

**CONFIDENTIEL**

**ETUDE DE LA VALIDATION AFAQ AFNOR  
CERTIFICATION DU TEST REBECCA  
BASE POUR LE DENOMBREMENT DES  
ESCHERICHIA COLI SELON LA NORME  
NF ISO 16140**

**RAPPORT DE SYNTHÈSE**

Ce rapport d'analyse ne concerne que les objets soumis aux analyses. Sa reproduction n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral. Il comporte 18 pages (hors annexes).

Seuls certains essais rapportés dans ce document sont couverts par l'accréditation de la Section Laboratoire du COFRAC. Ils sont identifiés par le symbole (\*)

Essais réalisés à l'ISHA : 25, avenue de la République 91300 Massy

Fabricant : **AES CHEMUNEX**  
Route de Dol – BP 54  
35270 COMBOURG

Laboratoire expert : **I. S. H. A.**  
25, avenue de la République  
91300 MASSY

En vue de la validation AFAQ AFNOR Certification selon la norme  
NF ISO 16140 du test REBECCA™ base pour le dénombrement  
des *Escherichia coli*

## SOMMAIRE

|   |                  |
|---|------------------|
| <b><u>1. Introduction</u></b>   | <b><u>4</u></b>  |
| <b><u>1.1. Référentiel de validation</u></b>                              | <b><u>4</u></b>  |
| <b><u>1.2. Méthode alternative</u></b>                                    | <b><u>4</u></b>  |
| <b><u>1.3. Domaine d'application</u></b>                                  | <b><u>4</u></b>  |
| <b><u>1.4. Méthode de référence (*)</u></b>                               | <b><u>4</u></b>  |
| <b><u>2. Etude comparative des deux méthodes</u></b>                      | <b><u>4</u></b>  |
| <b><u>2.1. Exactitude relative</u></b>                                    | <b><u>4</u></b>  |
| 2.1.1. Nombre et nature des échantillons                                  | 4                |
| 2.1.2. Résultats  | 5                |
| 2.1.3. Conclusion   | 6                |
| <b><u>2.2. Linéarité</u></b>  | <b><u>7</u></b>  |
| 2.2.1. Matrices utilisées et niveaux de contamination                     | 7                |
| 2.2.2. Résultats bruts  | 8                |
| 2.2.3. Conclusion   | 8                |
| <b><u>2.3. Sensibilité relative</u></b>                                   | <b><u>8</u></b>  |
| <b><u>2.4. Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ)</u></b>   | <b><u>9</u></b>  |
| 2.4.1. Protocole d'essais   | 10               |
| 2.4.2. Résultats  | 10               |
| <b><u>2.5. Spécificité / sélectivité</u></b>                              | <b><u>11</u></b> |
| 2.5.1. Protocole d'essais   | 11               |
| 2.5.2. Résultats  | 11               |
| <b><u>3. Praticabilité</u></b>  | <b><u>11</u></b> |
| <b><u>4. Etude collaborative</u></b>                                      | <b><u>12</u></b> |
| <b><u>Annexe A : Exactitude relative – Graphiques bidimensionnels</u></b> | <b><u>13</u></b> |
| <b><u>Annexe B : Linéarité – Graphiques bidimensionnels</u></b>           | <b><u>16</u></b> |

# **1. Introduction**

## **1.1. Référentiel de validation**

L'étude préliminaire a pour but d'évaluer les performances du test REBECCA™ Base pour le dénombrement des *E. coli* par rapport à la méthode de référence NF ISO 16649-2 selon le référentiel NF ISO 16140.

Les caractéristiques suivantes sont étudiées :

- L'exactitude relative,
- La linéarité,
- La sensibilité relative,
- Les limites de détection et de quantification
- La sélectivité (inclusivité et exclusivité),
- La praticabilité.

## **1.2. Méthode alternative**

REBECCA (**R**apid **E**nterobacteria **E**scherichia **C**oli **C**oliform **A**gar) est un milieu chromogénique pour le dénombrement **sans confirmation** dans les produits d'alimentations humaine et animale des *E. coli*  $\beta$ -D-glucuronidase positive. Dans le cadre de la validation, deux types d'ensemencements ont été testés : l'ensemencement en profondeur et l'ensemencement en surface.

Le protocole de la méthode alternative est présenté en annexe 1 et la notice d'utilisation en annexe 8.

## **1.3. Domaine d'application**

Tous produits d'alimentation humaine et animale.

## **1.4. Méthode de référence (\*)**

La norme NF ISO 16649-2 (2001) : méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive – technique par comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -glucuronate a été appliquée.

Le protocole de la méthode de référence est présenté en annexe 2.

# **2. Etude comparative des deux méthodes**

## **2.1. Exactitude relative**

L'exactitude relative est définie comme l'écart entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

### **2.1.1. Nombre et nature des échantillons**

Cinq catégories d'échantillons d'alimentation humaine et animale ont été testées en parallèle (analyse en double) avec la méthode de référence et la méthode alternative. Les différents types de produits analysés pour chaque catégorie sont résumés dans le tableau suivant.

| Catégories           | Types                                | Echantillons analysés | Echantillons exploités |
|----------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| Produits carnés      | Viandes crues                        | 9                     | 4                      |
|                      | Charcuterie                          | 6                     | 4                      |
|                      | Plats cuisinés                       | 4                     | 2                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>19</b>             | <b>10</b>              |
| Produits laitiers    | Crème                                | 1                     | 0                      |
|                      | Fromage                              | 13                    | 11                     |
|                      | Glace                                | 1                     | 0                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>15</b>             | <b>11</b>              |
| Produits de la mer   | Poissons                             | 4                     | 3                      |
|                      | Plats cuisinés                       | 10                    | 6                      |
|                      | Crustacés                            | 5                     | 1                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>19</b>             | <b>10</b>              |
| Produits végétaux    | Plats cuisinés et salades de légumes | 14                    | 8                      |
|                      | Préparations à base de fruits        | 3                     | 2                      |
|                      | Végétaux                             | 1                     | 0                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>18</b>             | <b>10</b>              |
| Alimentation animale | Viande crue                          | 4                     | 0                      |
|                      | Pâtée pour chat                      | 6                     | 2                      |
|                      | Pâtée pour chien                     | 2                     | 2                      |
|                      | Farine animale                       | 6                     | 5                      |
|                      | Croquettes                           | 1                     | 1                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>19</b>             | <b>10</b>              |
| <b>Total</b>         |                                      | <b>90</b>             | <b>51</b>              |

Pour chaque catégorie, au moins 10 résultats exploitables ont été obtenus. Les différents échantillons analysés sont représentatifs de la gamme de contaminations habituellement rencontrées pour ce type d'analyse.

Au total, 90 échantillons ont été analysés et 51 résultats sont exploités. Le taux d'échantillons naturellement contaminés est de 80%.

Dix échantillons ont été artificiellement contaminés, les stress appliqués et les souches utilisées sont résumés dans le tableau suivant.

| Souche utilisée (origine)                                 | Stress appliqué    | log MNS – log MS | Echantillon concerné      |
|---|--------------------|------------------|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> – 158 (Granulés de bœuf)          | 20 min. à 56°C     | 0,80             | RD 1430, RD 1431          |
| <i>Escherichia coli</i> – 172 (Crevettes crues)           | 20 min. à 56°C     | 0,80             | RD 1427, RD 1428, RD 1429 |
| <i>Escherichia coli</i> – 163 (Porc haché)                | 2 semaines à -20°C | 0,76             | RD 1435, RD 1436          |
| <i>Escherichia coli</i> – 179 (Crevette crue décortiquée) | 2 semaines à -20°C | 0,60             | RD 1432, RD 1433, RD 1434 |

### 2.1.2. Résultats

Les résultats bruts et les calculs statistiques sont résumés dans les tableaux 1 à 4. Les graphiques bidimensionnels obtenus à partir de ces résultats sont présentés en annexe A.

**Tableau 1 : Données statistiques pour l'ensemencement en masse**

| Matrice            | rob. R | Régression utilisée | T critique | a      | t(a)  | b     | t(b)  | P %          |           |
|--------------------|--------|---------------------|------------|--------|-------|-------|-------|--------------|-----------|
|                    |        |                     |            |        |       |       |       | Ordonnée à 0 | Pente à 1 |
| Produits carnés    | 2,460  | OLS                 | 2,306      | 0,250  | 2,654 | 0,959 | 1,199 | 2            | 25        |
| Produits laitiers  | 0,943  | GMFR                | 2,262      | -0,050 | 0,785 | 1,024 | 1,532 | 44           | 15        |
| Produits de la mer | 1,335  | GMFR                | 2,306      | 0,113  | 0,722 | 0,977 | 0,506 | 48           | 62        |
| Produits végétaux  | 0,350  | GMFR                | 2,306      | -0,035 | 0,251 | 1,028 | 0,691 | 80           | 50        |
| Aliment. animale   | 1,828  | GMFR                | 2,306      | 0,060  | 0,643 | 0,987 | 0,589 | 53           | 56        |
| Toutes matrices    | 1,109  | GMFR                | 2,007      | 0,074  | 1,549 | 0,994 | 0,415 | 12           | 68        |

**Tableau 2 : Biais et répétabilité des 2 méthodes (ensemencement en masse)**

| Matrice            | Biais (D) en log |        | Répétabilité en log |       |       |       |
|--------------------|------------------|--------|---------------------|-------|-------|-------|
|                    | Moyen            | Médian | r                   |       | Rob.r |       |
|                    |                  |        | MR                  | MA    | MR    | MA    |
| Produits carnés    | 0,143            | 0,133  | 0,179               | 0,341 | 0,149 | 0,367 |
| Produits laitiers  | 0,040            | 0,051  | 0,140               | 0,305 | 0,108 | 0,102 |
| Produits de la mer | 0,039            | 0,002  | 0,219               | 0,355 | 0,145 | 0,194 |
| Produits végétaux  | 0,052            | 0,078  | 0,288               | 0,463 | 0,249 | 0,087 |
| Aliment. animale   | 0,008            | 0,044  | 0,186               | 0,214 | 0,122 | 0,224 |
| Toutes matrices    | 0,056            | 0,051  | 0,207               | 0,345 | 0,161 | 0,178 |

MR : méthode de référence, MA : méthode alternative

**Tableau 3 : Données statistiques pour l'ensemencement en surface**

| Matrice            | rob. R | Régression utilisée | T critique | a      | t(a)  | b     | t(b)  | P %          |           |
|--------------------|--------|---------------------|------------|--------|-------|-------|-------|--------------|-----------|
|                    |        |                     |            |        |       |       |       | Ordonnée à 0 | Pente à 1 |
| Produits carnés    | 2,033  | OLS                 | 2,306      | 0,068  | 0,659 | 1,024 | 0,629 | 52           | 54        |
| Produits laitiers  | 3,694  | OLS                 | 2,262      | -0,242 | 2,538 | 1,053 | 2,247 | 2            | 4         |
| Produits de la mer | 1,479  | GMFR                | 2,306      | 0,018  | 0,099 | 1,004 | 0,074 | 92           | 94        |
| Produits végétaux  | 0,943  | GMFR                | 2,306      | 0,091  | 0,737 | 0,986 | 0,378 | 47           | 71        |
| Aliment. animale   | 1,403  | GMFR                | 2,306      | -0,180 | 1,531 | 1,018 | 0,644 | 14           | 53        |
| Toutes matrices    | 1,481  | GMFR                | 2,007      | 0,043  | 0,768 | 0,990 | 0,634 | 45           | 53        |

**Tableau 4 : Biais et répétabilité des 2 méthodes (ensemencement en surface)**

| Matrice            | Biais (D) en log |        | Répétabilité en log |       |       |       |
|--------------------|------------------|--------|---------------------|-------|-------|-------|
|                    | Moyen            | Médian | r                   |       | Rob.r |       |
|                    |                  |        | MR                  | MA    | MR    | MA    |
| Produits carnés    | 0,130            | 0,182  | 0,179               | 0,232 | 0,149 | 0,303 |
| Produits laitiers  | -0,044           | -0,051 | 0,140               | 0,443 | 0,108 | 0,400 |
| Produits de la mer | 0,031            | 0,026  | 0,219               | 0,186 | 0,145 | 0,214 |
| Produits végétaux  | 0,048            | 0,089  | 0,288               | 0,311 | 0,249 | 0,235 |
| Aliment. animale   | -0,109           | -0,116 | 0,186               | 0,261 | 0,122 | 0,184 |
| Toutes matrices    | 0,010            | 0,000  | 0,207               | 0,303 | 0,161 | 0,238 |

MR : méthode de référence, MA : méthode alternative

### 2.1.3. Conclusion

#### Ensemencement en masse :

L'hypothèse [a=0 et b=1] est acceptée pour les catégories : « Produits de la mer », « Produits végétaux », « Alimentation animale » et « Toutes matrices ».

Pour la catégorie « Produits carnés », l'hypothèse [b=1] est acceptée mais l'hypothèse [a=0] est refusée. Cependant, l'équation des droites et le coefficient de corrélation sont satisfaisants :

« Produits carnés » :

Coefficient de corrélation :  $r = 0,994$

Equation de la droite de régression :  $\log \text{Alt.} = 0,959 \log \text{Réf.} + 0,250$

Les biais entre les deux méthodes sont compris entre 0,002 et 0,133 en log de CFU/g. Toutes matrices confondues, la répétabilité est de 0,161 pour la méthode de référence et de 0,178 pour la méthode alternative.

