



**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 : AES 10/06 – 01/08

Date de validation : 17.01.2008

Fin de validité : 17.01.2012

La Société AES CHEMUNEX
(siège social) rue Maryse Bastié
 Ker Lann / CS 17219
 35172 BRUZ CEDEX

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

REBECCA™ BASE ou REBECCA™ + EB

Pour le débombrement des *E.coli* β -glucuronidase positive

Référence du protocole : 620020 : 17/01/08 - A

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE(S) DE REFERENCE

Norme EN ISO 16649-2 (2001) : méthode horizontale pour le dénombrement des *E.coli* β -D-glucuronidase positive – Partie 2 : technique par comptage des colonies à 44°C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -glucuronate.

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

REBECCA™ est un milieu chromogénique pour le dénombrement direct sans confirmation dans les produits d'alimentation humaine et animale des *E.coli* β-glucuronidase positive. Le dénombrement des *E.coli* se fait par la détection de la β-glucuronidase colorant les colonies en bleu avec ou sans halo bleu.

NOTE

L'étude de validation, faisant l'objet de la présente attestation, a été réalisée avec deux types d'ensemencement : l'ensemencement en masse et l'ensemencement en surface, chacun appliqué aux deux milieux REBECCA™ base et REBECCA™ + EB (supplément). L'étude préliminaire a été réalisée avec les milieux REBECCA™ base et REBECCA™ + EB et l'étude interlaboratoire, avec le milieu REBECCA™ + EB.

LINEARITE et EXACTITUDE relative

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

Etude de linéarité :

Des essais ont été effectués en 2007 sur les 5 combinaisons produit alimentaire/souche et dans les catégories d'aliments figurant dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons ont été analysés en double par chacune des deux méthodes, aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants :

- niveau 1 : 50 – 500 UFC/g
- niveau 2 : 100 – 1000 UFC/g
- niveau 3 : 500 – 5000 UFC/g
- niveau 4 : 1000 – 10 000 UFC/g
- niveau 5 : 10 000 – 100 000 UFC/g

Pour le milieu REBECCA™ base, les résultats obtenus sont les suivants :

- Avec l'ensemencement en masse :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Viande hachée	Bœuf / <i>E.coli</i>	$Y = 0,969 X + 0,193$
Lait pasteurisé	Cantal au lait cru / <i>E.coli</i>	$Y = 0,990 X + 0,063$
Poisson cru	CIP 54.127 / <i>E.coli</i>	$Y = 0,948 X + 0,215$
Légumes surgelés	Carottes râpées / <i>E.coli</i>	$Y = 1,012 X - 0,018$
Aliment pour chat	Granulés de bœuf / <i>E.coli</i>	$Y = 1,018 X + 0,010$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence})$

- Avec l'ensemencement en surface :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Viande hachée	Bœuf / <i>E.coli</i>	$Y = 1,098 X - 0,182$
Lait pasteurisé	Cantal au lait cru / <i>E.coli</i>	$Y = 0,955 X + 0,183$
Poisson cru	CIP 54.127 / <i>E.coli</i>	$Y = 1,069 X - 0,169$
Légumes surgelés	Carottes râpées / <i>E.coli</i>	$Y = 0,963 X + 0,186$
Aliment pour chat	Granulés de bœuf / <i>E.coli</i>	$Y = 1,010 X - 0,023$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence})$

Pour le milieu REBECCA™ + EB, les résultats obtenus sont les suivants :

- Avec l'ensemencement en masse :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Viande hachée	Bœuf / <i>E.coli</i>	$Y = 0,972 X + 0,104$
Lait pasteurisé	Cantal au lait cru / <i>E.coli</i>	$Y = 1,008 X - 0,008$
Poisson cru	CIP 54.127 / <i>E.coli</i>	$Y = 0,980 X + 0,069$
Légumes surgelés	Carottes râpées / <i>E.coli</i>	$Y = 0,914 X - 0,456$
Aliment pour chat	Granulés de bœuf / <i>E.coli</i>	$Y = 0,904 X + 0,431$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence})$

