'*Escherichia coli* O157 par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Le test VIDAS® immuno-concentration *E.coli* O157 (ICE) est un test qui s'utilise en complément du test VIDAS® ECO pour la confirmation des échantillons d'origine alimentaire détectés positifs. Il permet la concentration d'*E.coli* O157 à partir d'un bouillon d'enrichissement.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue du test VIDAS® ECO doivent être confirmés à partir du bouillon d'enrichissement CT-MAC (protocole général) ou de l'eau peptonée tamponnée (protocole viandes crues de bœuf).

La confirmation doit être initiée dans les 24 heures suivant la fin de l'incubation du bouillon correspondant :

1. Par l'intermédiaire du test VIDAS® ICE réalisé soit à partir du bouillon CT-MAC (protocole général) suivi d'un isolement sur gélose CT-SMAC ou sur gélose ChromID O157 :H7, soit à partir de l'eau peptonée tamponnée (protocole viandes crues de bœuf) suivi d'un isolement sur gélose CT-SMAC et sur gélose ChromID O157 :H7
2. Ou par isolement direct soit du bouillon CT-MAC (protocole général) sur gélose CT-SMAC ou sur gélose CT-O157 :H7 ID, soit du bouillon en eau peptonée tamponnée (protocole viandes crues de bœuf) sur gélose CT-MAC et sur gélose CT-O157 :H7 ID

Les colonies caractéristiques sur ces milieux seront identifiées de l'une des manières suivantes :

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonies (en incluant l'étape de purification)
- en réalisant une galerie bioMérieux et un test au latex O157 directement à partir des colonies isolées (sans étape de purification)
- en réalisant un test latex O157 directement à partir des colonies isolées sur la gélose sélective

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

Il est possible par exemple de procéder à un nouvel isolement selon la procédure 1 ou 2 complémentaire à celle mise en œuvre en première intention.

Note : Après incubation, il est possible de conserver le bouillon d'enrichissement pendant 24 heures à 2-8°C avant la réalisation du test VIDAS® ou pour la confirmation d'un résultat positif.

HISTORIQUE DE VALIDATION

Depuis la première étude de validation réalisée en 2000, la méthode VIDAS® ECO n'a pas été modifiée. La méthode de référence a changé (validation antérieure selon la méthode BAM 8^{ème} édition) et le protocole de validation a changé pour prendre en compte la norme EN ISO 16140. Lors de la reconduction en 2004, les résultats antérieurs (étude 2000) relatifs aux études de praticabilité, de spécificité, et à l'étude collaborative ont été conservés.

L'étude préliminaire d'extension réalisée en mai 2007, selon la norme EN ISO 16140 a porté sur l'intégration du protocole spécifique aux viandes crues de bœuf.

Une nouvelle étude interlaboratoire a été conduite en janvier 2008, pour prendre en compte la norme EN ISO 16140.

En mai 2008, puis en mai 2012, la validation de la méthode VIDAS® ECO a été reconduite, sans réalisation d'essais complémentaires, puisque ni la méthode VIDAS® ECO, ni la méthode prise en référence, ni le protocole de validation n'ont été modifiés.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative (études 2004 et 2007)

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

Essais « protocole général » (2004)

Des essais ont été effectués sur 324 échantillons de produits dont 150 artificiellement contaminés et 174 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

- produits carnés
- produits laitiers
- produits végétaux
- produits de la pêche
- divers (pâtisseries, œufs et dérivés, plats cuisinés)

Tous les échantillons ont été analysés en simple par la méthode de référence et par la méthode alternative (mise en œuvre du protocole général).

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) = 143 ⁽¹⁾	Déviation positive A+ / R- (PD) = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviation négative A- / R+ (ND) = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- (NA) = 174 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

Essais « protocole spécifique viandes crues de bœuf » (2007)

Des essais ont été effectués sur 65 échantillons de produits dont 33 artificiellement contaminés et 32 non contaminés, appartenant à la grande catégorie d'aliments suivante :

- viandes crues de bœuf

Tous les échantillons ont été analysés en simple par la méthode de référence et par la méthode alternative (mise en œuvre du protocole viandes crues de bœuf).

Tableaux de résultats (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140) :

1) Incubation de l'eau peptonée tamponnée pendant 8 heures à 41,5°C ± 1°C :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ (PA) = 24 ⁽¹⁾	Déviation positive A+ / R- (PD) = 5 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviation négative A- / R+ (ND) = 2 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- (NA) = 34 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

2) Incubation de l'eau peptonée tamponnée pendant 24 heures à 41,5°C ± 1°C :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ (PA) = 24 ⁽¹⁾	Déviation positive A+ / R- (PD) = 7 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviation négative A- / R+ (ND) = 2 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- (NA) = 32 ⁽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 :

Protocole général	Protocole viandes crues de bœuf	
	Incubation 8 heures	Incubation 24 heures
Exactitude relative	97,8 %	89,2 %
Spécificité relative	98,9 %	87,2 %
Sensibilité relative	96,6 %	92,3 %

