



**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 : BRD – 07/7 – 12/04

**Date de validation : 02.12.2004
1^{ère} reconduction : 28.11.2008
Fin de validité : 02.12.2012**

La Société **BIO-RAD**
(siège social) 3, Boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE
FRANCE

Site de **BIO-RAD**
production Route de Cassel
59114 STEENVOORDE
FRANCE

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

RAPID'E. COLI 2

VALIDEE POUR LE DENOMBREMENT DES *E. COLI* β-GLUCURONIDASE POSITIVES A 37°C

Référence du protocole : RAPID'E.coli 2 / Gélose (355-5299 / 356-4024) – V5

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

- Il existe quelques souches *E coli* β-D-glucuronidase négatives, par ex. *E.coli* O157
- Quelques serovars de *Salmonella* et quelques espèces de *Shigella* possèdent l'enzyme β-D-glucuronidase positive (souches inférieures à 1,5%)

METHODE DE REFERENCE

Norme NF ISO 16649-2, juillet 2001, Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* B-glucuronidase positive – Partie 2 : technique de comptage des colonies à 44°C au moyen d'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-glucuronate (indice de classement V08-031-2).

**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
certification@afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le principe du milieu Rapid'*E.coli* 2 repose sur la mise en évidence simultanée de deux activités enzymatiques : la Bêta-D-Glucuronidase (GLUC) et la Bêta-D-Galactosidase (GAL). Le milieu contient deux substrats chromogéniques :

- un substrat spécifique de la GAL qui entraîne la coloration bleue des colonies positives pour cette enzyme.
- un substrat spécifique de la GLUC qui entraîne la coloration rose des colonies positives pour cette enzyme.

Les coliformes autres que *E.coli* (GAL+/GLUC-) forment des colonies bleues, les *E. coli* (GAL+/GLUC+) forment des colonies violettes à roses.

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 2004 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 : 10 à 50, 50 à 100, 100 à 500, 500 à 1 000, 1 000 à 10 000 UFC/g

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Viande de bœuf hachée/ <i>E.coli</i> origine rognons de porc	$y = 0,061 + 1,003 x$
Produits laitiers	Lait cru/ <i>E.coli</i> origine lait cru	$y = -0,002 + 0,990 x$
Produits végétaux	Chou rouge/ <i>E.coli</i> origine chou rouge	$y = 0,037 + 0,990 x$
Produits de la pêche	Filet de poisson/ <i>E.coli</i> origine crépinette	$y = -0,188 + 1,096 x$
Pâtisseries	Crème pâtissière/ <i>E.coli</i> origine crème vanille	$y = 0,202 + 0,951 x$

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

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

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2004, sur 96 échantillons. L'interprétation statistique a porté sur 50 résultats dont 45 échantillons naturellement contaminés et 5 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits végétaux, produits de la pêche, pâtisseries

Lors des essais, la méthode alternative n'a pas permis de donner de résultat pour 4 échantillons à l'inverse de la méthode de référence, du fait d'un envahissement des géloses par une flore interférente importante.

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 (en log UFC/g)
Produits carnés	1,0 à 3,1
Produits laitiers	0,5 à 4,3
Produits végétaux	1,0 à 3,8
Produits de la pêche	2,0 à 5,5
Pâtisseries	1,5 à 4,5

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

$$y = 0,100 + 0,968 x$$

$$R^2 = 0,994$$

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

Les limites de répétabilité (en log) obtenues pour la méthode alternative et la méthode de référence sont les suivantes :

Méthode alternative
r = 0,23

Méthode de référence
r = 0,22

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

$$D = 0,012$$

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 *E.coli* β -glucuronidase positives ont été détectées sur 30 testées.
- L'étude de 54 souches non *E.coli* a montré des réactions négatives pour 51 souches (pas de colonies ou colonies non caractéristiques) et des réactions positives (aspect caractéristique) avec les 3 souches suivantes : une souche de *Shigella sonnei* et deux souches de *Salmonella arizonae* (lactose +).
Ces trois souches testées avec la méthode de référence ont également donné des colonies caractéristiques (bleues) sur milieu TBX-.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- L'obtention des résultats **positifs** et **négatifs** se fait en 18h à 24h avec les deux méthodes (alternative et référence).
- Seuls le milieu utilisé et la couleur des colonies caractéristiques diffèrent entre la méthode RAPID'E. *Coli* 2 et la méthode de référence.
- Le milieu RAPID'E. *coli* 2 s'utilise en simple couche, sauf dans le cas de produits très fortement chargés en flore interférente, et permet de distinguer les *E.coli* des autres coliformes.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2004 avec 16 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé contaminés artificiellement avec une souche de *E.coli* β -glucuronidase positive isolée de pâtisserie aux 4 niveaux suivants (en cellules / ml) :

- niveau 0
- niveau 1 : 10 - 100
- niveau 2 : 100 - 1000
- niveau 3 : 1000 - 10000

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 d'échantillons exploités*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
50	40	0,26	0,48	0,18	0,22	0,083
500	40	0,15	0,37	0,12	0,25	0,073
5000	40	0,28	0,36	0,09	0,15	0,043

* 4 laboratoires n'ont pas réalisé les analyses.

* un laboratoire a réalisé les analyses 48h après réception, soit 72 h après l'envoi et ses résultats n'ont pas été exploités.

Conclusion

L'étude collaborative montre que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables aux résultats 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