



**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 10/07 – 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™ + EB**

Pour le débombrement des entérobactéries

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 NF EN ISO 21528-2 (2004) : méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae*. Partie 2 : méthode par comptage des colonies.

**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](mailto:certification@afaq.afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://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 et des entérobactéries.

## 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, appliqué au milieu REBECCA™ + EB (supplément).

## 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 : 30 – 300 UFC/g
- niveau 2 : 300 – 3000 UFC/g
- niveau 3 : 3000 – 30 000 UFC/g
- niveau 4 : 30 000 – 300 000 UFC/g
- niveau 5 : 300 000 – 3 000 000 UFC/g

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>	$Y = 1,016 X - 0,023$
Lait pasteurisé	Cantal au lait cru / <i>Enterobacter aerogenes</i>	$Y = 0,999 X - 0,096$
Poisson cru	CIP 54.127 / <i>Hafnia alvei</i>	$Y = 1,062 X - 0,399$
Légumes surgelés	Carottes râpées / <i>Klebsiella oxytoca</i>	$Y = 0,979 X + 0,094$
Aliment pour chat	Granulés de bœuf / <i>Citrobacter freundii</i>	$Y = 1,014 X - 0,297$

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

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

- Avec l'ensemencement en surface :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Viande hachée	Bœuf / <i>E.coli</i>	$Y = 1,034 X - 0,334$
Lait pasteurisé	Cantal au lait cru / <i>Enterobacter aerogenes</i>	$Y = 1,017 X - 0,135$
Poisson cru	CIP 54.127 / <i>Hafnia alvei</i>	$Y = 1,007 X - 0,022$
Légumes surgelés	Carottes râpées / <i>Klebsiella oxytoca</i>	$Y = 1,006 X - 0,065$
Aliment pour chat	Granulés de bœuf / <i>Citrobacter freundii</i>	$Y = 0,956 X + 0,052$

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

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

## Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2007. L'exploitation statistique a porté sur 50 résultats interprétables provenant de 38 échantillons naturellement contaminés et 12 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	2,60 – 7,95
Produits laitiers	2,16 – 7,53
Produits de la mer	1,78 – 7,68
Produits végétaux	1,91 – 8,49
Alimentation animale	1,30 – 5,64

- Avec l'ensemencement en masse : l'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues , est la suivante :

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,988 X + 0,092$$

- Avec l'ensemencement en surface : l'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues , est la suivante :

$$\text{Equation de la droite : } Y = 1,008 X - 0,042$$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N 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™ + EB / ensemencement en masse	0,244	0,210	0,038
milieu REBECCA™ + EB / ensemencement en surface	0,284	0,210	-0,006

\*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

- 30 souches de *Enterobacteriaceae* ont été détectées sur 30 testées.
- L'étude de 20 souches non *Enterobacteriaceae* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées

## PRATICABILITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
  - L'obtention des résultats **positifs** se fait en un jour avec la méthode alternative contre trois jours 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	0,517	0,473	0,517	0,410	0,029
Niveau 2	9	0,134	0,176	0,174	0,293	-0,062
Niveau 3	9	0,100	0,188	0,196	0,184	-0,036

\* 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 les niveaux 1 et 2. Pour le niveau 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 tous les niveaux de contamination.

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](http://www.afnor-validation.org)