



**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 : BIO 12/20 – 12/06**

**Date de validation : 14.12.2006**

**Fin de validité : 14.12.2010**

**La Société  
(siège social, distributeur  
et site de production)**

**BIOMERIEUX  
69280 MARCY L'ETOILE**

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

**COLI ID – milieu (gélose)**

Milieu chromogène sélectif pour la détection et le dénombrement des coliformes et des *E. coli*  $\beta$  glucuronidase positive à partir d'échantillons alimentaires  
➤ Validée pour le dénombrement des *Coliformes* à 37°C

Référence du protocole : 08142 versions H et I

**DOMAINE D'APPLICATION**

Tous produits d'alimentation humaine

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune

**METHODE DE REFERENCE**

NF ISO 4832 (février 2006) : méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes : méthode par comptage des colonies.

**Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN**

**AFAQ 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.org](http://www.afnor.org)

## PRINCIPE DE LA METHODE

Le milieu Coli ID est un milieu chromogène permettant le dénombrement des coliformes et des *E. coli*  $\beta$  glucuronidase positive. Ce milieu contient deux substrats chromogènes. Les coliformes autres que *E. coli* apparaissent sous forme de colonies bleues, grâce à la mise en évidence de la  $\beta$  galactosidase, alors que les *E. coli* apparaissent roses grâce à la mise en évidence de la  $\beta$  glucuronidase.

## NOTE

La présente attestation porte sur l'utilisation de la méthode COLI ID pour le dénombrement des *Coliformes* avec une incubation à 37°C. L'ensemble de l'étude de validation a été réalisée en 2006. Pour l'étude de spécificité, les données obtenues lors de la validation de la méthode COLI ID pour le dénombrement des *E.coli* à 37°C (attestation BIO 12/19 – 12/06) ont été ajoutées.

## 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 2006 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 – 100, 100 – 500, 500 – 1 000, 1 000 – 5 000 et 5 000 – 10 000 UFC/g.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Steak haché / <i>Enterobacter cloacae</i>	$Y = 1,061 X - 0,280$
Produits laitiers	Lait / <i>Citrobacter diversus</i>	$Y = 1,011 X - 0,055$
Produits de la mer	Filet de poisson / <i>E coli</i>	$X = 1,207 Y - 0,616$
Végétaux et divers	Petits pois / <i>Enterobacter agglomerans</i>	$Y = 0,823 X + 0,409$
Ovoproduits	Coule d'œuf / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	$Y = 1,020 X - 0,092$

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

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

#### Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2006. L'exploitation statistique a porté sur 73 résultats interprétables provenant tous d'échantillons naturellement contaminés appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, produits végétaux et divers et ovoproduits.

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 ufc/g)
Produits carnés	1,00 à 6,57
Produits laitiers	1,85 à 4,83
Produits de la mer	1,90 à 6,08
Produits végétaux	1,48 à 6,09
Ovoproduits	1,30 à 6,08

L'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues, est la suivante :

$$\text{Equation de la droite : } Y = 1,040 X - 0,229$$

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

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode alternative est de 0,270

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de 0,264

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) est le suivant :

$p = -0,100$  si l'on prend la médiane

#### **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**

- Sur 30 souches testées, 29 souches de coliformes réparties sur 15 espèces, ont été détectées. Une souche *Hafnia* a donné des colonies non caractéristiques gris clair sur Coli ID.

Egalement, 30 souches de *E. coli* ont été testées, parmi lesquelles 27 souches ont donné des colonies roses caractéristiques de *E. coli*  $\beta$  glucuronidase positive, et 3 souches  $\beta$  glucuronidase négative ont donné des colonies bleues caractéristiques des coliformes.

- Sur 20 souches non coliformes testées, une souche de *Salmonella arizonae* a donné des colonies grises sur gélose Coli ID.

## **PRATICABILITE**

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

- **Délai d'obtention des résultats :**

La méthode Coli ID permet d'obtenir un résultat en 24h comme la méthode de référence.

L'utilisation d'une seule boîte par dilution a été validée.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *E. coli* et une souche de sérotype *Enterobacter cloacae* aux 4 niveaux suivants :

- Niveau 0 : 0 UFC/ml
- Niveau 1 : 10 – 100 UFC/ml
- Niveau 2 : 100 – 1 000 UFC/ml
- Niveau 3 : 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	14	0,157	0,272	0,192	0,265	- 0,003
Niveau 2	14	0,166	0,166	0,147	0,199	- 0,014
Niveau 3	14	0,127	0,234	0,179	0,201	- 0,023

### Conclusion

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

Les biais sont non significatifs.

Il est souhaitable d'adresser à AFAQ AFNOR Certification toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition un document de synthèse des études préliminaire et collaborative