



Quelles garanties peuvent être apportées par le pooling des échantillons ?

J. CROCIANI SteakExpert le 11 juin 2013



Quelles garanties peuvent être apportées par le pooling des échantillons ?

- **Intérêt du pooling**
- **Garanties nécessaires**
- **Exemple sur E coli STEC**



Absence de pathogène?

Plan de contrôle BAM / FDA pour Salmonella

- I = 60 x 25g = 4 x 375g =
95% confiance < 1 *Salmonella*/500g
- II = 30 x 25g = 2 x 375g =
95% confiance < 1 *Salmonella*/250g
- III = 15 x 25g = 1 x 375g =
95% confiance < 1 *Salmonella*/125g

•Cas ICMSF 13-15



Probabilité d'accepter un lot

Composition of Lot		Number of sample units tested				
% acceptable	% defective	5	10	20	60	100
98	2	.90	.82	.67	.30	.13
95	5	.77	.60	.36	.05	.01
90	10	.59	.35	.12	<	<
80	20	.17	.11	.01		
70	30	.03	.03	<		
50	50	.01	<			
40	60	<				
30	70					

•ICMSF, 1986. *Microorganisms in Foods, Sampling for microbiological analysis: Principles and applications*, University of Toronto Press, Toronto.



Quelles garanties peuvent être apportées par le pooling des échantillons ?

- Intérêt du pooling
- **Garanties nécessaires**
- Exemple sur E coli STEC



Le pooling

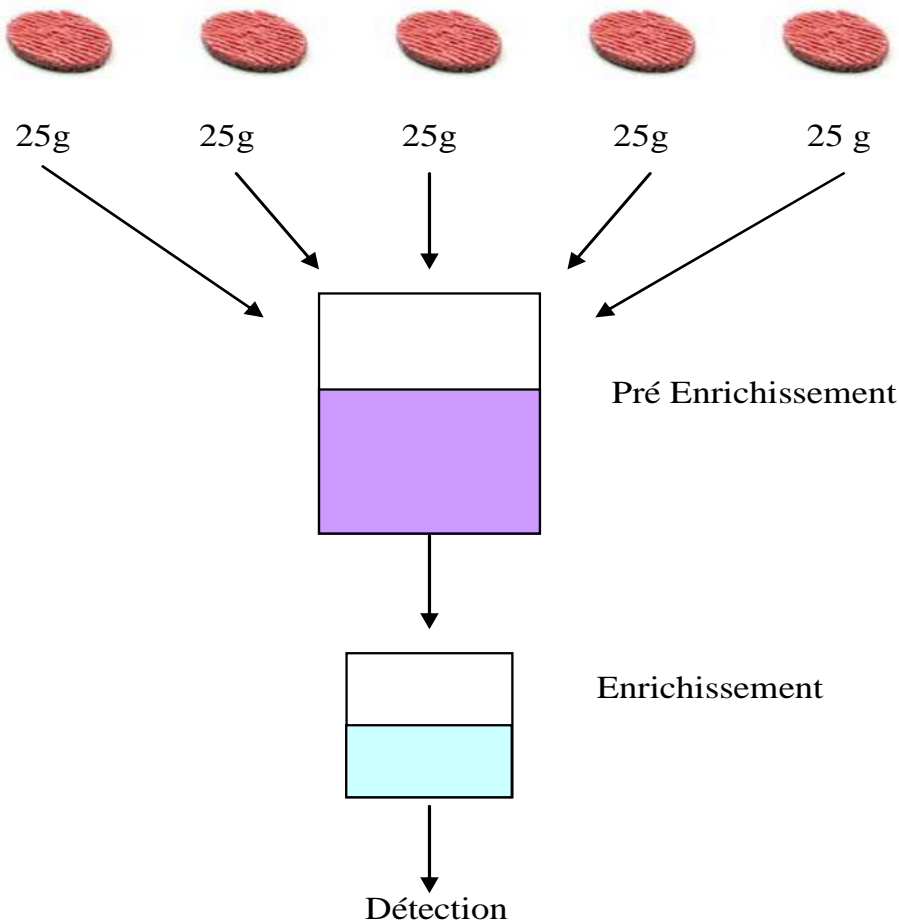


Il existe 2 techniques de pooling distinctes:

- ✓ Le **dry pooling**: échantillon mélangé d'un certain nombre de produits d'un même type d'aliment où le mélange complet constitue la prise d'essai et est utilisé en entier pour l'analyse
- ✓ Le **wet pooling**: prises d'essai individuellement pré-enrichies d'un certain nombre de produits d'un même type d'aliment, à partir desquelles des volumes spécifiques sont mélangés et sont utilisés pour l'étape d'enrichissement sélectif

