



**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 10/10 – 07/10

Date de validation : 02.07.2010

Fin de validité : 02.07.2014

**La Société**                    **AES CHEMUNEX**  
rue Maryse Bastié  
Ker Lann / CS 17219  
F-35172 BRUZ CEDEX

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

**Bacillus cereus Rapid Agar (BACARA®)**  
**Milieu sélectif pour le dénombrement des *Bacillus cereus* présomptifs**

Référence du protocole : 520100 : 02/07/10 - B

**DOMAINE D'APPLICATION**

Tous produits d'alimentation humaine et animale

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune

**METHODE DE REFERENCE**

**NF EN ISO 7932 (2005)** – Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs : Technique par comptage des colonies à 30 °C.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "JBESLIN", written over a horizontal line.

**Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN**

## PRINCIPE DE LA METHODE

La gélose BACARA<sup>®</sup> est un milieu chromogène sélectif qui permet la numération des souches présomptives de *Bacillus* du groupe *cereus* sans confirmation. Les *B. cereus* apparaissent sur le milieu en 24 heures  $\pm$  2 heures d'incubation. Les colonies caractéristiques sont de couleur rose / orangée liée à la métabolisation du substrat chromogène et s'entourent d'un halo d'opacification du fait de l'activité phospholipase.

Les deux protocoles d'ensemencement (surface ou profondeur) sont applicables dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION.

**Note :** La confirmation des résultats positifs présomptifs obtenus par la méthode BACARA<sup>®</sup> n'est pas obligatoire dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION. Néanmoins, des confirmations selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification et à raison de 5 colonies par boîte) ont été testées durant l'étude. Toutes les confirmations réalisées à partir des colonies caractéristiques étaient positives.

## 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 2010 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 :

- 50 à 100 UFC/g
- 100 à 500 UFC/g
- 500 à 1 000 UFC/g
- 1 000 à 5 000 UFC/g
- 5 000 à 10 000 UFC/g

Les deux modes d'ensemencement de la méthode alternative (surface et profondeur) ont été testés.

Les résultats obtenus sont les suivants :

#### - Méthode par ensemencement en surface -

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés et produits de la mer	Pâté / <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	$Y = 1,107 X - 0,310$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Bacillus cereus</i>	$X = 1,006 Y + 0,075$
	Poudre de lait / <i>Bacillus mycoïdes</i>	$X = 0,933 Y + 0,141$
Produits végétaux	Flocons de pomme de terre / <i>Bacillus mycoïdes</i>	$Y = 1,068 X - 0,264$
Produits divers	Crème pâtissière (déshydratée) / <i>Bacillus cereus</i>	$Y = 0,988 X + 0,110$
	Taboulé / <i>Bacillus cereus</i>	$Y = 0,990 X + 0,102$
Alimentation animale	Tourteau / <i>Bacillus mycoïdes</i>	$X = 1,129 Y - 0,515$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

- Méthode par ensemencement en profondeur -

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés et produits de la mer	Pâté / <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	$Y = 0,978 X - 0,080$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Bacillus cereus</i>	$X = 1,000 Y - 0,146$
	Poudre de lait / <i>Bacillus mycoïdes</i>	$Y = 1,064 X - 0,306$
Produits végétaux	Flocons de pomme de terre / <i>Bacillus mycoïdes</i>	$Y = 0,987 X + 0,023$
Produits divers	Crème pâtissière (déshydratée) / <i>Bacillus cereus</i>	$Y = 0,878 X + 0,454$
	Taboulé / <i>Bacillus cereus</i>	$Y = 0,929 X + 0,352$
Alimentation animale	Tourteau / <i>Bacillus mycoïdes</i>	$Y = 0,839 X + 0,557$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

### Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2010. L'exploitation statistique a porté sur 52 résultats interprétables provenant de 20 échantillons naturellement contaminés et 32 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : Produits carnés et produits de la mer, produits laitiers, produits végétaux, produits divers et alimentation animale.

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

Les deux modes d'ensemencement de la méthode alternative (profondeur et surface) ont été testés.

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés et produits de la mer	1,95 à 4,10
Produits laitiers	2,70 à 4,03
Produits végétaux	1,00 à 4,28
Produits divers	2,00 à 4,00
Alimentation animale	1,00 à 4,07

Les équations de droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues, et par protocole d'ensemencement, sont les suivantes :

**Ensemencement en surface :**

$$Y = 1,030 X - 0,146$$

**Ensemencement en profondeur :**

$$Y = 1,006 X - 0,041$$

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 interlaboratoire (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.