### Ensemencement en surface :

L'hypothèse [a=0 et b=1] est acceptée pour toutes les matrices à l'exception de la catégorie « Produits laitiers ». Toutefois, l'équation de la droite et le coefficient de corrélation sont satisfaisants pour cette catégorie :

Coefficient de corrélation :  $r = 0,998$

Equation de la droite de régression :  $\log \text{Alt.} = 1,053 \log \text{Réf.} - 0,242$

Les biais entre les deux méthodes sont compris entre 0,116 et +0,182 en log de CFU/g. Toutes matrices confondues, la répétabilité est de 0,161 pour la méthode de référence et de 0,238 pour la méthode alternative.

L'exactitude relative de la méthode relative apparaît satisfaisante quel que soit la matrice et le type d'ensemencement.

Le tableau suivant résume les différentes équations obtenues.

|                             | <b>Ensemencement en masse</b>                       | <b>Ensemencement en surface</b>                     |
|-----------------------------|---|---|
| <b>Produits carnés</b>      | $\log \text{Alt.} = 0,959 \log \text{Réf.} + 0,250$ | $\log \text{Alt.} = 1,024 \log \text{Réf.} + 0,068$ |
| <b>Produits laitiers</b>    | $\log \text{Alt.} = 1,024 \log \text{Réf.} - 0,050$ | $\log \text{Alt.} = 1,053 \log \text{Réf.} - 0,242$ |
| <b>Produits de la mer</b>   | $\log \text{Alt.} = 0,977 \log \text{Réf.} + 0,113$ | $\log \text{Alt.} = 1,004 \log \text{Réf.} + 0,018$ |
| <b>Produits végétaux</b>    | $\log \text{Alt.} = 1,028 \log \text{Réf.} - 0,035$ | $\log \text{Alt.} = 0,986 \log \text{Réf.} + 0,091$ |
| <b>Alimentation animale</b> | $\log \text{Alt.} = 0,987 \log \text{Réf.} + 0,060$ | $\log \text{Alt.} = 1,018 \log \text{Réf.} - 0,180$ |
| <b>Tous produits</b>        | $\log \text{Alt.} = 0,994 \log \text{Réf.} + 0,074$ | $\log \text{Alt.} = 0,990 \log \text{Réf.} + 0,043$ |

## 2.2. Linéarité

La linéarité est définie comme l'aptitude de la méthode à fournir des résultats proportionnels à la quantité de microorganismes présents dans l'échantillon, c'est-à-dire qu'à une augmentation de l'analyte correspond une augmentation linéaire ou proportionnelle des résultats.

### 2.2.1. Matrices utilisées et niveaux de contamination

Cinq types de matrices ont été sélectionnés dans les 5 catégories de produits à tester avec cinq niveaux de contamination par matrice.

Les matrices testées sont : de la viande hachée, du lait pasteurisé, du poisson cru, des légumes surgelés et un aliment pour chat.

La gamme de contamination varie entre  $5,0 \cdot 10^1$  UFC / g et  $1,0 \cdot 10^5$  UFC / g.

Cinq souches d'*Escherichia coli* de différentes origines ont été utilisées pour contaminer les matrices à différentes concentrations.

Chaque essai a été réalisé en double par les deux méthodes.

| <b>Matrice</b>    | <b>Souche</b>                 | <b>Origine de la souche</b> | <b>Taux d'inoculation (UFC/g)</b> |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Viande hachée     | <i>Escherichia coli</i> – I59 | Bœuf                        | $5,0 \cdot 10^1 - 5,0 \cdot 10^2$ |
| Lait pasteurisé   | <i>Escherichia coli</i> – I69 | Cantal au lait cru          | $1,0 \cdot 10^2 - 1,0 \cdot 10^3$ |
| Poisson cru       | <i>Escherichia coli</i> – R3  | CIP 54.127                  | $5,0 \cdot 10^2 - 5,0 \cdot 10^3$ |
| Légumes surgelés  | <i>Escherichia coli</i> – I2  | Carottes râpées             | $1,0 \cdot 10^3 - 1,0 \cdot 10^4$ |
| Aliment pour chat | <i>Escherichia coli</i> – I58 | Granulés de boeuf           | $1,0 \cdot 10^4 - 1,0 \cdot 10^5$ |

### 2.2.2. Résultats bruts

Les interprétations statistiques sont réalisées conformément aux exigences de la norme NF ISO 16140.

Le choix de la méthode de régression linéaire se fait par rapport à la valeur du rapport R des écart-types de répétabilité globale :

- si  $R > 2$ , une régression linéaire par les moindres carrés (OLS 1) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode de référence,
- si  $R < 0,5$ , une régression linéaire par les moindres carrés (OLS 2) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode alternative,
- si  $0,5 < R < 2$ , une régression orthogonale (GMFR) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode de référence.

Les graphiques bidimensionnels obtenus à partir de ces résultats sont présentés en annexe B

**Tableau 5 : Données statistiques pour l'ensemencement en masse**

| Matrice         | rob. R | Régression utilisée | F critique | Rob. F | p (Rob. F) | Coefficient de corrélation | Droite de régression              |
|-----------------|--------|---------------------|------------|--------|------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Viande hachée   | 1,461  | GMFR                | 5,41       | 6,138  | 0,040      | 0,995                      | log Alt. = 0,969 log Réf. + 0,193 |
| Lait pasteurisé | 1,057  | GMFR                |            | 7,486  | 0,027      | 0,998                      | log Alt. = 0,990 log Réf. + 0,063 |
| Poisson cru     | 0,994  | GMFR                |            | 14,308 | 0,007      | 0,992                      | log Alt. = 0,948 log Réf. + 0,215 |
| Légumes surg.   | 0,981  | GMFR                |            | 7,158  | 0,029      | 0,998                      | log Alt. = 1,012 log Réf. - 0,018 |
| Aliment - chat  | 1,503  | GMFR                |            | 9,473  | 0,017      | 0,998                      | log Alt. = 1,018 log Réf. + 0,010 |

**Tableau 6 : Données statistiques pour l'ensemencement en surface**

| Matrice         | rob. R | Régression utilisée | F critique | Rob. F | p (Rob. F) | Coefficient de corrélation | Droite de régression              |
|-----------------|--------|---------------------|------------|--------|------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Viande hachée   | 0,875  | GMFR                | 5,41       | 2,162  | 0,211      | 0,995                      | log Alt. = 1,098 log Réf. - 0,182 |
| Lait pasteurisé | 2,335  | OLS                 |            | 0,140  | 0,418      | 0,994                      | log Alt. = 0,955 log Réf. + 0,183 |
| Poisson cru     | 2,543  | OLS                 |            | 0,932  | 0,490      | 0,998                      | log Alt. = 1,069 log Réf. - 0,169 |
| Légumes surg.   | 1,984  | GMFR                |            | 10,11  | 0,015      | 0,993                      | log Alt. = 0,963 log Réf. + 0,186 |
| Aliment - chat  | 0,446  | OLS                 |            | 6,169  | 0,039      | 0,999                      | log Alt. = 1,010 log Réf. - 0,023 |

Test de non-linéarité

$P > 0,05$  : non significatif,  $0,01 < P < 0,05$  : significatif et  $P < 0,01$  : très significatif

### 2.2.3. Conclusion

Pour la modalité d'ensemencement en masse, pour toutes les matrices testées, la relation entre les deux méthodes est non linéaire au risque  $\alpha$  de 5%. Les coefficients de corrélation ( $r > 0,992$ ) et les équations des droites de régression sont toutefois satisfaisants.

En ce qui concerne l'ensemencement en surface, la relation est linéaire entre les deux méthodes au risque  $\alpha$  de 5% pour les matrices « Viande hachée », « Lait pasteurisé » et « Poisson cru ». Pour les deux autres matrices, bien que le test de non-linéarité soit significatif, les droites de régression et les coefficients de corrélation ( $r > 0,99$ ) correspondants sont satisfaisants.

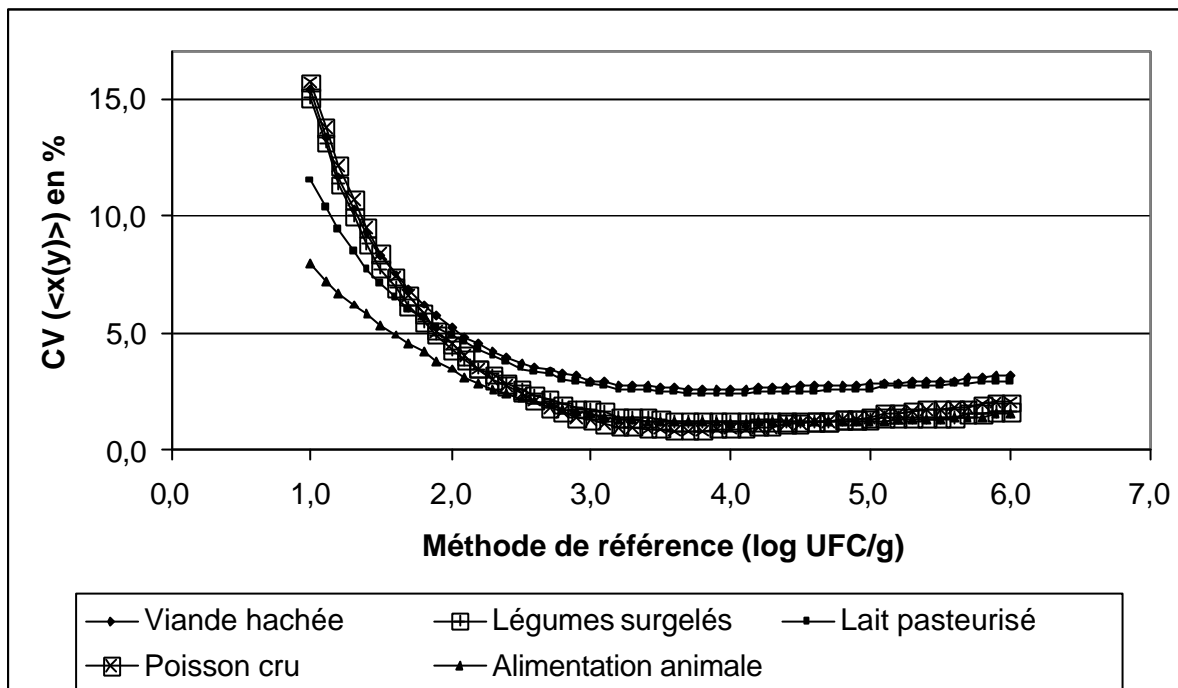
La linéarité de la méthode alternative apparaît satisfaisante.

## **2.3. Sensibilité relative**

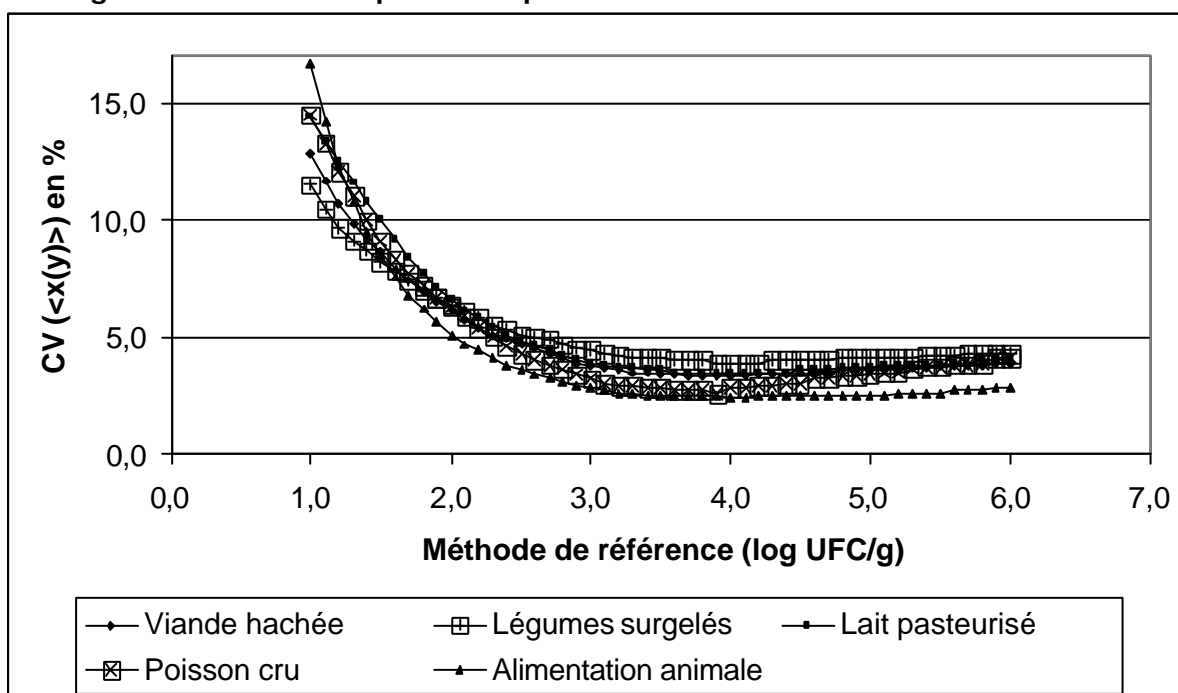
La sensibilité est définie comme la capacité de la méthode alternative à détecter deux quantités différentes d'analyte qui ont été mesurées par la méthode de référence pour une matrice donnée sur toute l'étendue de mesure.

Pour chaque matrice testée dans l'étude de linéarité, des profils de précision sont présentés sur les graphiques suivants.