- Avec l'ensemencement en surface :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Viande hachée	Bœuf / <i>E.coli</i>	$Y = 1,139 X - 0,395$
Lait pasteurisé	Cantal au lait cru / <i>E.coli</i>	$Y = 0,908 X + 0,373$
Poisson cru	CIP 54.127 / <i>E.coli</i>	$Y = 1,088 X - 0,230$
Légumes surgelés	Carottes râpées / <i>E.coli</i>	$Y = 1,030 X - 0,091$
Aliment pour chat	Granulés de bœuf / <i>E.coli</i>	$Y = 0,944 X + 0,197$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence})$

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2007. L'exploitation statistique a porté sur 51 résultats interprétables provenant de 41 échantillons naturellement contaminés et 10 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, produits végétaux et alimentation animale.

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**.

A titre indicatif, les domaines de contamination (concentration) étaient les suivants :

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)*
Produits carnés	1,30 – 4,21
Produits laitiers	1,00 – 7,04
Produits de la mer	1,30 – 6,15
Produits végétaux	1,00 – 5,87
Alimentation animale	1,30 – 6,55

Les équations des droites de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues, sont les suivantes :

	Ensemencement en masse	Ensemencement en surface
milieu REBECCA™ base	$Y = 0,994 X + 0,074$	$Y = 0,990 X + 0,043$
milieu REBECCA™ + EB	$Y = 1,014 X - 0,002$	$Y = 0,980 X + 0,043$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence})$

La répétabilité pour les deux méthodes et le biais entre les deux méthodes ont été déterminés selon le mode de calcul utilisé pour l'étude collaborative (Cf. §6.3.5 et §6.3.6 de la norme NF EN ISO 16140). Ces résultats apportent une information complémentaire pour le critère exactitude

	Répétabilité r alt*	Répétabilité r ref*	Biais D*
milieu REBECCA™ base / ensemencement en masse	0,178	0,161	0,056
milieu REBECCA™ base / ensemencement en surface	0,238	0,161	0,010
milieu REBECCA™ + EB / ensemencement en masse	0,227	0,161	0,044
milieu REBECCA™ + EB / ensemencement en surface	0,278	0,161	-0,025

*les résultats sont exprimés en log

Conclusion pour la linéarité et l'exactitude relative :

Les études de linéarité et d'exactitude montrent que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Pour le milieu REBECCA™ base et REBECCA™ + EB,

- 50 souches de *E.coli* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 20 souches non *E.coli* a montré des réactions avec la souche suivante : *Shigella sonnei*

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délaï d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en un jour avec la méthode alternative contre un jour avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en un jour avec la méthode alternative contre un jour avec la méthode de référence.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *E.coli* aux 4 niveaux suivants :

- 0 UFC/mL
- 10 – 100 UFC/mL
- 100 – 1 000 UFC/mL
- 1 000 – 10 000 UFC/mL

Les laboratoires ont testé, par chacune des **deux méthodes**, **deux réplicats par niveau** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
Niveau 1	9	0,367	0,504	0,284	0,308	-0,038
Niveau 2	9	0,100	0,112	0,257	0,274	-0,063
Niveau 3	9	0,075	0,148	0,154	0,185	-0,037

* 3 laboratoires ont été exclus car l'analyse des résultats a été décalée dans le temps par rapport aux autres participants

Conclusion

L'étude interlaboratoire montre que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables à ceux obtenus avec la méthode de référence.

(Les valeurs de répétabilité de la méthode alternative sont comparables à celles de la méthode de référence pour le niveau 1. Pour les niveaux 2 et 3, la répétabilité de la méthode de référence est meilleure que celle de la méthode alternative.

Les valeurs de reproductibilité de la méthode alternative sont comparables à celles de la méthode de référence pour les niveaux 1 et 3. Pour le niveau 2, la reproductibilité de la méthode de référence est meilleure que celle de la méthode alternative).

Il est souhaitable d'adresser à AFAQ 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