Les limites de répétabilité (en log) obtenues pour la méthode de référence et pour la méthode alternative, et le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) sont :

	méthode alternative	méthode de référence	Biais D (moyenne des biais individuels)
Ensemencement en surface	0,248	0,209	- 0,071
Ensemencement en profondeur	0,171	-	- 0,025

#### **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. Le biais entre la méthode alternative et la méthode de référence est faible quel que soit le mode d'ensemencement utilisé.

#### **Conservation des géloses 48 heures à 3°C ±2°C**

Les résultats obtenus après 24 heures ±2 heures d'incubation à 30°C ont été comparés à ceux obtenus sur les mêmes boîtes conservés ensuite 48 heures à 3°C ±2°C. La conservation des géloses ne modifie pas le résultat observé immédiatement après incubation.

#### **SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)**

##### **Mise en œuvre de la méthode alternative seulement**

- 30 souches de *Bacillus cereus* ont été détectées sur 30 testées.
- L'étude de 27 souches non *Bacillus cereus* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées. Parmi ces souches, deux *Enterococcus faecalis* se sont développées sur gélose BACARA®, mais sans formation de halo.

#### **PRATICABILITE**

##### **Mise en œuvre de la méthode alternative seulement**

- **Délai d'obtention des résultats :** L'obtention des résultats positifs et négatifs se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 2 à 4 jours avec la méthode de référence.
- **Formation du personnel :** Les temps de manipulation de la méthode BACARA® qui ne nécessite pas de confirmation des résultats positifs présomptifs sont réduits par rapport à la méthode de référence.

#### **ETUDE INTERLABORATOIRE**

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Bacillus cereus* aux 4 niveaux suivants :

- 0 UFC/ml
- 100 UFC/ml
- 1 000 UFC/ml
- 10 000 UFC/ml

Les limites de répétabilité (en log) obtenues pour la méthode de référence et pour la méthode alternative, et le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) sont :

	méthode alternative	méthode de référence	<i>Biais D</i> (moyenne des biais individuels)
Ensemencement en surface	0,248	0,209	- 0,071
Ensemencement en profondeur	0,171	-	- 0,025

#### **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. Le biais entre la méthode alternative et la méthode de référence est faible quel que soit le mode d'ensemencement utilisé.

#### **Conservation des géloses 48 heures à 3°C ±2°C**

Les résultats obtenus après 24 heures ±2 heures d'incubation à 30°C ont été comparés à ceux obtenus sur les mêmes boîtes conservés ensuite 48 heures à 3°C ±2°C. La conservation des géloses ne modifie pas le résultat observé immédiatement après incubation.

#### **SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)**

##### **Mise en œuvre de la méthode alternative seulement**

- 30 souches de *Bacillus cereus* ont été détectées sur 30 testées.
- L'étude de 27 souches non *Bacillus cereus* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées. Parmi ces souches, deux *Enterococcus faecalis* se sont développées sur gélose BACARA<sup>®</sup>, mais sans formation de halo.

#### **PRATICABILITE**

##### **Mise en œuvre de la méthode alternative seulement**

- L'obtention des résultats **positifs** et **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 2 à 4 jours avec la méthode de référence.
- Les **temps de manipulation** de la méthode BACARA<sup>®</sup> qui ne nécessite pas de confirmation des résultats positifs présumptifs sont réduits par rapport à la méthode de référence.

#### **ETUDE INTERLABORATOIRE**

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Bacillus cereus* aux 4 niveaux suivants :

- 0 UFC/ml
- 100 UFC/ml
- 1 000 UFC/ml
- 10 000 UFC/ml

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

Les résultats obtenus, calculés conformément au projet d'amendement 1 de la norme EN ISO 16140 :2003 (version prA1 :2009), sont les suivants :

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires avec résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Ecart type de Répétabilité $S_r$	Ecart type de Reproductibilité $S_R$	Ecart type de Répétabilité $S_r$	Ecart type de Reproductibilité $S_R$	Biais
Niveau 1	13	0,219	0,219	0,315	0,315	-0,24
Niveau 2	13	0,041	0,077	0,078	0,090	-0,07
Niveau 3	13	0,058	0,102	0,031	0,068	-0,04

\* Un laboratoire a réalisé les essais hors délais. Ses résultats n'ont pas été pris en compte.

Note : Limite de répétabilité  $r = 2,8 S_r$ , avec  $S_r$ : écart-type de répétabilité  
 Limite de reproductibilité  $R = 2,8 S_R$ , avec  $S_R$ : écart-type de reproductibilité

### Conclusion

L'étude interlaboratoire montre que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables à ceux obtenus avec 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 [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)