**Figure 5 – Profils de précision par matrice – Ensemencement en masse**



**Figure 6 – Profils de précision par matrice – Ensemencement en surface**



#### **2.4. Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ)**

Le niveau critique est défini comme la plus petite quantité qui peut être détectée (non nulle), mais non quantifiée comme une valeur exacte. La limite de détection est définie comme le niveau supérieur au niveau critique. La limite de quantification est définie

comme la plus petite quantité d'analyte qui peut être mesurée et quantifiée avec une exactitude et une fidélité définies dans les conditions expérimentales.

#### 2.4.1. Protocole d'essais

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées en analysant des cultures pures d'une souche d'*Escherichia coli* (I49) par la méthode alternative.

Cinq niveaux de contamination ont été étudiés, avec six répétitions pour chaque niveau.

Les essais ont été réalisés avec les deux types d'ensemencement testés.

Ensemencement en masse : 1 ml d'une suspension calibrée a été inoculé pour les différents niveaux.

Ensemencement en surface : 0,1 ml d'une suspension calibrée (10 fois plus concentrée que celle utilisée pour l'ensemencement en masse) ont été inoculés pour les différents niveaux.

#### 2.4.2. Résultats

Les résultats bruts sont présentés dans l'annexe 6 et la synthèse dans les tableaux suivants.

La limite critique (LC), la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été calculées à partir des valeurs obtenues pour le niveau 0,5.

**Tableau 7 : Données ( $S_0$  et  $X_0$ ) pour les ensemencements en masse**

| Niveau (CFU / mL) | Nombre d'échantillons positifs | Ecart-type ( $S_0$ ) | Biais ( $X_0$ ) |
|-------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------|
| 0                 | 0/6                            | 0,000                | 0,000           |
| 0,2               | 0/6                            | 0,000                | 0,000           |
| 0,5               | 4/6                            | 0,894                | 1,000           |
| 1                 | 5/6                            | 1,049                | 1,500           |
| 5                 | 6/6                            | 3,430                | 6,000           |

**Tableau 8 : Valeurs obtenues pour les ensemencements en masse**

|                                       | Formules         | Valeur obtenue |
|---------------------------------------|------------------|----------------|
| <b>Niveau critique (LC)</b>           | $1,65 S_0 + X_0$ | 2,48           |
| <b>Limite de détection (LOD)</b>      | $3,3 S_0 + X_0$  | 3,95           |
| <b>Limite de quantification (LOQ)</b> | $10 S_0 + X_0$   | 9,94           |

**Tableau 9 : Données ( $S_0$  et  $X_0$ ) pour les ensemencements en surface**

| Niveau (CFU / mL) | Nombre d'échantillons positifs | Ecart-type ( $S_0$ ) | Biais ( $X_0$ ) |
|-------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------|
| 0                 | 0/6                            | -                    | -               |
| 0,2               | 0/6                            | 0,000                | 0,000           |
| 0,5               | 3/6                            | 1,761                | 1,000           |
| 1                 | 4/6                            | 1,722                | 3,000           |
| 5                 | 6/6                            | 1,761                | 4,000           |

**Tableau 10 : Valeurs obtenues pour les ensemencements en surface (pour 0,1 mL)**

|                                       | <b>Formules</b>  | <b>Valeur obtenue</b> |
|---------------------------------------|------------------|-----------------------|
| <b>Niveau critique (LC)</b>           | $1,65 S_0 + X_0$ | 3,91                  |
| <b>Limite de détection (LOD)</b>      | $3,3 S_0 + X_0$  | 6,81                  |
| <b>Limite de quantification (LOQ)</b> | $10 S_0 + X_0$   | 18,61                 |

## **2.5. Spécificité / sélectivité**

La spécificité est définie comme la capacité de la méthode à mesurer avec exactitude un analyte donné, ou sa quantité dans l'échantillon sans interférences avec les composants non cibles. La sélectivité est définie comme la capacité de la méthode à mesurer l'analyte recherché exclusivement.

### 2.5.1. Protocole d'essais

Cinquante souches cibles et vingt souches non cibles (provenant des collections nationale, internationale et interne à l'ISHA) ont été analysées. Les essais ont été réalisés avec des ensemencements en masse pour la méthode alternative.

### 2.5.2. Résultats

Les résultats sont présentés en annexe 7.

Sur les cinquante souches cibles testées, toutes les colonies dénombrées sont caractéristiques sur milieu REBECCA™ (couleur bleue pour les *E. coli* β-D-glucuronidase positive).

Sur les vingt souches non cibles testées, aucune croissance n'est observée sur le milieu REBECCA™ à l'exception d'une souche. En effet, pour la souche de *Shigella sonnei* R80 (ATCC 9290), on observe des colonies caractéristiques à la fois sur le milieu TBX et sur le milieu REBECCA. Cependant, il est mentionné dans la littérature que certaines souches de *Shigella*, et notamment de *Shigella sonnei*, possèdent une activité β-D-glucuronidase, ce qui peut expliquer la présence de ces colonies caractéristiques.

## **3. Praticabilité**

La praticabilité est étudiée en renseignant les 13 critères définis par le Bureau Technique.

### 1- Mode de conditionnement des éléments de la méthode

Le milieu gélosé REBECCA™ est conditionné en flacons.

### 2- Volume des réactifs

Les flacons de gélose REBECCA™ contiennent 200 ml de milieu et chaque carton contient 6 flacons de milieu.

### 3- Conditions de stockage des éléments (péremption des produits non ouverts)

La température de stockage des réactifs est comprise entre 2 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les flacons, boîtes et cartons. Les indications de préparation et de stockage sont mentionnées dans la notice dans les paragraphes « Conservation et stockage » et « Limites et précautions ».

### 4- Modalités d'utilisation après première utilisation

La gélose peut subir au plus 2 cycles de régénération à 100 °C et peut être maintenue en surfusion au bain-marie pendant 7 heures maximum. Cette instruction est indiquée sur la notice dans le paragraphe « Limites et précautions ».

5- Equipements ou locaux spécifiques nécessaires

L'utilisation du milieu REBECCA™ ne nécessite pas d'équipements ou de locaux spécifiques.

6- Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer

Sans objet

7- Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode

L'utilisation du milieu REBECCA™ ne nécessite pas de formation spécifique. La durée de formation est estimée à une demi-journée.

8- Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique

Le gain de temps est obtenu par le fait qu'une seule boîte est dénombrée par dilution.

| Etape        | Temps en minutes     |             |                     |             |
|--------------|----------------------|-------------|---------------------|-------------|
|              | Méthode de référence |             | Méthode alternative |             |
|              | 1 analyse            | 20 analyses | 1 analyse           | 20 analyses |
| Pesée        | 1,5                  | 25          | 1,5                 | 25          |
| Broyage      | 1                    | 18          | 1                   | 18          |
| Analyse      | 3                    | 40          | 2                   | 35          |
| Lecture      | 3,5                  | 45          | 1,5                 | 25          |
| <b>Total</b> | <b>9</b>             | <b>128</b>  | <b>6</b>            | <b>103</b>  |

9- Délai d'obtention des résultats

|                | Méthode de référence | Méthode alternative |
|----------------|----------------------|---------------------|
| Pesée, broyage | J0                   | J0                  |
| Analyse        | J0                   | J0                  |
| Lecture        | J1                   | J1                  |

10- Type de qualification de l'opérateur

Niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence.

11- Etapas communes avec la méthode de référence

Les étapes communes sont : la pesée, le préparation de la suspension mère et les dilutions décimales.

12- Traçabilité des résultats d'analyse

Aucune procédure de traçabilité n'est proposée. Le laboratoire doit utiliser ses procédures internes.

13- Maintenance par le laboratoire

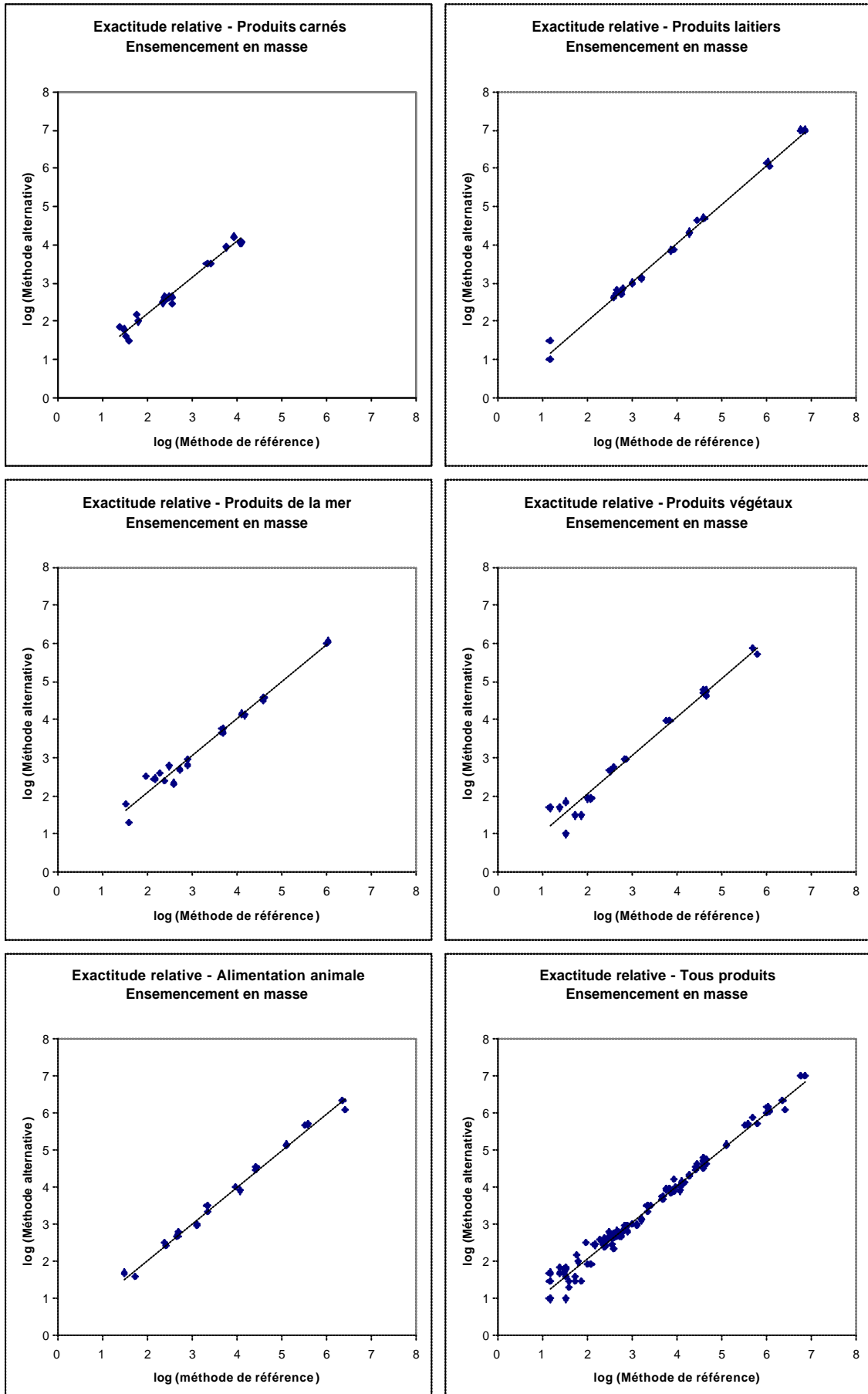
Sans objet.

