afnor CERTIFICATION

Contacts:

Stéphanie SAMMARTANO
Ingénieure certification
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/Life Technologies/
Avis BT_MicroSEQ E. coli O157 : H7_2015-02-06_R1

Objet : Marque NF VALIDATION

Life Technologies Corporation
Thermo Fisher Scientific
Monsieur Ravi Ramadhar
2130 Woodward Street
Austin, TX 78744
Etats-Unis

La Plaine Saint-Denis, le 17 février 2015

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 6 février 2015 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 :

MicroSEQ *E.coli* O157 : H7

Certifiée sous le n° d'attestation ABI 29/03 – 03/11, avec pour fin de validité le 24-Mars-2019

La méthode alternative est validée pour la détection des *Escherichia coli* O157 :H7 dans les viandes crues de bœuf et les végétaux crus, par comparaison à la méthode de référence NF EN ISO 16654 :2001 et selon le protocole NF EN ISO 16140 :2003.

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

afaq AFNOR CERTIFICATION

NF

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 : ABI 29/03 – 03/11

Date de validation :	**24.03.2011**
Fin de validité :	**24.03.2015**

La société **Life Technologies Corporation**
5791 Van Allen Way
Carlsbad, CA 92008-7321, USA

Site de production **Life Technologies**
7 Kingsland Grange
Woolston, Birchwood
Warrington, WA1 4SR, UK

Représentée par **Life Technologies SAS**
Route de l'Orme des Merisiers
Immeuble Le Discovery - Parc Technologique
91190 Saint Aubin, France

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

MicroSEQ® *E.coli* O157 : H7

Références des protocoles :

- MicroSEQ® *E. coli* O157:H7 Detection Kit : 4484069 **Rev. A**
- PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit for Food Testing: *E. coli* O157:H7 : 4484067 **Rev. A**
- PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kits for Food Testing: *E. coli* O157:H7 : 4484070 **Rev. A**

DOMAINE D'APPLICATION

Viandes crues de bœuf et végétaux crus.

RESTRICTIONS

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

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

Directeur Général
Franck LEBEUGLE

cofrac
CERTIFICATION DE PRODUITS ET SERVICES
ACCRÉDITATION N° 5-0030 PORTÉE DISPONIBLE SUR WWW.COFRAC.FR

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode MicroSEQ® *E.coli* O157 :H7 permet la détection rapide des *E.coli* O157 :H7. Le test automatisé repose sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel qui permet d'amplifier l'ADN spécifique de *E.coli* O157 :H7 et l'utilisation de sondes TaqMan® qui permettent de détecter la séquence cible amplifiée.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode MicroSEQ® *E.coli* O157 :H7 doivent être confirmés à partir du bouillon d'enrichissement (Eau peptonée tamponnée ou BHI pré-chauffé selon le protocole mis en œuvre) 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)
- Par réalisation d'un isolement sur gélose CT-SMAC ou toute autre gélose sélective de *E.coli* O157 :H7. Poursuivre par les tests Latex O157 et H7 sur colonies caractéristiques.

  Note : En cas de tests Latex négatifs, réaliser une IMS préalable avant isolement de 50 µL sur gélose sélective.

  (*) Alerte concernant les confirmations : cf. page 3 de la présente attestation.
- Utilisation de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode MicroSEQ® *E.coli* O157 :H7. 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 présomptif par la méthode alternative, non confirmé par l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE : Le champ d'application inclut l'utilisation du thermocycleur Applied Biosystems 7500 Fast associé au logiciel RapidFinder™ Express.

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 2010 sur des échantillons appartenant aux deux catégories d'aliments suivantes « Viandes crues de bœuf (fraîches, surgelées, assaisonnées ou pas) » et « Végétaux crus (frais, surgelés, sous atmosphère modifiée) ».

