



**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 12/5 – 01/99

Date de validation :	19.01.1999
Dates de reconduction*:	06.02.2003
	14.12.2006
Fin de validité :	19.01.2011

** le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre*

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* β glucuronidase positive à partir d'échantillons alimentaires

➤ Validée pour le dénombrement des *E. coli* β glucuronidase positive à 44°C

Référence du protocole : 08142-H

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF ISO 16649-2 : méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β glucuronidase positive (juillet 2001)

**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 - www.afnor.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le milieu Coli ID est un milieu chromogène permettant le dénombrement des coliformes et des *E. coli* β 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 β galactosidase, alors que les *E. coli* apparaissent roses grâce à la mise en évidence de la β glucuronidase.

NOTE

Par rapport à la précédente validation (reconduction) prononcée en 2003, le protocole décrit dans la norme EN ISO 16140 a été mis en œuvre.

En conséquence :

- l'étude préliminaire de validation a été renouvelée pour la linéarité.
- Les données obtenues en 2002 ont été réexploitées selon la norme EN ISO 16140 pour l'étude d'exactitude.
- L'étude de spécificité a été complétée et l'étude de praticabilité a été conservée.
- L'étude interlaboratoire a été refaite.

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 à 100, 100 à 500, 500 à 1 000, 1 000 à 5 000 et 5 000 à 10 000 ufc/g.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Steak haché / <i>E. coli</i>	$Y = 1,060 X - 0,16$
Produits laitiers	Lait / <i>E. coli</i>	$X = 0,993 Y + 0,014$
Produits de la mer	Filet de poisson / <i>E. coli</i>	$Y = 0,894 X + 0,301$
Végétaux et divers	Petits pois / <i>E. coli</i>	$Y = 1,020 X + 0,026$
Ovoproduits	Coule d'œuf / <i>E. coli</i>	$Y = 1,127 X - 0,332$

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

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

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2002. L'exploitation statistique a porté sur 121 résultats interprétables tous d'échantillons naturellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, végétaux et divers, 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	0,70 à 4,36
produits laitiers,	0,00 à 4,52
produits de la mer	0,70 à 3,69
végétaux et divers	1,00 à 3,60
ovoproduit	0,70 à 4,30

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,97 X + 0,06$$

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 0,205

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de 0,088

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

p = 0,06 si l'on prend la médiane

ou D= -0.02 si on prend la moyenne des biais individuels.

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) – études de 1998 et 2006

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 27 souches de *E. coli* ont été détectées sur 30 testées. Les 3 souches non reconnues ont donné des colonies non caractéristiques bleues sur Coli ID : l'une est une souche d'*E. coli* O157:H7 β glucuronidase négative, une autre donne une réaction β glucuronidase négative en galerie d'identification.
- Sur 25 souches non *E. coli* testées : toutes les souches ont soit présenté des colonies non caractéristiques, soit n'ont présenté aucune croissance.

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* 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	0,223	0,216	0,214	0,305	0,076
Niveau 2	14	0,200	0,240	0,098	0,266	0,051
Niveau 3	14	0,235	0,338	0,167	0,319	0,051

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 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