## 4. Etude collaborative

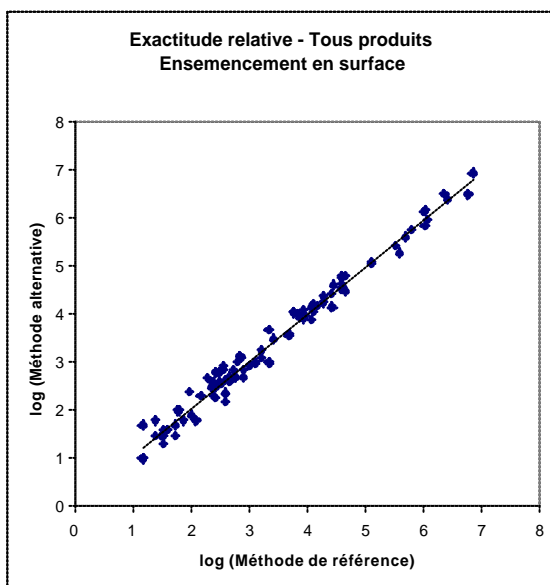
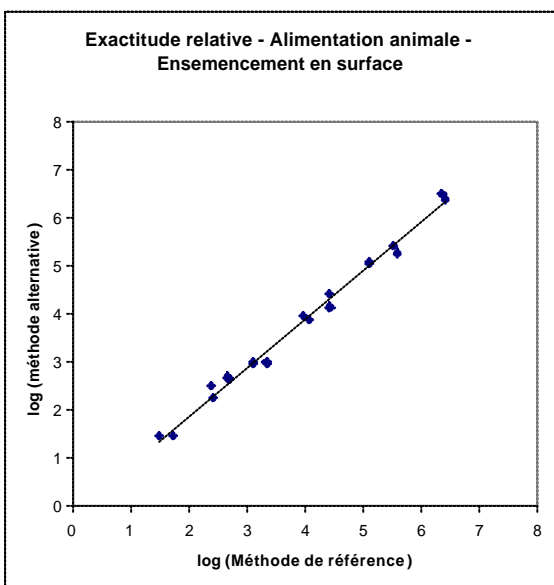
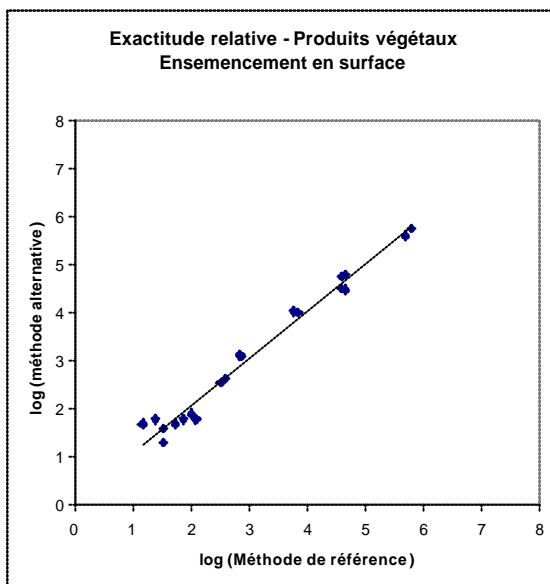
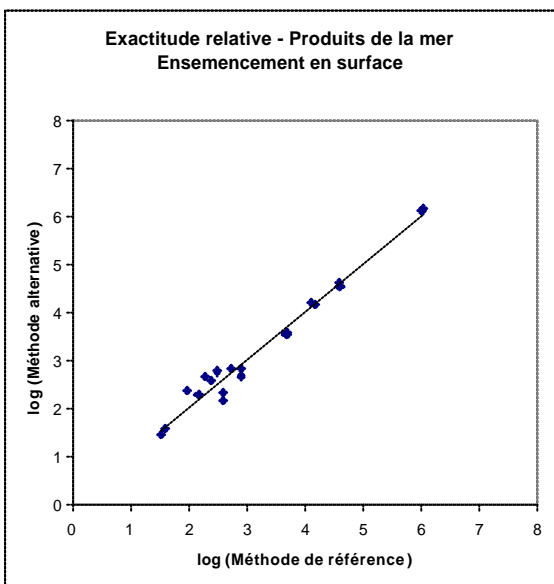
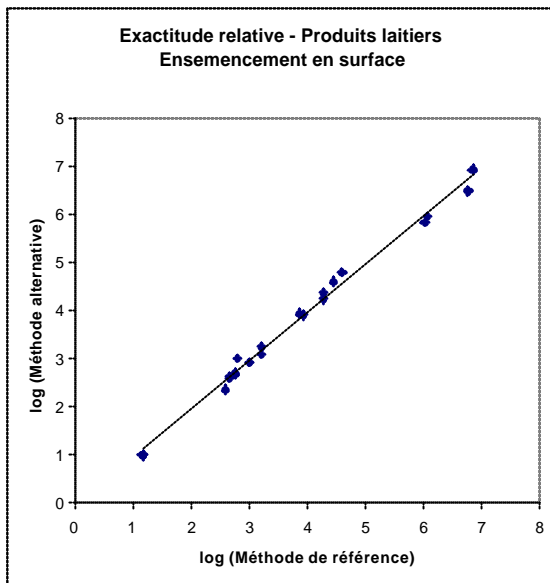
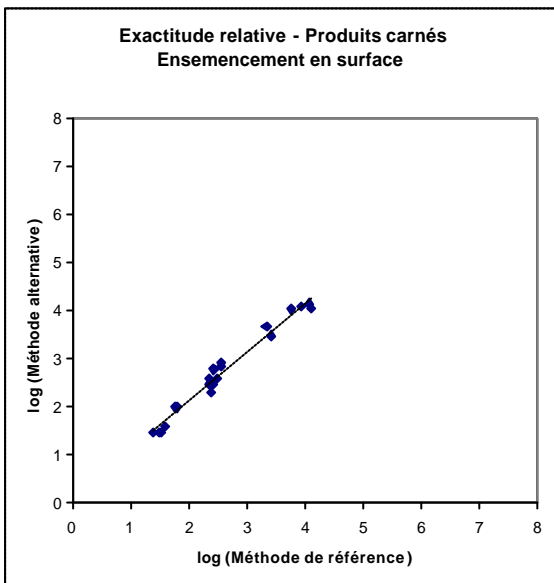
Suite à l'accord du Bureau technique, l'étude collaborative de la méthode REBECCA a été réalisée sur le milieu gélosé REBECCA supplémenté pour le dénombrement des E. coli à  $\beta$ -glucuronidase positive et des entérobactéries.

**ANNEXE A**  
**EXACTITUDE RELATIVE**  
**GRAPHIQUES BIDIMENSIONNELS**

## Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en masse



**Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en surface**

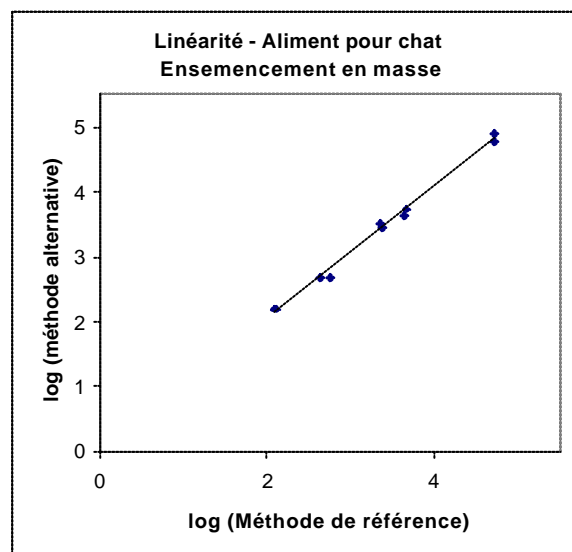
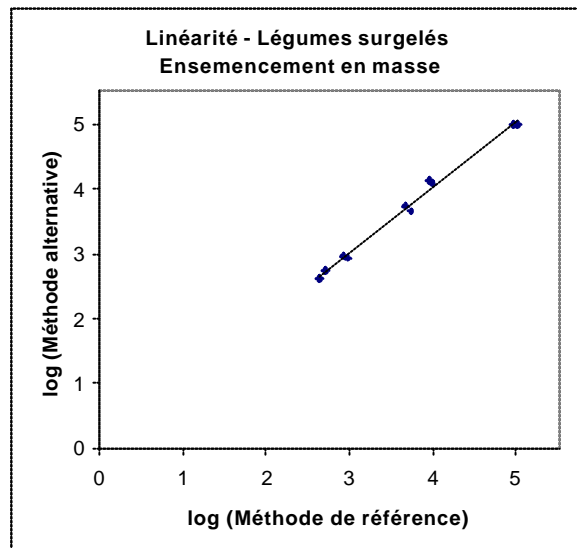
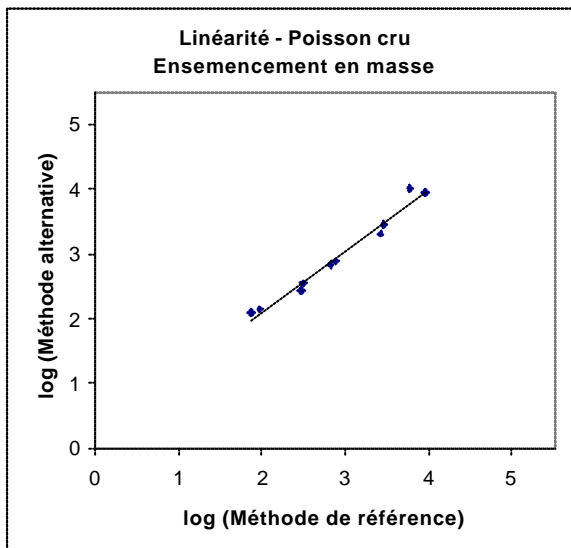
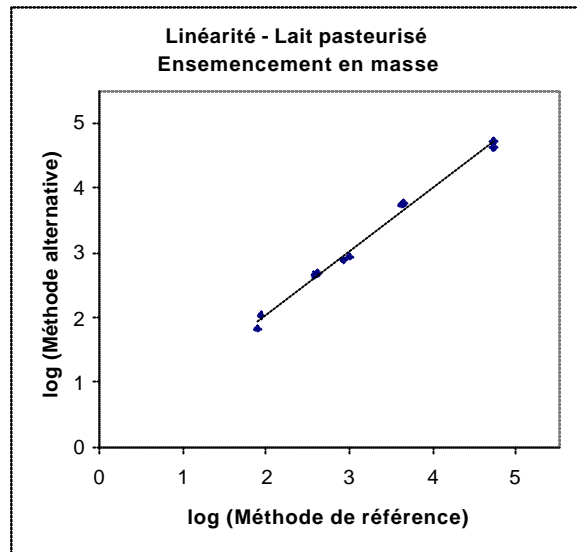
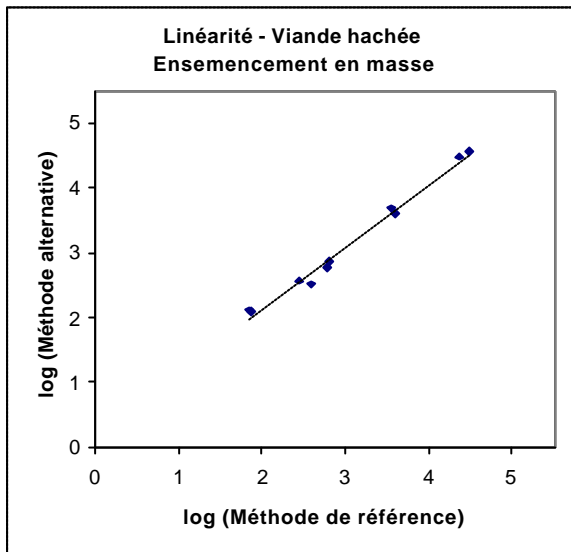


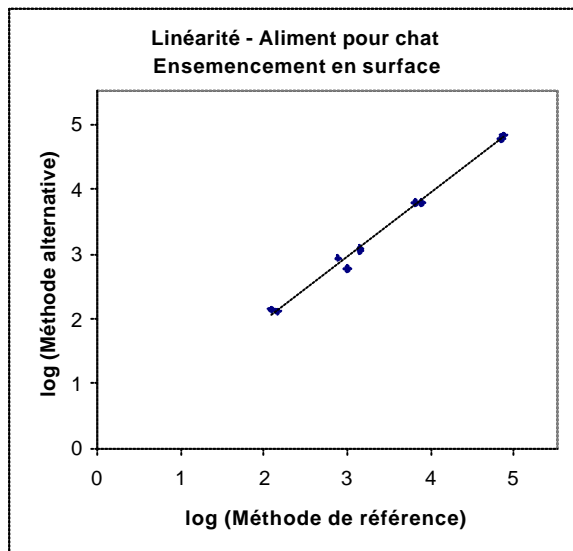
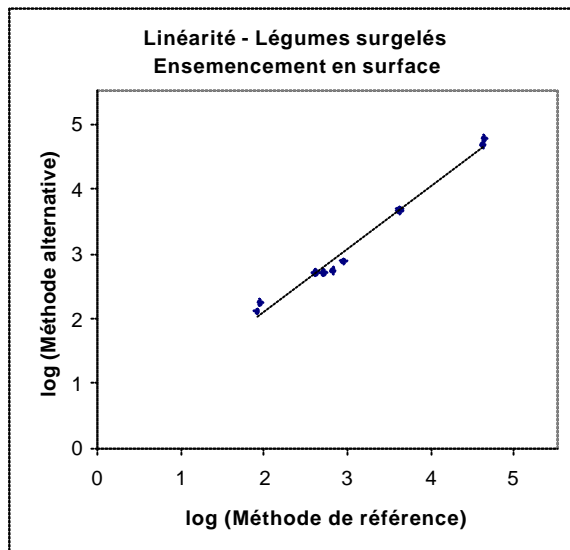
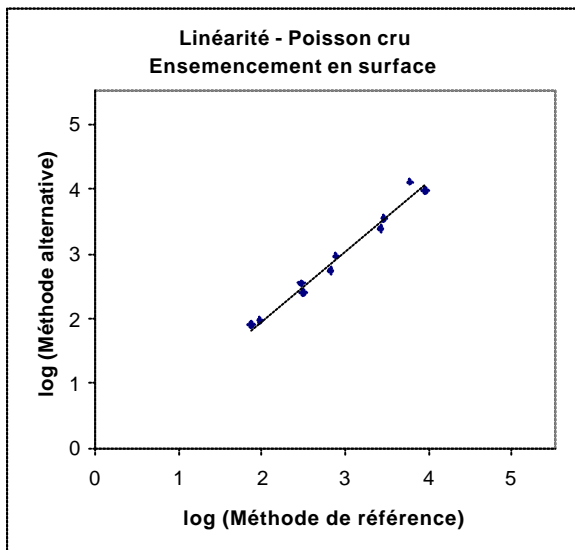
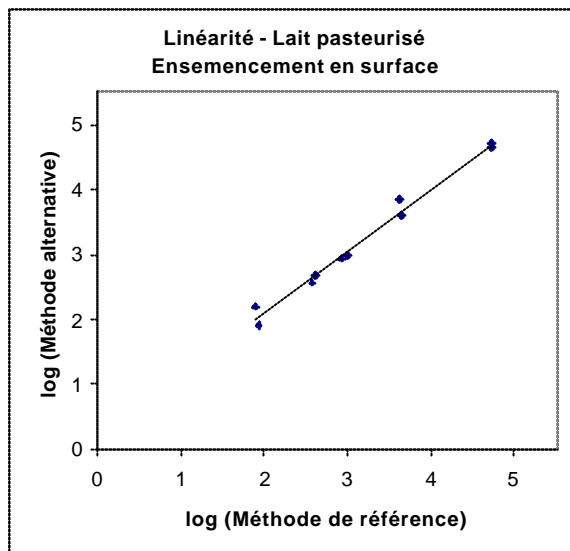
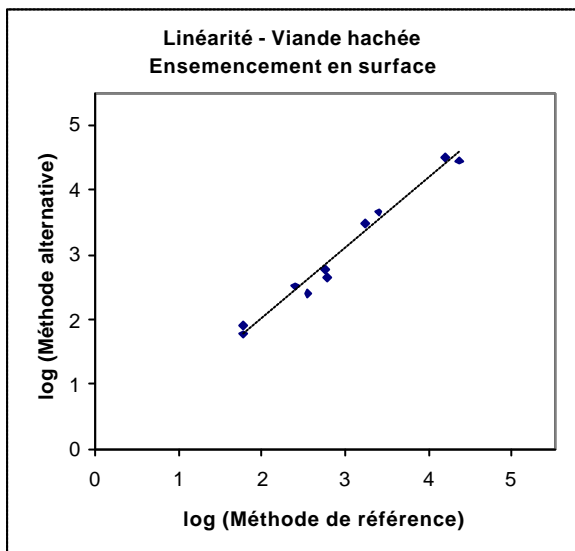
**ANNEXE B**

**LINEARITE**

**GRAPHIQUES BIDIMENSIONNELS**

### Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en masse



**Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en surface**

## **CONFIDENTIEL**

**ETUDE DE LA VALIDATION AFAQ AFNOR  
CERTIFICATION DU TEST REBECCA + EB  
POUR LE DENOMBREMENT DES  
*ESCHERICHIA COLI* SELON LA NORME  
NF ISO 16140**

## **RAPPORT DE SYNTHÈSE**

Ce rapport d'analyse ne concerne que les objets soumis aux analyses. Sa reproduction n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral. Il comporte 18 pages (hors annexes).