Les protocoles d'enrichissement A (Incubation de 6 h en bouillon BHI pré-chauffé) et B (Incubation de 16 h en EPT) avec prises d'essai de 25 g ont été testés en les combinant aux protocoles d'extraction Rapid Spin (manuel) et MagMAX (automatisé) :

- 131 échantillons de produits ont été analysés avec le **protocole d'enrichissement A**, dont 3 étaient naturellement contaminés, 57 étaient artificiellement contaminés et 71 non contaminés pour le protocole d'extraction Rapid Spin, et 59 artificiellement contaminés et 69 non contaminés pour le protocole d'extraction MagMAX
- 129 échantillons de produits ont été analysés avec le **protocole d'enrichissement B**, dont 4 étaient naturellement contaminés, 58 artificiellement contaminés et 67 non contaminés pour les deux protocoles d'extraction Rapid Spin et MagMAX

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par la **méthode de référence** et par la **méthode alternative** (pour laquelle les 4 combinaisons ont été testées).

Enrichissement A - Incubation de 6 h en bouillon BHI pré-chauffé

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

Extraction	Rapid Spin		MagMAX	
Réponses	**Méthode de référence positive (R+)**	**Méthode de référence négative (R-)**	**Méthode de référence positive (R+)**	**Méthode de référence négative (R-)**
Méthode alternative positive (A+)	PA = **28** (1)	PD = **24** (1)	PA = **30** (1)	PD = **26** (1)
Méthode alternative négative (A-)	ND = **8** (2)	NA = **71** (3)	ND = **6** (2')	NA = **69** (3')

PA : Accord positif A+/R+ ; **PD** : Déviation positive A+/R-
ND : Déviation négative A-/R+ ; **NA** : Accord négatif A-/R-

(1) il s'agit de positifs confirmés
(2) (3) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation
(2') dont 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation
(3') dont 2 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Enrichissement B - Incubation de 16 h en EPT

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

Extraction	Rapid Spin		MagMAX	
Réponses	**Méthode de référence positive (R+)**	**Méthode de référence négative (R-)**	**Méthode de référence positive (R+)**	**Méthode de référence négative (R-)**
Méthode alternative positive (A+)	PA = **33** (1)	PD = **28** (1)	PA = **33** (1)	PD = **28** (1)
Méthode alternative négative (A-)	ND = **1** (2)	NA = **67** (3)	ND = **1** (2)	NA = **67** (3)

PA : Accord positif A+/R+ ; **PD** : Déviation positive A+/R-
ND : Déviation négative A-/R+ ; **NA** : Accord négatif A-/R-

(1) il s'agit de positifs confirmés
(2) (3) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(*) *Avertissement concernant la confirmation des résultats positifs : Durant l'étude de validation, dans le cas du protocole d'enrichissement B (Incubation 16 h en EPT) appliqué pour analyser des viandes crues de bœuf, 87 % des échantillons positifs ont été confirmés par isolement direct sur gélose CT SMAC, 45 % par isolement direct sur ChromID, 100 % par réalisation d'une IMS avant isolement sur CT SMAC et 93,5 % par réalisation d'une IMS avant isolement sur ChromID.*

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

	Enrichissement **A**		Enrichissement **B**	
Extraction	**Rapid Spin**	**MagMAX**	**Rapid Spin**	**MagMAX**
Exactitude relative : **AC** (%)	75,6	75,6	77,5	77,5
Spécificité relative : **SP** (%)	74,7	72,6	70,5	70,5
Sensibilité relative : **SE** (%)	77,8	83,3	97,1	97,1

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) :

Enrichissement	Extraction	Méthode alternative (PA + PD) / (PA + PD + ND) =	Méthode de référence (PA + ND) / (PA + PD + ND) =
A	**Rapid Spin**	86,7%	60,0%
	MagMAX	90,3%	58,1%
B	**Rapid Spin**	98,4%	54,8%
	MagMAX	98,4%	54,8%

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

Enrichissement	Extraction	PD + ND = Y	Test statistique (Mc Nemar)	Conclusion
A	**Rapid Spin**	24 + 8 = 32	Y > 22 ; d = 16 $x^2 = d^2/y = 8$	Non équivalent
	MagMAX	26 + 6 = 32	Y > 22 ; d = 20 $x^2 = d^2/y = 12,5$	Non équivalent
B	**Rapid Spin**	28 + 1 = 29	Y > 22 ; d = 27 $x^2 = d^2/y = 25,1$	Non équivalent
	MagMAX	28 + 1 = 29	Y > 22 ; d = 27 $x^2 = d^2/y = 25,1$	Non équivalent

Conclusion

La méthode alternative et la méthode de référence sont différentes en terme statistique du fait du nombre élevés de résultats positifs supplémentaires obtenus par la méthode alternative (rendus négatifs par la méthode de référence).