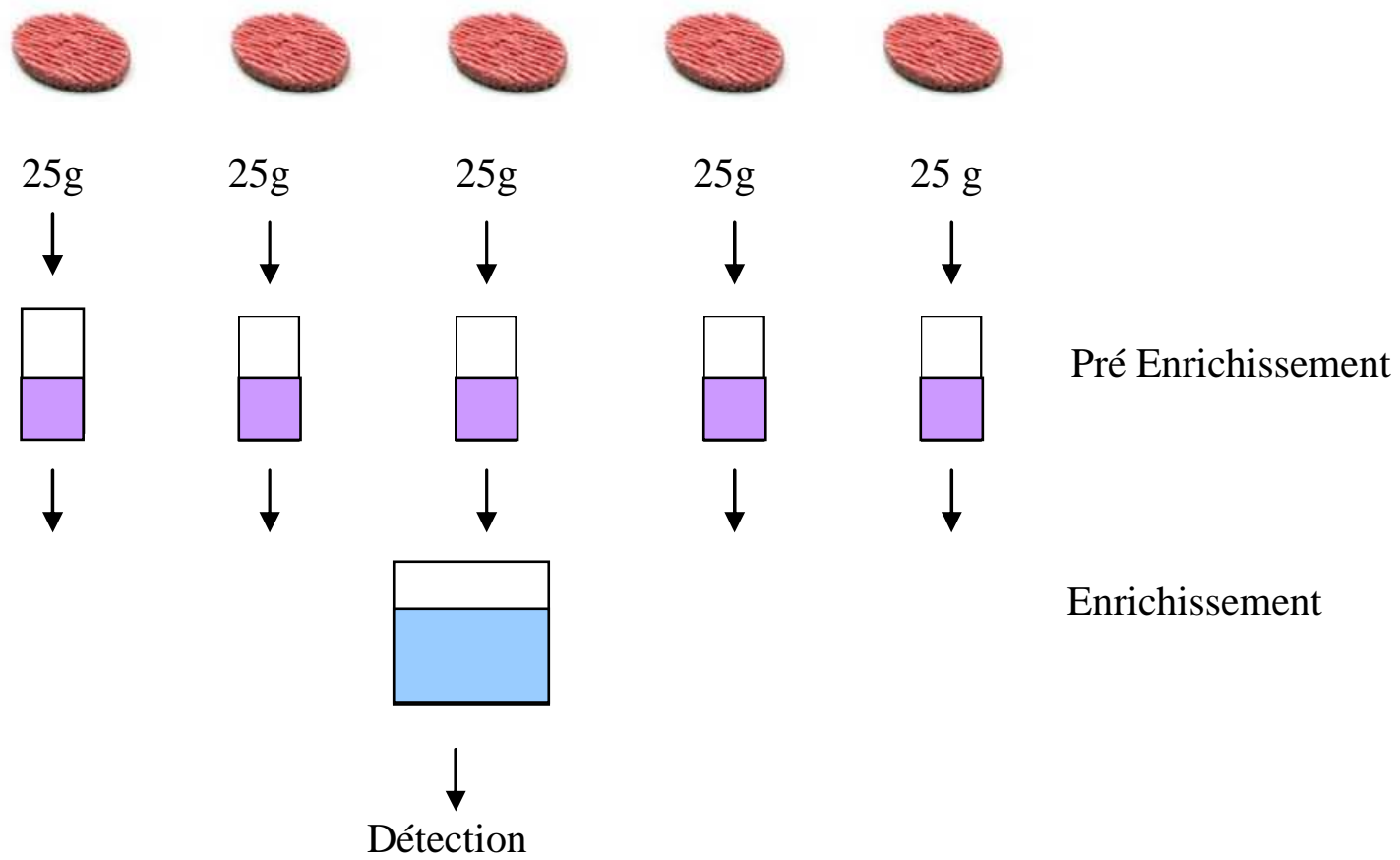


Dry Pooling





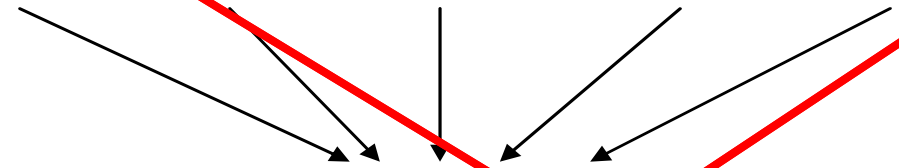
Wet Pooling



03/07/2013

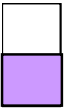