Seuls certains essais rapportés dans ce document sont couverts par l'accréditation de la Section Laboratoire du COFRAC. Ils sont identifiés par le symbole (\*)

Essais réalisés à l'ISHA : 25, avenue de la République 91300 Massy

Fabricant : **AES CHEMUNEX**

Route de Dol – BP 54  
35270 COMBOURG

Laboratoire expert : **I. S. H. A.**

25, avenue de la République  
91300 MASSY

En vue de la validation AFAQ AFNOR Certification selon la norme  
NF ISO 16140 du test REBECCA™ + EB pour le dénombrement  
des *Escherichia coli*

## SOMMAIRE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introduction</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.1. Référentiel de validation</b>                              | <b>4</b>  |
| <b>1.2. Méthode alternative</b>                                    | <b>4</b>  |
| <b>1.3. Domaine d'application</b>                                  | <b>4</b>  |
| <b>1.4. Méthode de référence (*)</b>                               | <b>4</b>  |
| <b>2. Etude comparative des deux méthodes</b>                      | <b>4</b>  |
| <b>2.1. Exactitude relative</b>                                    | <b>4</b>  |
| 2.1.1. Nombre et nature des échantillons                           | 4         |
| 2.1.2. Résultats   | 5         |
| 2.1.3. Conclusion  | 6         |
| <b>2.2. Linéarité</b>  | <b>7</b>  |
| 2.2.1. Matrices utilisées et niveaux de contamination              | 7         |
| 2.2.2. Résultats bruts   | 7         |
| 2.2.3. Conclusion  | 8         |
| <b>2.3. Sensibilité relative</b>                                   | <b>8</b>  |
| <b>2.4. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)</b>  | <b>9</b>  |
| 2.4.1. Protocole d'essais  | 9         |
| 2.4.2. Résultats   | 10        |
| <b>2.5. Spécificité / sélectivité</b>                              | <b>10</b> |
| 2.5.1. Protocole d'essais  | 11        |
| 2.5.2. Résultats   | 11        |
| <b>3. Praticabilité</b>  | <b>11</b> |
| <b>4. Etude collaborative</b>                                      | <b>12</b> |
| <b>4.1. Préparation</b>  | <b>12</b> |
| <b>4.2. Résultats</b>  | <b>12</b> |
| 4.2.1. Dénombrement de la flore aérobique mésophile totale         | 12        |
| 4.2.2. Synthèse des résultats obtenus par les laboratoires         | 13        |
| <b>4.3. Interprétation statistique</b>                             | <b>13</b> |
| 4.3.1. Exactitude relative   | 13        |
| 4.3.2. Répétabilité  | 13        |
| 4.3.3. Reproductibilité  | 14        |
| 4.3.4. Dispersion entre les laboratoires                           | 15        |
| 4.3.5. Rapport reproductibilité / répétabilité                     | 15        |
| <b>5. Conclusions</b>  | <b>16</b> |
| <b>5.1. Conclusions de l'étude comparative</b>                     | <b>16</b> |
| <b>5.2. Conclusions de l'étude collaborative</b>                   | <b>16</b> |
| <b>Annexe A : Exactitude relative – Graphiques bidimensionnels</b> | <b>17</b> |
| <b>Annexe B : Linéarité – Graphiques bidimensionnels</b>           | <b>20</b> |

# **1. Introduction**

## **1.1. Référentiel de validation**

L'étude préliminaire a pour but d'évaluer les performances du test REBECCA™ + EB pour le dénombrement des *E. coli* par rapport à la méthode de référence NF ISO 16649-2 selon le référentiel NF ISO 16140.

Les caractéristiques suivantes sont étudiées :

- L'exactitude relative,
- La linéarité,
- La sensibilité relative,
- Les limites de détection et de quantification
- La sélectivité (inclusivité et exclusivité),
- La praticabilité.

## **1.2. Méthode alternative**

REBECCA (**R**apid **E**nterobacteria **E**scherichia **C**oli **C**oliform **A**gar) est un milieu chromogénique pour le dénombrement **sans confirmation** dans les produits d'alimentations humaine et animale des *E. coli*  $\beta$ -D-glucuronidase positive. Dans le cadre de la validation, deux types d'ensemencements ont été testés : l'ensemencement en profondeur et l'ensemencement en surface.

La notice d'utilisation de la méthode alternative est présentée en annexe 1.

## **1.3. Domaine d'application**

Tous produits d'alimentation humaine et animale.

## **1.4. Méthode de référence (\*)**

La norme NF ISO 16649-2 (2001) : méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive – technique par comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -glucuronate a été appliquée.

# **2. Etude comparative des deux méthodes**

## **2.1. Exactitude relative**

L'exactitude relative est définie comme l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

### **2.1.1. Nombre et nature des échantillons**

Cinq catégories d'échantillons d'alimentation humaine et animale ont été testées en parallèle (analyse en double) avec la méthode de référence et la méthode alternative. Les différents types de produits analysés pour chaque catégorie sont résumés dans le tableau suivant.

| Catégories           | Types                                | Echantillons analysés | Echantillons exploités |
|----------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| Produits carnés      | Viandes crues                        | 9                     | 4                      |
|                      | Charcuterie                          | 6                     | 4                      |
|                      | Plats cuisinés                       | 4                     | 2                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>19</b>             | <b>10</b>              |
| Produits laitiers    | Crème                                | 1                     | 0                      |
|                      | Fromage                              | 13                    | 11                     |
|                      | Glace                                | 1                     | 0                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>15</b>             | <b>11</b>              |
| Produits de la mer   | Poissons                             | 4                     | 3                      |
|                      | Plats cuisinés                       | 10                    | 6                      |
|                      | Crustacés                            | 5                     | 1                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>19</b>             | <b>10</b>              |
| Produits végétaux    | Plats cuisinés et salades de légumes | 14                    | 8                      |
|                      | Préparations à base de fruits        | 3                     | 2                      |
|                      | Végétaux                             | 1                     | 0                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>18</b>             | <b>10</b>              |
| Alimentation animale | Viande crue                          | 4                     | 0                      |
|                      | Pâtée pour chat                      | 6                     | 2                      |
|                      | Pâtée pour chien                     | 2                     | 2                      |
|                      | Farine animale                       | 6                     | 5                      |
|                      | Croquettes                           | 1                     | 1                      |
|                      | <b>Total</b>                         | <b>19</b>             | <b>10</b>              |
| <b>Total</b>         |                                      | <b>90</b>             | <b>51</b>              |

Pour chaque catégorie, au moins 10 résultats exploitables ont été obtenus. Les différents échantillons analysés sont représentatifs de la gamme de contaminations habituellement rencontrées pour ce type d'analyse.

Les échantillons non exploités correspondent soit à une absence du microorganisme cible dans la matrice analysée soit à des résultats ininterprétables.

Au total, 90 échantillons ont été analysés et 51 résultats sont exploités. Le taux d'échantillons naturellement contaminés est de 80%.

Dix échantillons ont été artificiellement contaminés, les stress appliqués et les souches utilisées sont résumés dans le tableau suivant.

| Souche utilisée (origine)                                 | Stress appliqué    | log MNS – log MS | Echantillon concerné      |
|---|--------------------|------------------|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> – 158 (Granulés de bœuf)          | 20 min. à 56°C     | 0,80             | RD 1430, RD 1431          |
| <i>Escherichia coli</i> – 172 (Crevettes crues)           | 20 min. à 56°C     | 0,80             | RD 1427, RD 1428, RD 1429 |
| <i>Escherichia coli</i> – 163 (Porc haché)                | 2 semaines à -20°C | 0,76             | RD 1435, RD 1436          |
| <i>Escherichia coli</i> – 179 (Crevette crue décortiquée) | 2 semaines à -20°C | 0,60             | RD 1432, RD 1433, RD 1434 |

### 2.1.2. Résultats

Les résultats bruts et les calculs statistiques sont résumés dans les tableaux 1 à 4. Les graphiques bidimensionnels obtenus à partir de ces résultats sont présentés en annexe A.

**Tableau 1 : Données statistiques pour l'ensemencement en masse**

| Matrice            | rob. R | Régression utilisée | T critique | a      | t(a)  | b     | t(b)  | P %          |           |
|--------------------|--------|---------------------|------------|--------|-------|-------|-------|--------------|-----------|
|                    |        |                     |            |        |       |       |       | Ordonnée à 0 | Pente à 1 |
| Produits carnés    | 3,134  | OLS                 | 2,306      | -0,018 | 0,180 | 1,042 | 1,162 | 86           | 26        |
| Produits laitiers  | 1,906  | GMFR                | 2,262      | -0,181 | 2,837 | 1,045 | 2,848 | 1            | 1         |
| Produits de la mer | 1,395  | GMFR                | 2,306      | 0,061  | 0,303 | 0,996 | 0,063 | 77           | 95        |
| Produits végétaux  | 1,695  | GMFR                | 2,306      | -0,034 | 0,470 | 1,015 | 0,718 | 64           | 48        |
| Alim. animale      | 2,169  | OLS                 | 2,306      | 0,126  | 1,614 | 0,989 | 0,594 | 12           | 56        |
| Toutes matrices    | 1,410  | GMFR                | 2,007      | -0,002 | 0,036 | 1,014 | 1,026 | 97           | 31        |

**Tableau 2 : Biais et répétabilité des deux méthodes (ensemencement en masse)**

| Matrice              | Biais (D) en log |        | Répétabilité en log |       |        |       |
|----------------------|------------------|--------|---------------------|-------|--------|-------|
|                      | Moyen            | Médian | r                   |       | Rob. r |       |
|                      |                  |        | MR                  | MA    | MR     | MA    |
| Produits carnés      | 0,092            | 0,086  | 0,179               | 0,363 | 0,149  | 0,467 |
| Produits laitiers    | -0,012           | 0,023  | 0,140               | 0,200 | 0,108  | 0,206 |
| Produits de la mer   | 0,049            | 0,004  | 0,219               | 0,187 | 0,145  | 0,202 |
| Produits végétaux    | 0,013            | 0,027  | 0,288               | 0,469 | 0,249  | 0,423 |
| Alimentation animale | 0,082            | 0,045  | 0,186               | 0,235 | 0,122  | 0,265 |
| Toutes matrices      | 0,044            | 0,048  | 0,207               | 0,308 | 0,161  | 0,227 |

MR : méthode de référence, Ma : méthode alternative

**Tableau 3 : Données statistiques pour l'ensemencement en surface**

| Matrice            | rob. R | Régression utilisée | T critique | a      | t(a)  | b     | t(b)  | P %          |           |
|--------------------|--------|---------------------|------------|--------|-------|-------|-------|--------------|-----------|
|                    |        |                     |            |        |       |       |       | Ordonnée à 0 | Pente à 1 |
| Produits carnés    | 2,514  | OLS                 | 2,306      | -0,018 | 0,192 | 1,032 | 0,950 | 85           | 36        |
| Produits laitiers  | 2,808  | OLS                 | 2,262      | -0,064 | 0,686 | 0,989 | 0,479 | 50           | 64        |
| Produits de la mer | 0,946  | GMFR                | 2,306      | 0,110  | 0,527 | 0,978 | 0,373 | 61           | 71        |
| Produits végétaux  | 1,011  | GMFR                | 2,306      | 0,059  | 0,466 | 0,978 | 0,581 | 65           | 57        |
| Alim. animale      | 2,405  | OLS                 | 2,306      | -0,113 | 1,105 | 1,001 | 0,055 | 28           | 96        |
| Toutes matrices    | 1,731  | GMFR                | 2,007      | 0,043  | 0,725 | 0,980 | 1,249 | 47           | 22        |

**Tableau 4 : Biais et répétabilité des deux méthodes (ensemencement en surface)**

| Matrice              | Biais (D) en log |        | Répétabilité en log |       |        |       |
|----------------------|------------------|--------|---------------------|-------|--------|-------|
|                      | Moyen            | Médian | r                   |       | Rob. r |       |
|                      |                  |        | MR                  | MA    | MR     | MA    |
| Produits carnés      | 0,068            | 0,074  | 0,179               | 0,323 | 0,149  | 0,375 |
| Produits laitiers    | -0,106           | -0,105 | 0,140               | 0,445 | 0,108  | 0,304 |
| Produits de la mer   | 0,037            | 0,001  | 0,219               | 0,155 | 0,145  | 0,137 |
| Produits végétaux    | -0,008           | 0,021  | 0,288               | 0,308 | 0,249  | 0,252 |
| Alimentation animale | -0,108           | -0,066 | 0,186               | 0,280 | 0,122  | 0,294 |
| Toutes matrices      | -0,025           | -0,023 | 0,207               | 0,319 | 0,161  | 0,278 |

### 2.1.3. Conclusion

Pour toutes les matrices et quel que soit le type d'ensemencement, les deux hypothèses [a=0 et b=1] sont acceptées, à l'exception de la matrice «Produits laitiers» avec la modalité d'ensemencement en masse où l'hypothèse est refusée. Toutefois, l'équation de la droite et le coefficient de corrélation correspondants à cette catégorie sont satisfaisants :

Coefficient de corrélation :  $r = 0,999$

Equation de la droite de régression :  $\log \text{Alt.} = 1,045 \log \text{Réf.} - 0,181$

Les biais entre les deux méthodes sont compris entre -0,004 et 0,086 en log d'UFC/g pour l'ensemencement en masse et entre -0,105 et +0,074 en log d'UFC/g pour l'ensemencement en surface.

