

Contacts :

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

Jérôme FAYOL
Chargé de clientèle
jerome.fayol@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 60 63

Réf.: SSO/JFY/NF102/Clients/BIO-RAD/
Avis BT_iQ-Check Cronobacter spp_2017-01-27_(R1)

Objet : Marque NF VALIDATION

BIO-RAD
Monsieur Yannick BICHOT
3, Boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE

La Plaine Saint-Denis, le 27 janvier 2017

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 27 janvier 2017 par le Bureau Technique "Microbiologie agroalimentaire" de la marque NF VALIDATION (NF102), j'ai l'honneur de vous annoncer que le **droit d'usage de la marque NF VALIDATION est reconduit** pour la méthode d'analyse suivante :

iQ-Check® Cronobacter spp.

Certifiée sous le certificat N° BRD 07/23-01/13, avec pour fin de validité le 31-janvier-2021

La méthode alternative est validée pour la détection des *Cronobacter* spp. dans les poudres de lait infantile et les échantillons de l'environnement de production, par comparaison à la méthode de référence ISO/TS 22964 (2006) et selon le protocole de validation NF EN ISO 16140-2 (2016).

Un courrier complet de conclusions mentionnant d'éventuelles réserves prononcées par le Bureau Technique, vous sera prochainement adressé. Le cas échéant, celles-ci devront être prises en compte sans délai.

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


Directeur Général
Franck LEBEUGLE





**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 07/23 – 01/13

Date de validation : 31.01.2013

Fin de validité : 31.01.2017

La société **Bio-Rad**
3, Boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE
FRANCE

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

iQ-Check™ Cronobacter spp (Réf. 357-8137)

Référence du protocole : 808473 – Rev. C

DOMAINE D'APPLICATION

Poudres de lait infantile et prélèvement d'environnement.

RESTRICTIONS

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

ISO/TS 22964 (Février 2006) : Lait et produits laitiers – Détection de *Enterobacter sakazakii*.

Directrice Générale
Florence MÉAUX

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode iQ-Check *Cronobacter spp*, basée sur l'amplification génique et la détection par la technique de PCR en temps réel, permet la recherche de *Cronobacter spp* (anciennement *Enterobacter sakazakii*). Les oligonucléotides utilisés, amorces et sonde fluorescente, sont spécifiques. Après les étapes d'enrichissement microbiologique et de lyse bactérienne, l'amplification et la détection ont lieu dans un thermocycleur temps-réel. Le logiciel associé à l'instrument analyse et interprète les données qui sont visualisées sous forme de courbes et de rapport.

La trousse iQ-Check *Cronobacter spp* contient :

- Le réactif de lyse pour l'extraction d'ADN
- Les réactifs d'amplification et de détection, dont un contrôle interne d'amplification
- Les contrôles positif et négatif

Dans le cadre de la marque NF 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 à partir des colonies (en incluant l'étape de purification)
- Par isolement de la subculture en eau peptonée tamponnée sur gélose RAPID'*Sakazakii* pour les produits laitiers, et par isolement d'une subculture en mLST sur gélose RAPID'*Sakazakii* pour les échantillons de l'environnement.

En cas de résultats discordants (positif présomptif par la méthode alternative, non confirmé par les options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre 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 2012 sur 171 échantillons de produits alimentaires dont 7 naturellement contaminés, 69 artificiellement contaminés et 95 non contaminés, appartenant à la catégorie d'aliments suivante :

- Poudres de lait infantile
- Echantillons de l'environnement

Tous les échantillons ont été analysés en simple par les deux méthodes. Les essais avec la méthode alternative ont été réalisés en utilisant les protocoles d'extraction « standard » et « simplifié ».

Les résultats sont présentés ci-après pour chacun des protocoles de la méthode alternative testés.