Echantillon Composite



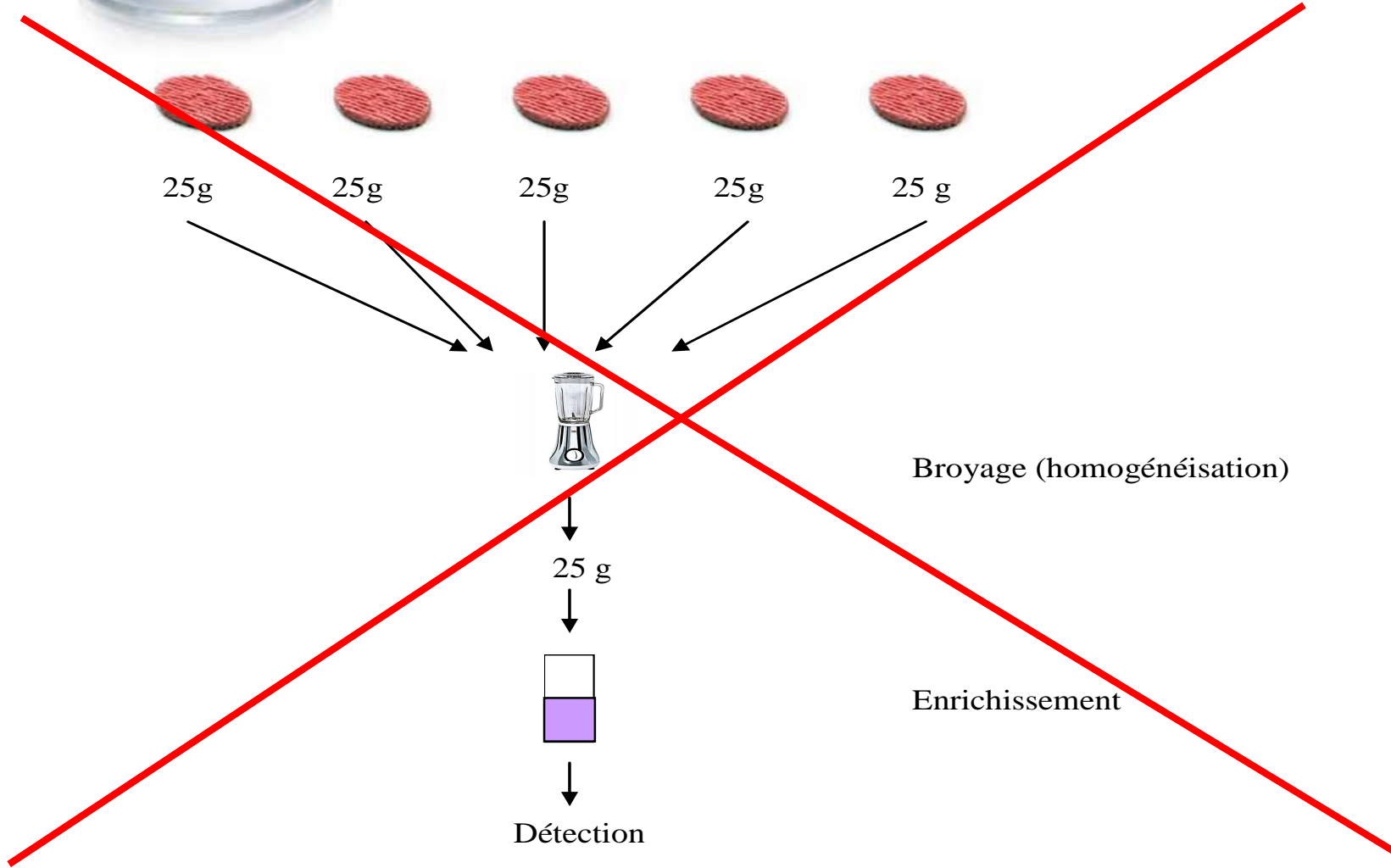
Broyage (homogénéisation)

25 g



Enrichissement

Détection



03/07/2013



Quelles techniques choisir ?