Toutes matrices confondues, la répétabilité est de 0,161 pour la méthode de référence et celle de la méthode alternative est de 0,227 (ensemencement en masse) et de 0,278 (ensemencement en surface).

Le tableau suivant résume les différentes équations obtenues.

|                    | Ensemencement en masse            | Ensemencement en surface          |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Produits carnés    | log Alt. = 1,042 log Réf. – 0,018 | log Alt. = 1,032 log Réf. – 0,018 |
| Produits laitiers  | log Alt. = 1,045 log Réf. – 0,181 | log Alt. = 0,989 log Réf. – 0,064 |
| Produits de la mer | log Alt. = 0,996 log Réf. + 0,061 | log Alt. = 0,978 log Réf. + 0,110 |
| Produits végétaux  | log Alt. = 1,015 log Réf. – 0,034 | log Alt. = 0,978 log Réf. + 0,059 |
| Alim. animale      | log Alt. = 0,989 log Réf. + 0,126 | log Alt. = 1,001 log Réf. – 0,113 |
| Tous produits      | log Alt. = 1,014 log Réf. – 0,002 | log Alt. = 0,980 log Réf. + 0,043 |

L'exactitude relative de la méthode apparaît satisfaisante.

## 2.2. Linéarité

La linéarité est définie comme l'aptitude de la méthode à fournir des résultats proportionnels à la quantité de microorganismes présents dans l'échantillon, c'est-à-dire qu'à une augmentation de l'analyte correspond une augmentation linéaire ou proportionnelle des résultats.

### 2.2.1. Matrices utilisées et niveaux de contamination

Cinq types de matrices ont été sélectionnés dans les 5 catégories de produits à tester avec cinq niveaux de contamination par matrice.

Les matrices testées sont : de la viande hachée, du lait pasteurisé, du poisson cru, des légumes surgelés et un aliment pour chat.

La gamme de contamination varie entre  $5,0 \cdot 10^2$  UFC/g et  $1,0 \cdot 10^5$  UFC/g.

Cinq souches d'*Escherichia coli* de différentes origines ont été utilisées pour contaminer les matrices à différentes concentrations.

Chaque essai a été réalisé en double par les deux méthodes.

| Matrice           | Souche                        | Origine de la souche | Taux d'inoculation (UFC/g)          |
|-------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Viande hachée     | <i>Escherichia coli</i> – I59 | Boeuf                | $5,0 \cdot 10^1$ – $5,0 \cdot 10^2$ |
| Lait pasteurisé   | <i>Escherichia coli</i> – I69 | Cantal au lait cru   | $1,0 \cdot 10^2$ – $1,0 \cdot 10^3$ |
| Poisson cru       | <i>Escherichia coli</i> – R3  | CIP 54.127           | $5,0 \cdot 10^2$ – $5,0 \cdot 10^3$ |
| Légumes surgelés  | <i>Escherichia coli</i> – I2  | Carottes râpées      | $1,0 \cdot 10^3$ – $1,0 \cdot 10^4$ |
| Aliment pour chat | <i>Escherichia coli</i> – I58 | Granulés de boeuf    | $1,0 \cdot 10^4$ – $1,0 \cdot 10^5$ |

### 2.2.2. Résultats bruts

Les interprétations statistiques sont réalisées conformément aux exigences de la norme NF ISO 16140. Les graphiques bidimensionnels obtenus à partir de ces résultats sont présentés en annexe B.

Le choix de la méthode de régression linéaire se fait par rapport à la valeur du rapport R des écart-types de répétabilité globale :

- si  $R > 2$ , une régression linéaire par les moindres carrés (OLS 1) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode de référence,
- si  $R < 0,5$ , une régression linéaire par les moindres carrés (OLS 2) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode alternative,

-si  $0,5 < R < 2$ , une régression orthogonale (GMFR) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode de référence.

**Tableau 5 : Données statistiques pour l'ensemencement en masse**

| Matrice         | rob. R | Régression utilisée | F critique | Rob. F | p (Rob. F) | Coefficient de corrélation | Droite de régression              |
|-----------------|--------|---------------------|------------|--------|------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Viande hachée   | 1,441  | GMFR                | 5,41       | 4,066  | 0,083      | 0,997                      | log Alt. = 0,972 log Réf. + 0,104 |
| Lait pasteurisé | 1,406  | GMFR                |            | 2,680  | 0,158      | 0,998                      | log Alt. = 1,008 log Réf. - 0,008 |
| Poisson cru     | 1,147  | GMFR                |            | 0,857  | 0,520      | 1,000                      | log Alt. = 0,980 log Réf. + 0,069 |
| Légumes surg.   | 1,363  | GMFR                |            | 1,173  | 0,407      | 1,000                      | log Alt. = 0,914 log Réf. - 0,456 |
| Aliment - chat  | 2,074  | OLS                 |            | 9,599  | 0,016      | 0,990                      | log Alt. = 0,904 log Réf. + 0,431 |

**Tableau 6 : Données statistiques pour l'ensemencement en surface**

| Matrice         | rob. R | Régression utilisée | F critique | Rob. F | p (Rob. F) | Coefficient de corrélation | Droite de régression              |
|-----------------|--------|---------------------|------------|--------|------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Viande hachée   | 0,635  | GMFR                | 5,41       | 0,379  | 0,773      | 0,999                      | log Alt. = 1,139 log Réf. - 0,395 |
| Lait pasteurisé | 0,870  | GMFR                |            | 33,558 | 0,001      | 0,996                      | log Alt. = 0,908 log Réf. + 0,373 |
| Poisson cru     | 1,085  | GMFR                |            | 1,667  | 0,004      | 0,989                      | log Alt. = 1,088 log Réf. - 0,230 |
| Légumes surg.   | 1,601  | GMFR                |            | 0,235  | 0,869      | 1,000                      | log Alt. = 1,030 log Réf. - 0,091 |
| Aliment - chat  | 0,625  | GMFR                |            | 1,030  | 0,454      | 1,000                      | log Alt. = 0,944 log Réf. + 0,197 |

Test de non-linéarité

$P > 0,05$  : non significatif,  $0,01 < P < 0,05$  : significatif et  $P < 0,01$  : très significatif

### 2.2.3. Conclusion

Pour la modalité d'ensemencement en masse, la relation entre les deux méthodes est non linéaire au risque  $\alpha$  de 5% uniquement pour la matrice « Aliment pour chat ».

En ce qui concerne l'ensemencement en surface, la relation est non linéaire au risque  $\alpha$  de 5% seulement pour la matrice « Lait pasteurisé ».

Cependant, les équations des droites de régression et les coefficients de corrélation ( $r > 0,99$ ) sont satisfaisants pour ces matrices.

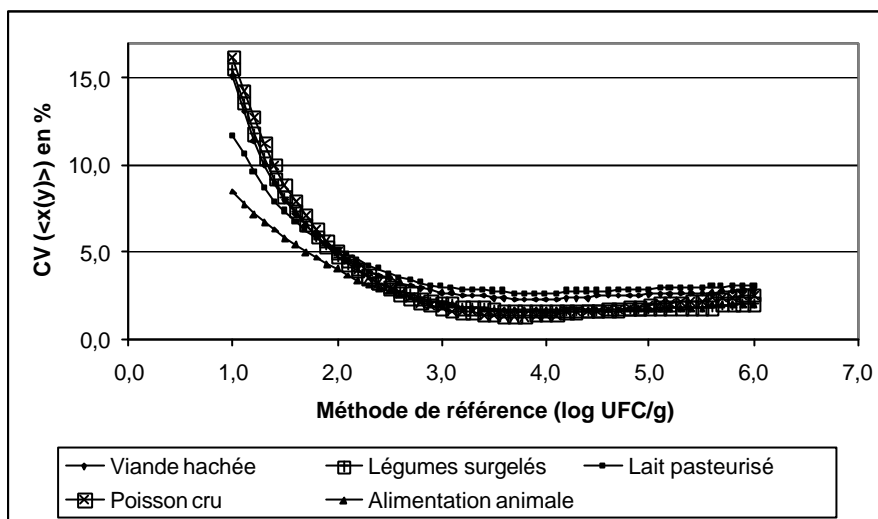
La linéarité de la méthode alternative apparaît satisfaisante.

## 2.3. Sensibilité relative

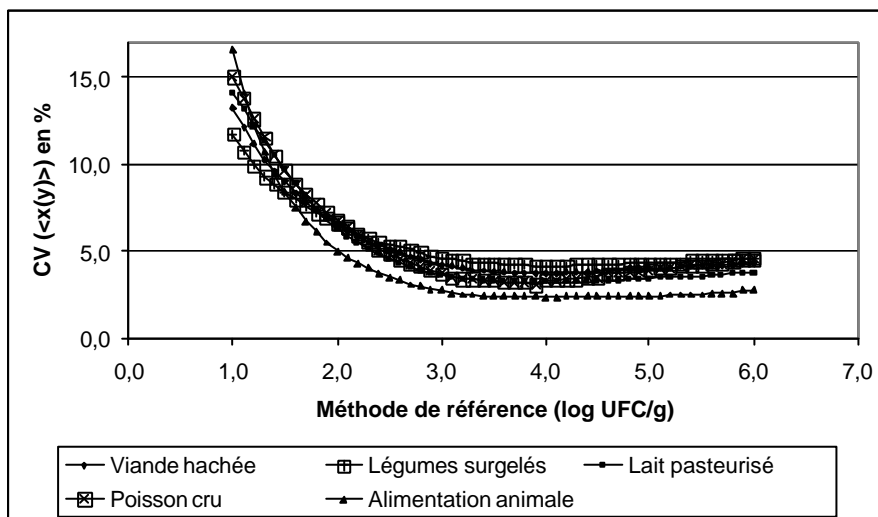
La sensibilité est définie comme la capacité de la méthode alternative à détecter deux quantités différentes d'analyte qui ont été mesurées par la méthode de référence pour une matrice donnée sur toute l'étendue de mesure.

Pour chaque matrice testée dans l'étude de linéarité, des profils de précision sont présentés sur les graphiques suivants.

**Figure 5 – Profils de précision par matrice – Ensemencement en masse**



**Figure 6 – Profils de précision par matrice – Ensemencement en surface**



## **2.4. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)**

Le niveau critique est défini comme la plus petite quantité qui peut être détectée (non nulle), mais non quantifiée comme une valeur exacte. La limite de détection est définie comme le niveau supérieur au niveau critique. La limite de quantification est définie comme la plus petite quantité d'analyte qui peut être mesurée et quantifiée avec une exactitude et une fidélité définies dans les conditions expérimentales.

### **2.4.1. Protocole d'essais**

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées en analysant des cultures pures d'*Escherichia coli* (149) par la méthode alternative. Cinq niveaux de contamination ont été étudiés avec six répétitions pour chaque niveau.

Les essais ont été réalisés avec les deux types d'ensemencement testés.

Ensemencement en masse : 1 mL d'une suspension calibrée a été inoculé pour les différents niveaux.

Ensemencement en surface : 0,1 mL d'une suspension calibrée (10 fois plus concentrée que celle utilisée pour l'ensemencement en masse) ont été inoculés pour les différents niveaux.

### 2.4.2. Résultats

La synthèse des résultats est présentée dans les tableaux suivants. La limite critique (LC), la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été calculées à partir des valeurs obtenues pour le niveau 0,5.

