



**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 12/19 – 12/06

Date de validation :	14.12.2006
Date de reconduction:	02.12.2010
Fin de validité :	14.12.2014

La société **BioMérieux SA**
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'Etoile (France)

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

Gélose chromID™ Coli

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 37°C**

Référence du protocole : 08142 version J

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF ISO 16649-2 (2001) : Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive - Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**



AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00

www.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

La gélose chromID™ Coli (Coli ID) est un milieu chromogène permettant le dénombrement des coliformes et des *E. coli* β glucuronidase positives. 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 (historique de validation)

1) La présente attestation porte sur l'utilisation de la méthode chromID™ Coli pour le dénombrement des *E. coli* avec une incubation à 37°C. L'ensemble de l'étude de validation a été réalisée en 2006, sauf pour les deux critères suivants repris de l'étude réalisée en 1998 et 2002 lors de la première validation de la méthode (avec incubation 44°C) :

- Spécificité : données reprises et complétées en 2006
- Praticabilité : reprise des données antérieures

2) Dans le cadre de l'étude de reconduction de décembre 2010, les résultats de l'étude interlaboratoire obtenus en 2006 ont été réinterprétés selon le projet d'amendement de la norme EN ISO 16140/PrA1 (2009). Les nouveaux résultats sont disponibles dans la présente attestation. La méthode chromID™ Coli et la méthode de référence restent inchangées depuis la dernière validation.

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>E. coli</i>	$Y = 0,987 X + 0,006$
Produits laitiers	Lait / <i>E. coli</i>	$X = 0,990 Y + 0,025$
Produits de la mer	Filet de poisson / <i>E. coli</i>	$Y = 0,914 X + 0,304$
Végétaux et divers	Petits pois / <i>E. coli</i>	$Y = 0,903 X + 0,342$
Ovoproduits	Coule d'œuf / <i>E. coli</i>	$X = 0,845 Y + 0,470$

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

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

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2006. L'exploitation statistique a porté sur 65 résultats interprétables provenant de 49 échantillons naturellement contaminés et 16 artificiellement 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 6,08
Produits laitiers	1,36 à 3,99
Produits de la mer	2,60 à 5,71
Produits végétaux	1,00 à 5,95
Ovoproduits	1,48 à 4,60

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 1,096 X - 0,099$$

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 0,322

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

D = - 0,04 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) – études de 1998 et 2006

Mise en œuvre 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 chromID™ Coli : 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. Ces souches β glucuronidase négative présentent également des colonies non caractéristiques sur gélose TBX de la méthode de référence.
- Sur 23 souches non *E.coli* testées :
 - une souche de *Plesiomonas shigelloides* a donné des colonies roses.
 - les autres souches ont soit présenté des colonies non caractéristiques, soit n'ont présenté aucune croissance.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

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

La méthode chromID™ Coli 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, 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	14	0,0943	0,0943	0,0481	0,1014	0,086
Niveau 2	14	0,0638	0,0790	0,0832	0,0832	0,036
Niveau 3	14	0,0666	0,1038	0,0753	0,0988	0,092

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, pour les niveaux 2 et 3. Pour le niveau 1, on note une meilleure répétabilité de la méthode alternative, et une limite de reproductibilité moins bonne pour la méthode alternative par rapport à la méthode de référence. Les biais sont très faibles.

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