



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 07/8 – 12/04**

**Date de validation : 02.12.2004**  
**1<sup>ère</sup> 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 COLIFORMES 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**

Aucune.

**METHODE DE REFERENCE**

**NF EN ISO 4832** : Méthode horizontale pour le dénombrement coliformes – Technique de comptage des colonies.

**Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN**

## 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 (méthode de référence à 30°C)	Droite de régression (méthode de référence à 37°C)
Produits carnés	Viande de bœuf hachée/ <i>Enterobacter agglomerans</i> origine jambon	$y = -0,076 + 1,020 x$	$y = -0,052 + 1,096 x$
Produits laitiers	Lait cru/ <i>Enterobacter cloacae</i> origine poudre de lait	$y = -0,151 + 1,022 x$	$y = -0,171 + 1,120 x$
Produits végétaux	Chou rouge/ <i>Citrobacter freundii</i> origine céleri	$y = -0,089 + 1,019 x$	$y = 0,010 + 0,991 x$
Produits de la pêche	Filet de poisson/ <i>Enterobacter aminigenus</i> origine brochette de poisson	$y = -0,009 + 0,988 x$	$y = -0,059 + 1,007 x$
Pâtisseries	Crème pâtissière/ <i>Enterobacter cloacae</i> origine lait cru	$y = 0,017 + 1,000 x$	$y = 0,040 + 0,986 x$

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

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

#### Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2004. L'interprétation statistique a porté sur 50 résultats dont 43 échantillons naturellement contaminés et 7 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

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

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes** (à 37°C avec Rapid'*E.coli* 2 et à 30°C et 37°C avec la méthode de référence).

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (en log UFC/g)
Produits carnés	1,9 à 4,0
Produits laitiers	1,9 à 4,7
Produits végétaux	2,2 à 4,7
Produits de la pêche	1,9 à 5,2
Pâtisseries	2,5 à 4,8

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

**Avec la méthode de référence à 30°C :**      **Avec la méthode de référence à 37°C :**

$$y = -0,210 + 0,987 x$$

$$R^2 = 0.973$$

$$y = 0,041 + 0,981 x$$

$$R^2 = 0.985$$

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

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

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	Méthode de référence à 30°C	Méthode de référence à 37°C
$r = 0,18$	$r = 0,14$	$r = 0,11$

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

Par rapport à la méthode de référence à 30°C

$$D = - 0,010 \log \text{ UFC/g}$$

Par rapport à la méthode de référence à 37°C

$$D = - 0,007 \log \text{ UC/g}$$

#### **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**

- 67 souches de coliformes ont été détectées avec un aspect caractéristique sur 69 testées. Les 2 souches ayant donné des colonies blanches (non caractéristiques) sont des souches d'*Hafnia alvei* qui sont ONPG négatives. Ces souches ont été testées en parallèle avec la méthode de référence sur milieu VRBL incubé à 30°C et 37°C : l'une donne des colonies caractéristiques sur VRBL et l'autre n'est pas observable. D'autres *Hafnia alvei* ont été testées et détectées avec un aspect caractéristique.
- L'étude de 20 souches non coliformes a montré des réactions négatives (pas de colonies ou colonies non caractéristiques) avec 17 souches et 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, sur milieu VRBL incubé à 30°C et 37°C ont également donné des colonies caractéristiques.

## **PRATICABILITE**

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

- L'obtention des résultats **positifs** et **négatifs** se fait en 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, en proportions équivalentes, avec une souche d'*Enterobacter cloacae* isolée de poudre de lait et une souche d'*E.coli* isolée de pâtisserie, aux 4 niveaux suivants (en cellules / ml) :

- niveau 0
- niveau 1 : 50 - 500
- niveau 2 : 500 - 5000
- niveau 3 : 5000 - 50000

Les laboratoires ont testé, par chacune des **deux méthodes, deux réplicats par niveau** de contamination. La méthode de référence a été incubée à 30°C.

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	0,20	0,31	0,19	0,22	0,069
500	40	0,16	0,31	0,16	0,30	0,043
5000	40	0,19	0,38	0,20	0,26	0,025

\* 5 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](http://www.afnor-validation.org)