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 général	96,7 %	98,7 %
Protocole viandes crues de bœuf Incubation 8 heures	93,6 %	83,9 %
Protocole viandes crues de bœuf Incubation 24 heures	93,9 %	78,8 %

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

Pour le protocole général :

$$PD = 2, ND = 5, Y = PD + ND = 7$$

$$6 \leq Y \leq 22, m = 2, M = 0 \quad \text{donc } m > M$$

Pour le protocole viandes crues de bœuf avec incubation 8 heures :

$$PD = 5, ND = 2, Y = PD + ND = 7$$

$$6 \leq Y \leq 22, m = 2, M = 0 \quad \text{donc } m > M$$

Pour le protocole viandes crues de bœuf avec incubation 24 heures :

$$PD = 7, ND = 2, Y = PD + ND = 9$$

$$6 \leq Y \leq 22, m = 2, M = 1 \quad \text{donc } m > M$$

Conclusion

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

NIVEAU DE DETECTION RELATIF (études 2004 et 2007)

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

Essais « protocole général » (2004)

Des essais ont été effectués en 2004 sur les 5 combinaisons « produit alimentaire/souche » décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits carnés, Produits laitiers, Produits végétaux, Produits de la pêche, Divers.

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination. Le protocole général de la méthode alternative a été mis en œuvre pour ces essais.

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
Viande hachée de bœuf	<i>E.coli</i> O157	0,8 [0,4 – 1,6]	0,8 [0,4 – 1,6]
Lait cru	<i>E.coli</i> O157	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,9]
Chou rouge cru	<i>E.coli</i> O157	0,8 [0,4 – 1,5]	0,8 [0,4 – 1,5]
Filet de cabillaud cru	<i>E.coli</i> O157	0,8 [0,6 – 1,3]	1,0 [0,8 – 1,2]
Crème pâtissière	<i>E.coli</i> O157	1,1 [0,6 – 2,2]	1,1 [0,6 – 2,2]

(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.*

Essais « protocole spécifique viandes crues de bœuf » (2007)

Des essais ont été effectués en 2007 sur de la viande crue de bœuf, avec les combinaisons « produit alimentaire/souche » décrites dans le tableau ci-dessous.

Le produit a été analysé **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination. Le protocole spécifique viandes crues de bœuf de la méthode alternative a été mis en œuvre pour ces essais.

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
Viande hachée de bœuf (incubation 8 heures)	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,9 [0,4 – 2,2]	0,5 [0,3 – 0,9]
Viande hachée de bœuf (incubation 24 heures)	<i>E.coli</i> O157 :H7	0,5 [0,3 – 1,0]	0,5 [0,3 – 0,9]

(3) LOD₅₀ : Cf. tableau ci-dessus.

Conclusion général pour le niveau de détection relatif

Les limites de détection de la méthode alternative et de la méthode de référence sont comprises entre les valeurs suivantes :

	Méthode alternative (cellules par 25 grammes)	Méthode de référence (cellules par 25 grammes)
Protocole général	0,3 et 2,2	0,3 et 2,2
Protocole viandes crues de bœuf Incubation 8 heures	0,4 et 2,2	0,3 et 0,9
Protocole viandes crues de bœuf Incubation 24 heures	0,3 et 1,0	

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE (étude 2000 et compléments en 2004)

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 20 souches d'*E.coli* O 157 ont été détectées sur 20 testées.
- L'étude de 40 souches non *E. coli* O 157 (dont 20 souches de *E.coli*) n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

Une étude complémentaire d'inclusivité a été menée en 2004 sur 30 souches cibles et toutes les souches testées ont été détectées par le test VIDAS® ECO et retrouvées après VIDAS® ICE et après isolement direct du bouillon CT-MAC.

PRATICABILITE (étude 2000 et compléments 2007)

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- Protocole général : l'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 jours avec la méthode alternative contre 4 à 5 jours avec la méthode de référence.
Protocole viandes crues de bœuf : l'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 à 3 jours avec la méthode alternative contre 4 à 5 jours avec la méthode de référence.
- Protocole général : l'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 4 jours avec la méthode de référence.
Protocole viandes crues de bœuf : l'obtention des résultats **négatifs** se fait le même jour ou en 1 jour avec la méthode alternative contre 4 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 3 jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons d'épinard, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *E.coli* O157 aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau 1 : 6,4 UFC/25g
- niveau 2 : 46 UFC/25g

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	104	96	96	85	96	11	0
1	104	96	96	0	0	96	96
2	104	96	96	0	0	96	96

*Les résultats d'un laboratoire ont été exclus car il n'a pas réalisé les analyses.

Calculs

- L'exactitude relative est de 96,2%
- 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.

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 :	Méthode de référence :
(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 94,6%	(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100%

Il est néanmoins à noter que les déviations négatives sont liées à des intercontaminations de la méthode de référence sur des échantillons non contaminés, et non à des échantillons non détectés par la méthode alternative.

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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,0
L1	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	87,8%	79%	1,1
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est plus faible que 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