Tableau 7 : Données ( $S_0$  et  $X_0$ ) pour les ensemencements en masse

| Taux de contamination (UFC/mL) | Nombre d'échantillons positifs | Ecart-type ( $S_0$ ) | Biais ( $X_0$ ) |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------|
| 0                              | 0/6                            | 0,000                | 0,000           |
| 0,2                            | 1/6                            | 0,408                | 0,000           |
| 0,5                            | 2/6                            | 1,033                | 0,000           |
| 1                              | 2/6                            | 0,837                | 0,000           |
| 5                              | 6/6                            | 3,619                | 10,000          |

Tableau 8 : Valeurs obtenues pour les ensemencements en masse

|                                       | Formules         | Valeur obtenue |
|---------------------------------------|------------------|----------------|
| <b>Niveau critique (LC)</b>           | $1,65 S_0 + X_0$ | 1,70           |
| <b>Limite de détection (LOD)</b>      | $3,3 S_0 + X_0$  | 3,41           |
| <b>Limite de quantification (LOQ)</b> | $10 S_0 + X_0$   | 10,33          |

Tableau 9 : Données ( $S_0$  et  $X_0$ ) pour les ensemencements en surface

| Niveau (CFU / mL) | Nombre d'échantillons positifs | Ecart-type ( $S_0$ ) | Biais ( $X_0$ ) |
|-------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------|
| 0                 | 0/6                            | 0,000                | 0,000           |
| 0,2               | 0/6                            | 0,000                | 0,000           |
| 0,5               | 3/6                            | 1,265                | 0,500           |
| 1                 | 3/6                            | 0,816                | 0,500           |
| 5                 | 6/6                            | 1,633                | 5,000           |

Tableau 10 : Valeurs obtenues pour les ensemencements en surface

|                                       | Formules         | Valeur obtenue |
|---------------------------------------|------------------|----------------|
| <b>Niveau critique (LC)</b>           | $1,65 S_0 + X_0$ | 2,59           |
| <b>Limite de détection (LOD)</b>      | $3,3 S_0 + X_0$  | 4,67           |
| <b>Limite de quantification (LOQ)</b> | $10 S_0 + X_0$   | 13,15          |

## 2.5. Spécificité / sélectivité

La spécificité est définie comme la capacité de la méthode à mesurer avec exactitude un analyte donné, ou sa quantité dans l'échantillon sans interférences avec les composants non cibles. La sélectivité est définie comme la capacité de la méthode à mesurer l'analyte recherché exclusivement.

### 2.5.1. Protocole d'essais

Cinquante souches cibles et vingt souches non cibles (provenant des collections nationale, internationale et interne à l'ISHA) ont été analysées. Les essais ont été réalisés avec des ensemencements en masse pour la méthode alternative.

### 2.5.2. Résultats

Sur les cinquante souches cibles testées, toutes les colonies dénombrées sont caractéristiques sur milieu REBECCA™ + EB (couleur bleu-violet pour les *E. coli* β-D-glucuronidase positive).

Sur les vingt souches non cibles testées, aucune croissance n'est observée sur le milieu REBECCA™ + EB à l'exception d'une souche. En effet, pour la souche de *Shigella sonnei* R80 (ATCC 9290), on observe des colonies caractéristiques à la fois sur le milieu TBX et sur le milieu REBECCA™ + EB. Cependant, il est mentionné dans la littérature que certaines souches de *Shigella*, et notamment de *Shigella sonnei*, possèdent une activité β-D-glucuronidase, ce qui peut expliquer la présence de ces colonies caractéristiques.

## **3. Praticabilité**

La praticabilité est étudiée en renseignant les 13 critères définis par le Bureau Technique.

### 1- Mode de conditionnement des éléments de la méthode

Le milieu gélosé REBECCA™ est conditionné en flacons.

### 2- Volume des réactifs

Les flacons de gélose REBECCA™ contiennent 200 ml de milieu et chaque carton contient 6 flacons de milieu.

### 3- Conditions de stockage des éléments (péremption des produits non ouverts)

La température de stockage des réactifs est comprise entre 2 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les flacons, boîtes et cartons. Les indications de préparation et de stockage sont mentionnées dans la notice dans les paragraphes « Conservation et stockage » et « Limites et précautions ».

### 4- Modalités d'utilisation après première utilisation

La gélose peut subir au plus 2 cycles de régénération à 100 °C et peut être maintenue en surfusion au bain-marie pendant 7 heures maximum. Cette instruction est indiquée sur la notice dans le paragraphe « Limites et précautions ».

### 5- Equipements ou locaux spécifiques nécessaires

L'utilisation du milieu REBECCA™ ne nécessite pas d'équipements ou de locaux spécifiques.

### 6- Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer

Sans objet

### 7- Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode

L'utilisation du milieu REBECCA™ ne nécessite pas de formation spécifique. La durée de formation est estimée à une demi-journée.

### 8- Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique

Le gain de temps est obtenu par le fait qu'une seule boîte est dénombrée par dilution.

| Etape        | Temps en minutes     |             |                     |             |
|--------------|----------------------|-------------|---------------------|-------------|
|              | Méthode de référence |             | Méthode alternative |             |
|              | 1 analyse            | 20 analyses | 1 analyse           | 20 analyses |
| Pesée        | 1,5                  | 25          | 1,5                 | 25          |
| Broyage      | 1                    | 18          | 1                   | 18          |
| Analyse      | 3                    | 40          | 2                   | 35          |
| Lecture      | 3,5                  | 45          | 1,5                 | 25          |
| <b>Total</b> | <b>9</b>             | <b>128</b>  | <b>6</b>            | <b>103</b>  |

#### 9- Délai d'obtention des résultats

|                | Méthode de référence | Méthode alternative |
|----------------|----------------------|---------------------|
| Pesée, broyage | J0                   | J0                  |
| Analyse        | J0                   | J0                  |
| Lecture        | J1                   | J1                  |

#### 10- Type de qualification de l'opérateur

Niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence.

#### 11- Etapas communes avec la méthode de référence

Les étapes communes sont : la pesée, le préparation de la suspension mère et les dilutions décimales.

#### 12- Tracabilité des résultats d'analyse

Aucune procédure de traçabilité n'est proposée. Le laboratoire doit utiliser ses procédures internes.

#### 13- Maintenance par le laboratoire

Sans objet.

## **4. Etude collaborative**

### **4.1. Préparation**

L'étude collaborative a été réalisée par douze laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur du lait pasteurisé inoculé avec une souche de *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) et une souche d'*Escherichia coli* (souche sauvage isolée d'un camembert). Les résultats de neuf laboratoires ont été exploités (décalage des analyses dans le temps par rapport aux spécifications pour trois laboratoires).

### **4.2. Résultats**

#### 4.2.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale

Pour l'ensemble des laboratoires, les dénombrements de la flore aérobie mésophile à 30°C varient entre <10 et  $6,5 \cdot 10^3$  UFC/mL.

#### 4.2.2. Synthèse des résultats obtenus par les laboratoires

| Laboratoires | Niveau 0             |     |                     |     | Niveau 1             |                 |                     |                 | Niveau 2             |     |                     |     | Niveau 3             |      |                     |      |
|--------------|----------------------|-----|---------------------|-----|----------------------|-----------------|---------------------|-----------------|----------------------|-----|---------------------|-----|----------------------|------|---------------------|------|
|              | Méthode de référence |     | Méthode alternative |     | Méthode de référence |                 | Méthode alternative |                 | Méthode de référence |     | Méthode alternative |     | Méthode de référence |      | Méthode alternative |      |
| A            | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 15 <sup>a</sup>      | 20 <sup>a</sup> | 20 <sup>a</sup>     | 70 <sup>a</sup> | 340                  | 320 | 440                 | 370 | 4800                 | 4500 | 2900                | 5100 |
| B            | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 25                   | 55              | 10                  | 10              | 410                  | 420 | 380                 | 300 | 3800                 | 3900 | 4100                | 3600 |
| C            | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 40                   | 45              | 30                  | 50              | 460                  | 390 | 350                 | 280 | 4100                 | 4300 | 3100                | 4500 |
| D            | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 40                   | 35              | 50                  | 40              | 360                  | 370 | 460                 | 430 | 4500                 | 4900 | 4200                | 4500 |
| F            | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 40                   | 30              | 40                  | 50              | 420                  | 370 | 220                 | 290 | 4000                 | 5400 | 4700                | 3900 |
| G            | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 40                   | 25              | 40                  | 40              | 460                  | 430 | 300                 | 360 | 5000                 | 5100 | 4800                | 3700 |
| H            | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 55                   | 65              | 10                  | 30              | 420                  | 370 | 340                 | 420 | 5700                 | 4500 | 4700                | 4500 |
| I            | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 65                   | 75              | 40                  | 40              | 390                  | 420 | 310                 | 400 | 4500                 | 4500 | 4500                | 4500 |
| J            | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 35                   | 25              | 10                  | 40              | 450                  | 350 | 370                 | 400 | 5000                 | 3400 | 4000                | 3500 |
| Expert       | <10                  | <10 | <10                 | <10 | 25                   | 60              | 20                  | 40              | 370                  | 350 | 420                 | 410 | 2100                 | 3900 | 3700                | 3200 |

**Tableau 11** : résultats pour le dénombrement en UFC/mL des *Escherichia coli* à  $\beta$ -glucuronidase positive (a=nombre estimés)

### 4.3. Interprétation statistique

#### 4.3.1. Exactitude relative

Pour chaque niveau d'analyte et par laboratoire, la différence des moyennes des répétitions entre la méthode alternative et la méthode de référence est calculée :

$$d_i = M_{i,alt} - M_{i,réf}$$

Le calcul de la médiane de ces différences correspond au biais D. L'écart-type robuste  $s\{d_i\}$  des ces différences est également calculé. Ces deux résultats permettent de calculer une statistique t :

$$t(d) = \frac{MED\{d_i\}}{s\{d_i\}} \sqrt{n}, \text{ avec } (n-1) \text{ degrés de liberté.}$$

La valeur de t obtenue est comparée à une valeur critique théorique de la table de Student. Le biais est non significatif si t(d) est inférieur à t critique. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Niveau | n | Biais D | $s\{d_i\}$ | t(d)  | t critique | Conclusion                |
|--------|---|---------|------------|-------|------------|---------------------------|
| 1      | 9 | -0,038  | 0,223      | 0,512 | 2,306      | Biais non significatif    |
| 2      |   | -0,063  | 0,115      | 1,652 |            | Biais non significatif    |
| 3      |   | -0,037  | 0,032      | 3,461 |            | <b>Biais significatif</b> |

Le biais est compris entre -0,063 et -0,037 log UFC/mL. Le biais est non significatif pour les niveaux 1 et 2. Cependant, le biais est significatif pour le niveau 3. Comme précédemment, cette significativité s'explique : la valeur de l'écart-type robuste (0,032 log) est en effet très proche de la valeur absolue du biais (-0,037 log).

Toutefois les valeurs de biais sont satisfaisantes pour les 3 niveaux de contamination étudiés.

#### 4.3.2. Répétabilité

La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec la même méthode en utilisant un matériau d'essai identique, dans des conditions identiques.

La limite de répétabilité est la valeur inférieure ou égale à laquelle la différence absolue entre deux résultats d'essai obtenus dans des conditions de répétabilité est attendue avec une probabilité de 95%.

Pour chaque méthode et niveau d'analyte, deux valeurs sont calculées :

-la limite de répétabilité :  $r = 2,8 \cdot s_r$ ,

-l'écart-type relatif de répétabilité :  $Rs_r = 100\% \frac{s_r}{MED\{M_i\}}$

Les répétabilités des méthodes alternative et de référence sont comparées à l'aide d'une

distribution de F :  $F = \left( \frac{s_{r,alt}}{s_{r,réf}} \right)^2$

La valeur de F obtenue est comparée à une valeur critique théorique de la table de F. La répétabilité entre les deux méthodes est comparable si F (ou 1/F) est inférieur à F critique. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Niveau | n | Méthode de référence |       | Méthode alternative |       | F ou 1/F(*)<br>calc. | F crit.<br>(0,05 ; 9 ; 9) | Conclusion                |
|--------|---|----------------------|-------|---------------------|-------|----------------------|---------------------------|---------------------------|
|        |   | r                    | Rsr   | r                   | Rsr   |                      |                           |                           |
| 1      | 9 | 0,367                | 8,347 | 0,284               | 6,342 | 1,662*               | 3,18                      | Répétabilités comparables |
| 2      |   | 0,100                | 1,380 | 0,257               | 3,606 | 6,570                |                           | Répétabilités différentes |
| 3      |   | 0,075                | 0,732 | 0,154               | 1,516 | 4,204                |                           | Répétabilités différentes |

Les valeurs de répétabilité obtenues sont statistiquement comparables pour le niveau 1 pour l'ensemble des laboratoires. Les répétabilités des méthodes sont différentes pour les niveaux 2 et 3.

Pour ces niveaux, la limite de répétabilité de la méthode alternative (0,257 log et 0,154 log) est moins bonne que celle de la méthode de référence (0,100 log et 0,075 log).

Toutefois les valeurs de répétabilité sont correctes pour les trois niveaux de contaminations pour les deux méthodes.

#### 4.3.3. Reproductibilité

La reproductibilité est l'étroitesse d'accord entre des résultats individuels effectués sur un matériau d'essai identique en utilisant la même méthode et obtenus par des opérateurs de différents laboratoires utilisant un équipement différent.

La limite de reproductibilité est la valeur inférieure ou égale à laquelle la différence absolue entre deux résultats d'essai obtenus dans des conditions de reproductibilité est attendue avec une probabilité de 95%.

