



**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 : SYL - 30/01 – 12/07

Date de validation : 04.12.2007

Fin de validité : 04.12.2011

La Société SY-LAB Geräte GmbH.
(siège social et Tullnerbachsrasse 61-65
site de A-3011 NEUPURKERSDORF
production)

Distributeur

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

**BacTrac 4300
Détection des entérobactéries**

Référence du protocole : V2.14.2 version 1.0

DOMAINE D'APPLICATION

Produits laitiers à l'exclusion du lait cru

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 21528-1 : Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* (2004)

**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

La méthode BacTrac 4300 est une méthode automatisée, basée sur le principe de l'impédancemétrie, et qui permet la détection des entérobactéries dans les produits laitiers.

Lors de l'enrichissement en milieu sélectif, la croissance des germes cibles augmente la charge ionique, changeant ainsi le comportement électrique (résistance) du milieu. La détection électrique des métabolites microbiens est effectuée pendant la croissance en milieu liquide. Les changements électriques sont enregistrés en temps réel par le système qui donne des courbes de croissance et les temps de détection.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode BacTrac doivent être confirmés à partir du bouillon d'enrichissement BiMedia 144A. Des isollements doivent être effectués sur gélose VRBG et, en présence de colonies caractéristiques, les tests de confirmation sont réalisés selon la méthode de référence.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits dans la méthode normalisée), 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 2007 sur 64 échantillons de produits dont 26 naturellement contaminés, 6 artificiellement contaminés et 32 non contaminés, appartenant à la catégorie produits laitiers, à l'exclusion du lait cru.

Les types suivants d'échantillons ont été testés : poudre de lait infantile, lait pasteurisé, glace, fromages à base de lait traité thermiquement.

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

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 = 30 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 32 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

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

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

- Exactitude relative : **AC = 97%**

- Spécificité relative : **SP = 97%**

Note : une **spécificité relative** inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs

- Sensibilité relative : **SE = 97%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 97\%$$

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

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 2 combinaisons produits alimentaires/souches 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 :

		Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Lait frais pasteurisé	<i>Escherichia coli</i>	0,3 [0,2 – 0,5] (UFC/1mL)	0,4 [0,3 – 0,7] (UFC/1mL)
Poudre de lait pour nourrissons	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,7 [0,4 – 1,3] (UFC/10g)	0,6 [0,4 – 1,1] (UFC/10g)

(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 Used 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

Pour les matrices liquides :

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,2 et 0,5. UFC/1mL.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,3 et 0,7 UFC/1mL.

Pour les matrices solides :

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,4 et 1,3. UFC/10g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,4 et 1,1 UFC/10g..

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 57 souches du genre *Enterobacteriaceae* ont été détectées sur 57 testées.
- Parmi les 31 souches n'appartenant pas au genre *Enterobacteriaceae*, 21 souches ont développé une courbe de croissance.
Parmi ces 21 souches, 13 ont donné des résultats négatifs en raison d'un profil atypique.
Parmi les 8 souches ayant donné une courbe de croissance typique, 3 souches ne se sont pas développées sur gélose VRBG (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus Faecium*, *Enterococcus hirae*) et 5 souches se sont développées sur VRBG mais ont conduit à des tests de confirmation négatifs (ce sont 5 souches du genre *Pseudomonas*)

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Echantillons liquides :

- L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 4 jours avec la méthode alternative (en incluant la confirmation biochimique après purification) 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 4 à 5 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 à 4 jours

Echantillons solides :

- L'obtention des résultats **positifs** se fait en 4 à 5 jours quelle que soit la méthode (en incluant la confirmation biochimique après purification).
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 4 à 5 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 à 5 jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *E. coli* aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif (30 cellules/10mL)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (300 cellules/10mL)

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	78	2	2
1	112	96	80	0	2	80	78
2	112	96	80	0	0	80	80

* 2 laboratoires ont reçu les échantillons après la date limite fixée, ils n'ont pas réalisé les analyses

** 2 laboratoires ont rencontré des problèmes de manipulation et/ou d'intercontamination. Leurs résultats n'ont pas été exploités.

Calculs

- L'exactitude relative est de 98%
- La spécificité est de 97%
- La sensibilité est de 98%

Note : une **spécificité relative** inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs

Interprétation

Les résultats de l'étude collaborative 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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,6\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,8\%$$

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	96	95	1,26
L1	96	95	1,26
L2	100	100	1

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

Niveau de contamination	Degré d'accord (%)	Concordance (%)	COR
L0	96	95	1,26
L1	100	100	1
L2	100	100	1

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 AFAQ AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition
un document de synthèse des études préliminaire et collaborative