En conclusion, les tests démontrent que les performances de la méthode alternative sont supérieures à celle de la méthode de référence.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2010, sur les 2 combinaisons « produit alimentaire/souche » décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories d'aliments : « Viandes crues de bœuf (fraîches, surgelées, assaisonnées ou pas) » et « Végétaux crus (frais, surgelés, sous atmosphère modifiée) ».

Les protocoles d'enrichissement A (Incubation de 6 h en bouillon BHI pré-chauffé) et B (Incubation de 16 h en EPT) avec prises d'essai de 25 g ont été testés en les combinant systématiquement aux protocoles d'extraction Rapid Spin (manuel) et MagMAX (automatisé).

Les produits ont été analysés **6 fois,** par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination, pour chacun des protocoles testés.

Les résultats obtenus sont les suivants :

			Niveau de détection relatif LOD_{50} (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	**Souche**	**Enrichissement**	**Méthode alternative** Rapid Spin et MagMAX	**Méthode de référence**
Viande hachée surgelée	*E. coli* O157:H7 Ad 683	**A**	0,3 [0,1– 0,9]	0,8 [0,5 – 1,3]
		B	0,2 [0,1 – 0,7]	0,8 [0,5 – 1,3]
Epinard surgelé	*E. coli* O157:H7 Ad 557	**A**	0,3 [0,1 – 0,9]	0,3 [0,1 – 0,9]
		B	0,3 [0,1 – 0,8]	0,3 [0,1 – 0,9]

(3) **LOD_{50}** : 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 de référence est compris entre 0,1 et 1,3 UFC/25 g.
Le niveau de détection de la méthode alternative est compris entre 0,1 et 0,9 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE
Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches d'E.coli O157 :H7 ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 37 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 entre 2 jours (enrichissement A) à 3 jours (enrichissement B) avec la méthode alternative, contre 3 à 4 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait soit dans la journée (enrichissement A) soit en un jour (enrichissement B) avec la méthode alternative, contre un jour 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.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2011 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de viande hachée, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888 aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25 ml
- 5 UFC/25ml
- 25 UFC/25ml

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 24 analyses au total par laboratoire participant.

Pour la méthode alternative, le protocole d'enrichissement A (Incubation de 6 h en bouillon BHI pré-chauffé) associé au protocole d'extraction Rapid Spin (manuel) a été mis en œuvre.

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	112	96	96	96	0	0
1	112	112	96	1	1	95	95
2	112	112	96	0	0	96	96

** Les données de deux laboratoires n'ont pas été exploitées :*

- *Pour l'un, les résultats ont été exclus du fait d'intercontaminations et de l'absence de relevé de température d'incubation.*
- *Le deuxième a rencontré des difficultés pour confirmer les résultats positifs par les deux méthodes. Des tests complémentaires ont été mis en œuvre mais trop tardivement pour pouvoir récupérer des souches E.coli O157 :H7 du fait d'une forte flore interférente.*

Calculs

- L'exactitude relative est de 99,3%
- La spécificité est de 100%
- La sensibilité est de 99,5%

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

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 :
COR= degré d'accord x (100 – concordance) / concordance x (100 – degré d'accord)

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100,0 %	100,0 %	1,00
L1	98,2%	97,9%	1,15
L2	100,0%	100,0%	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100,0 %	100,0 %	1,00
L1	98,2%	97,9%	1,15
L2	100,0%	100,0%	1,00

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est identique 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 http://nf-validation.afnor.org