Tableau de résultats pour le « protocole standard » (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 = 71 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 3 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 95 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 5 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Tableau de résultats pour le « protocole simplifié » (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 = 70 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 95 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 4 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

	Protocole standard	Protocole simplifié
Exactitude relative : AC (%)	97,1 %	96,5 %
Spécificité relative : SP (%)	97,9 %	97,9 %
Sensibilité relative : SE (%)	95,9 %	94,6 %

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 standard	96,1 %	97,4 %
Protocole simplifié	94,7 %	97,4 %

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

		Conclusion
Protocole standard	PD = 2, ND = 3, Y = PD + ND = 5 ; Y < 6	Aucun test statistique disponible
Protocole simplifié	PD = 2, ND = 4, Y = PD + ND = 6 ; 6 ≤ Y ≤ 22 ; m = 2 et M = 0; donc m > M	Les 2 méthodes ne sont pas différentes à α = 0,05

Conclusion

Les performances de la méthode alternative sont équivalentes à celles de la méthode de référence, quel que soit le protocole d'extraction de la méthode IQ-Check *Cronobacter* spp utilisé.

Essais de conservation des bouillons d'enrichissement à 2-8°C pendant 48 heures

Tous les bouillons d'enrichissement pour lesquels des résultats positifs ont été obtenus ont été conservés à 2-8°C pendant 48 heures, en vue de valider la possibilité de différer l'étape de détection.

Les changements suivants de résultats ont été observés après stockage au froid positif des bouillons d'enrichissement :

- Avec le protocole standard d'extraction : 1 échantillon positif concordant est devenu négatif discordant et 1 échantillon négatif discordant est devenu positif concordant.
- Avec le protocole simplifié d'extraction : 3 échantillons positifs concordants sont devenus négatifs discordants.

L'analyse statistique a conclu que le stockage au froid des bouillons d'enrichissement n'avait pas d'impact significatif sur le rendu de résultats. L'analyse des échantillons d'environnement avec le protocole de lyse simplifiée après conservation est néanmoins exclue.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2012, sur les combinaisons « produit alimentaire/souche » décrites dans le tableau ci-dessous.

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 ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/30 g ou 30 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Poudre de lait infantile	<i>Cronobacter sakazakii</i> Ad 940	0,8 [0,5 – 1,6]	1,1 [1,1 – 1,1]
Eau de process	<i>Cronobacter turicensis</i> Ad 1445	0,8 [0,5 – 1,5]	0,8 [0,5 – 1,5]

(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 0,5 et 1,6 UFC/30 g.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,5 et 1,5 UFC/30 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 52 souches de *Cronobacter* ont été détectées sur 52 testées.
- L'étude de 31 souches n'appartenant pas au genre *Cronobacter* 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 2 à 3 jours avec la méthode alternative contre 6 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 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 2 à 3 jours.
- **Formation du personnel :** Une attention particulière doit être apportée par les opérateurs lors des manipulations impliquant l'usage de micropipettes du fait des risques de contaminations croisées associés.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2012 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait infantile probiotique contenant des *Lactobacillus reuteri*, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Cronobacter sakazakii* Ad 940 aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/30 g
- 1 à 10 UFC/30 g
- 5 à 50 UFC/30 g

Les laboratoires ont testé, par les deux méthodes, 8 réplicats pour chaque niveau de contamination, soient 48 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	104	104	95	96	9	8
1*	104	104	104	50	47	54	57
2	104	104	104	0	1	104	103

* Le taux d'inoculation faible des échantillons (0,8 UFC/30 g) a pour but de générer un recouvrement partiel de la souche inoculée, avec de ce fait, des échantillons positifs et négatifs. De plus, les 2 enrichissements des 2 méthodes sont indépendants : les échantillons sont donc non appariés.

Calculs

- L'exactitude relative est de 79,8 %
- La sensibilité est de 92,3 %
- La spécificité est de 76,9 %

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire sont inférieurs à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire du fait du faible taux d'inoculation au niveau 1, ainsi que de la survenue, dans certains laboratoires participants, de contaminations croisées pour les deux méthodes. Les performances de la méthode alternative et de la méthode de référence sont comparables.

La **sensibilité** a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

$$\text{Méthode alternative :} \\ (PA + PD) / (PA + PD + ND) = 85,5 \%$$

$$\text{Méthode de référence :} \\ (PA + ND) / (PA + PD + ND) = 83,0 \%$$

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	94,2 %	85,1 %	2,86
L1	56,0 %	50,0 %	1,27
L2	98,3 %	98,1 %	1,15

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	88,7 %	83,8 %	1,52
L1	58,2 %	49,4 %	1,42
L2	100,0 %	100,0 %	1,00

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