- **Enjeux: Maintenir lors de la stratégie de pooling le même niveau de détection que celui de la méthode de référence sur prise d'essai unitaire afin de ne pas générer de faux négatifs (positifs non détectés)**

- **La limite de détection dépend:**
 - Du Nombre d'échantillons poolés
 - De la taille des échantillons
 - De la sensibilité et de la spécificité de la méthode (de ces facteurs va dépendre le taux de micro-organisme nécessaires pour s'assurer de la détection)

- **Le niveau de détection sera tributaire de la multiplication de l'organisme cible dans le bouillon d'enrichissement qui dépend**
 - Du niveau de contamination initiale en micro-organisme cible et en flore de compétition
 - De l'état initial des souches présentes
 - De la cinétique de croissance de l'ensemble de ces micro-organismes dans les conditions d'enrichissement définies



Criticité de l'étape d'enrichissement

→ Dans un préenrichissement, la croissance du micro-organisme cible doit atteindre un niveau critique permettant de s'assurer que ce microorganisme sera transféré dans l'enrichissement avec une probabilité quasi certaine (au moins 99,9 %)

concentration moyenne en germe cible par ml de préenrichissement	Probabilité que 1 ml d'inoculum contienne (%)	
	0 micro-organisme	1 ou plus de microorganisme
1	36,8	63,2
2	13,5	86,5
3	5	95
4	1,8	98,2
5	0,6	99,4
7	0,1	99,9
10	<0,1	>99,9
20	<<0,1	>>99,9



Mise en place du pooling = Validation

- La mise en place de technique de pooling s'appuie obligatoirement sur une validation préalable pour déterminer la sensibilité de la méthode afin de s'assurer que si la méthode détecte un nombre défini du micro organisme cible pour X g de prise d'essai alors elle doit détecter ce même nombre défini pour n fois X g de prise d'essai
- Des stratégies de validation sont indiquées dans le projet de notre ISO portant sur le pooling des échantillons



Choix de la technique de pooling

→ **Reconnaissance:** Le LAB GTA 59 (guide technique pour l'accréditation des laboratoires) attire l'attention sur le dry pooling car risque de baisser la limite de détection de l'organisme cible: effet de dilution ou effet de compétition par la flore annexe

→ **Praticabilité:** Quelle technique s'adapte le mieux à l'organisation en place au laboratoire ?

→ **Gestion des positifs**

- **Dry pooling:** si un pool est positif, nécessité de relancer des analyses sur les échantillons unitaires en repartant de prises d'essai de 25 g sur les échantillons constituant le pool



Hétérogénéité de la contamination au niveau de l'échantillon unitaire

- **Wet pooling:** si un pool est positif, relance des échantillons en repartant de l'enrichissement conservé

03/07/2013



Choix dans le nombre d'échantillons poolés

→ Le nombre d'échantillons poolés doit être fonction

- Du niveau de détection de la technique employée
- Du taux de prévalence de contamination de la matrice ou du taux de résultats positifs ou en suspicion

– Exemple: prévalence screening stx/eae sur bouillon d'enrichissement de **2,5 %**

- Si $n=5$: 1 pool sur 8 sera positif et devra être relancé en analyse unitaire
- Si $n=10$, 1 pool sur 4 sera positif et devra être relancé en analyse unitaire
- Si $n=15$, 1 pool sur 3 sera positif et devra être relancé en analyse unitaire



Quelles garanties peuvent être apportées par le pooling des échantillons ?

- Intérêt du pooling
- Garanties nécessaires
- **2 cas sur E coli O157 et E coli STEC**



Cas 1: Evaluation 4 méthodes pour detection de E. coli O157:H7

- **Comparaison des résultats 75, 125 et 375g avec les resultats 25g**
- **Resultats**
 - Method A: 125 g OK apres 8 h incubation
 - Method B: 75 g OK after 12 h incubation
 - Method C: Aucun resultats satisfaisant
 - Method D: 75 g OK après 16 h incubation
- **Conclusion: Nécessité de validation pour chaque méthode**



Conclusions

- La stratégie de pooling est intéressante pour respecter des échantillonnages performants nécessitant des mises en analyses de quantité croissantes de produit 75, 125 voir 375 g
- Le pooling peut être réalisé par la méthode du « wet pooling » ou du « dry pooling », les deux systèmes ayant chacun des limites
- Le pooling nécessite une étape de validation pour garantir un maintien de la sensibilité de la méthode initiale validée dans 25g
- La performance dépend de la méthode, de la matrice et de la flore de compétition
- Les stratégies de pooling doivent respecter l'homogénéité produit (lot identique) du fait des flores de compétition variables
- Les stratégies de pooling peuvent être adaptées en fonction des prévalences attendues



MERCI DE VOTRE ATTENTION

QUESTIONS ?