Pour chaque méthode et niveau d'analyte, deux valeurs sont calculées :

-la limite de reproductibilité :  $R = 2,8 \cdot S_R$

-l'écart-type de reproductibilité :  $Rs_R = 100\% \frac{S_R}{MED\{M_i\}}$ , avec  $S_R = \sqrt{s_b^2 + \frac{s_r^2}{2}}$

Les reproductibilités des méthodes alternative et de référence sont comparées à l'aide

d'une distribution de F :  $F = \left( \frac{S_{R,alt}}{S_{R,réf}} \right)^2$

La valeur de F obtenue est comparée à une valeur critique théorique de la table de F. La reproductibilité entre les deux méthodes est comparable si F (ou 1/F) est inférieur à F critique. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Niveau | n | Méthode de référence |        | Méthode alternative |       | F ou 1/F(*)<br>calc. | F crit.<br>(0,05 ;<br>8 ;8) | Conclusion                           |
|--------|---|----------------------|--------|---------------------|-------|----------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
|        |   | R                    | RSR    | R                   | RSR   |                      |                             |                                      |
| 1      | 9 | 0,504                | 11,466 | 0,308               | 6,872 | 2,671*               | 3,44                        | Reproductibilités comparables        |
| 2      |   | 0,112                | 1,542  | 0,274               | 3,837 | 5,954                |                             | <b>Reproductibilités différentes</b> |
| 3      |   | 0,148                | 1,444  | 0,185               | 1,826 | 1,565                |                             | Reproductibilités comparables        |

La reproductibilité de la méthode alternative est statistiquement comparable à celle de la méthode de référence pour les niveaux 1 et 3. Cette reproductibilité est différente pour le niveau 2. La limite de reproductibilité de la méthode alternative (0,274 log) est alors moins bonne que celle de la méthode de référence (0,112 log).

Toutefois les valeurs de reproductibilité sont satisfaisantes pour les deux méthodes à ce niveau de contamination.

#### 4.3.4. Dispersion entre les laboratoires

Cette partie de l'étude consiste à estimer la probabilité d'avoir une dispersion homogène entre les laboratoires, c'est-à-dire que les différences entre laboratoires soient inférieures à la dispersion interne typique de détermination.

Cette dispersion interne typique de détermination se calcule grâce à la formule :

$$F = 2 \left( \frac{s_b}{s_r} \right)^2 \text{ avec } (n-1) \text{ et } n \text{ degrés de liberté.}$$

Une table de F donne la probabilité p(F) indiquant l'importance de la variation entre laboratoires  $s_L$ . Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Niveau | n | Méthode de référence<br>F | Méthode alternative<br>F | F crit.<br>(0,05 ;8 ;9) |
|--------|---|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1      | 9 | 2,774                     | 1,349                    | 3,23                    |
| 2      |   | 1,499                     | 1,265                    |                         |
| 3      |   | 6,793                     | 1,901                    |                         |

La dispersion entre les laboratoires est plus élevée avec la méthode de référence pour les niveaux 1 et 3 qu'avec la méthode alternative pour le dénombrement des *Escherichia coli* à  $\beta$ -glucuronidase positive.

La dispersion entre les laboratoires est supérieure au niveau critique au niveau 3 pour la méthode de référence

On peut donc estimer que la dispersion est comparable pour les deux méthodes pour l'ensemble des niveaux.

#### 4.3.5. Rapport reproductibilité / répétabilité

Les rapports entre la limite de reproductibilité et la limite de répétabilité sont présentés dans le tableau suivant pour les deux types de dénombrement. Un rapport correct doit avoir une valeur inférieure à 2.

| Niveau | <i>Escherichia coli</i> |                     |
|--------|-------------------------|---------------------|
|        | Méthode de référence    | Méthode alternative |
| 1      | 1,373                   | 1,085               |
| 2      | 1,120                   | 1,066               |
| 3      | 1,973                   | 1,201               |

Pour tous les niveaux testés, les rapports entre la limite de reproductibilité et la limite de répétabilité sont acceptables aussi bien pour la méthode de référence que pour la méthode alternative.

## **5. Conclusions**

### **5.1. Conclusions de l'étude comparative**

La linéarité et l'exactitude relative de la méthode REBECCA™+EB pour le dénombrement des *Escherichia coli* β-D-glucuronidase positive à 37°C sont satisfaisantes.

La limite de répétabilité de la méthode alternative ne diffère pas de la méthode de référence.

Le biais entre les deux méthodes est acceptable aussi bien pour l'ensemencement en masse que pour l'ensemencement en surface.

La méthode REBECCA™+EB pour le dénombrement des *Escherichia coli* β-D-glucuronidase positive est spécifique et sélective.

### **5.2. Conclusions de l'étude collaborative**

Le biais entre les deux méthodes est faible. Les valeurs sont comprises entre -0,063 et -0,037 log UFC/mL.

Les valeurs de répétabilité de la méthode alternative sont comparables à celles de la méthode de référence pour le niveau 1. Pour les niveaux 2 et 3, la répétabilité de la méthode de référence est meilleure que celle de la méthode alternative.

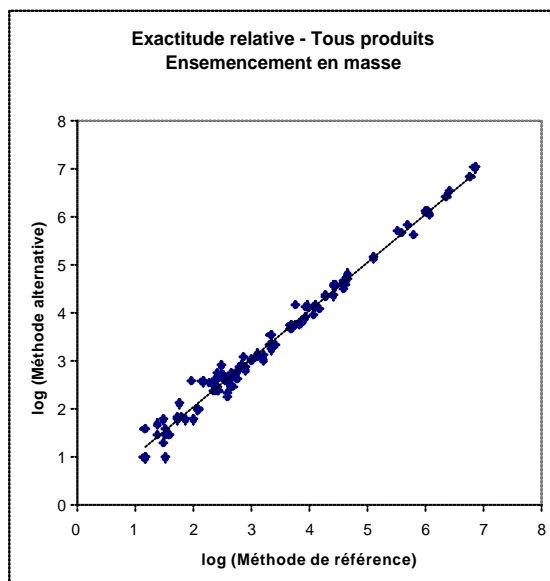
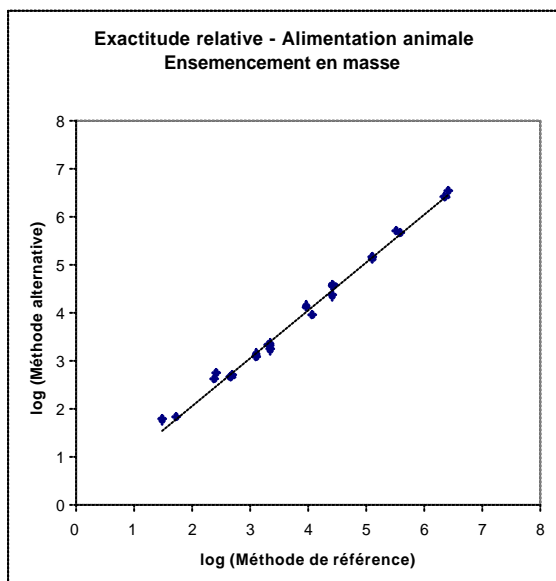
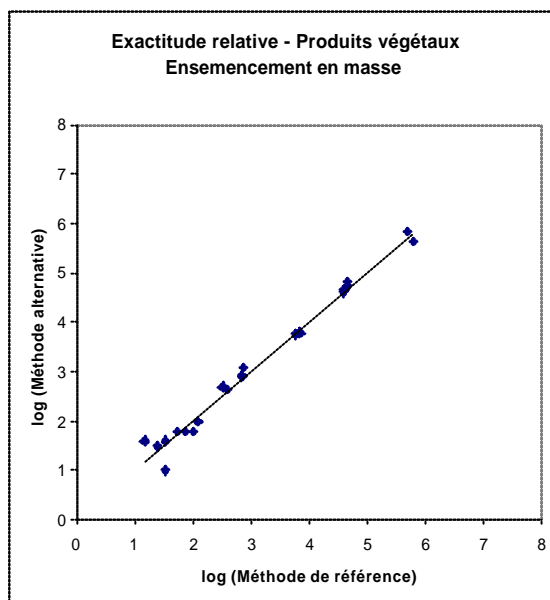
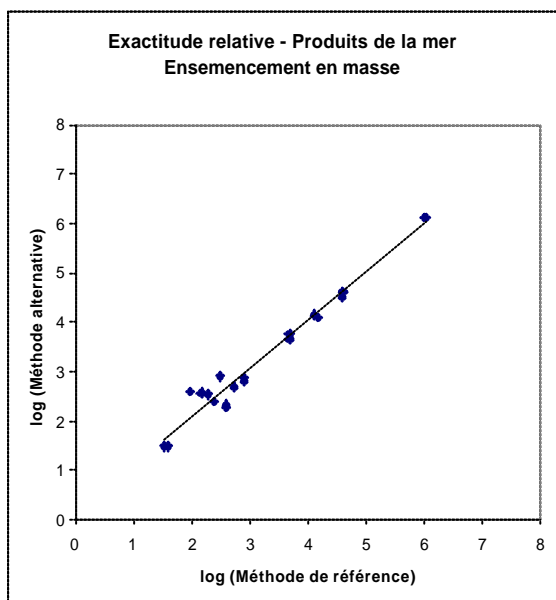
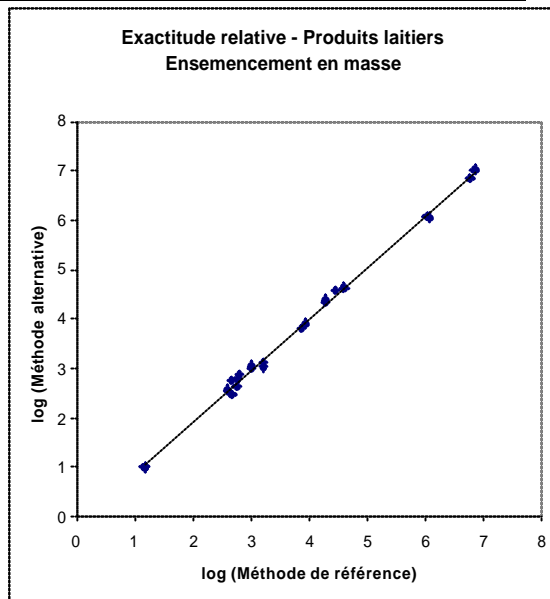
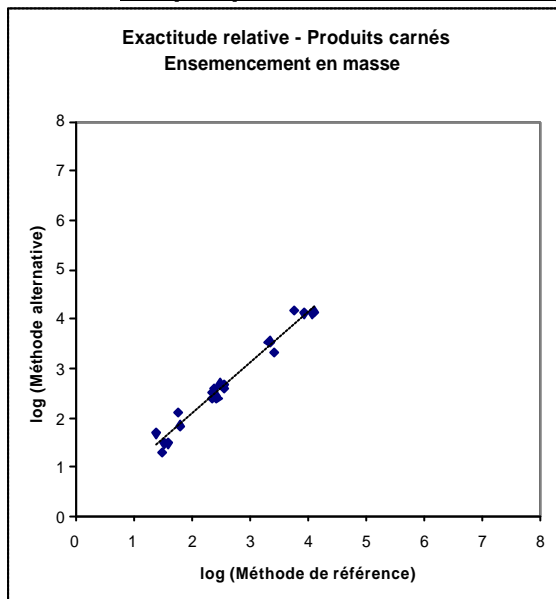
La répétabilité est satisfaisante pour les deux méthodes pour chaque niveau de contamination.

Les valeurs de reproductibilité de la méthode alternative sont comparables à celles de la méthode de référence pour les niveaux 1 et 3. Pour le niveau 2, la reproductibilité de la méthode de référence est meilleure que celle de la méthode alternative.

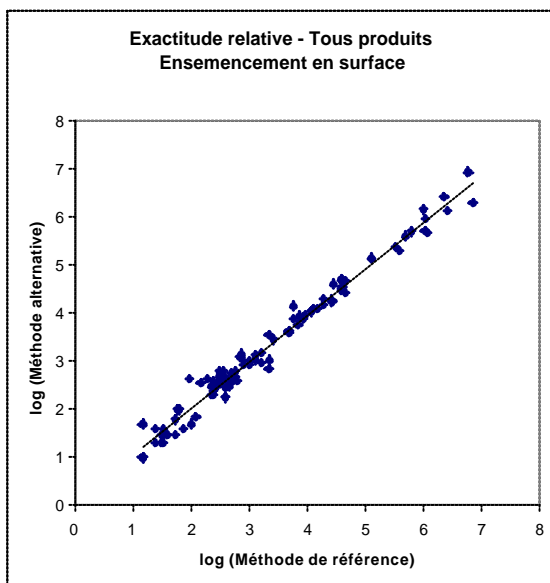
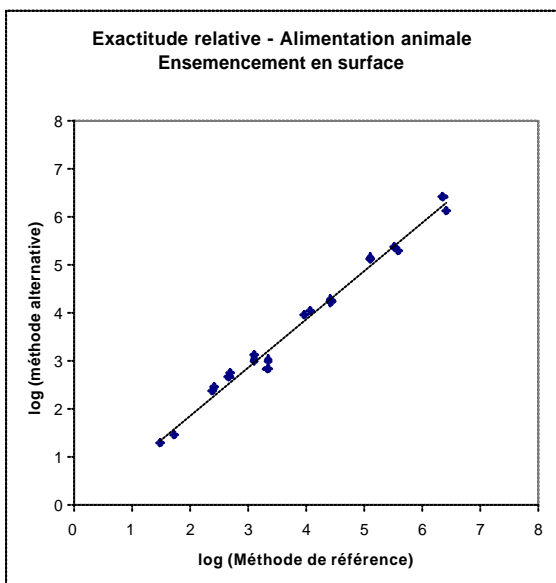
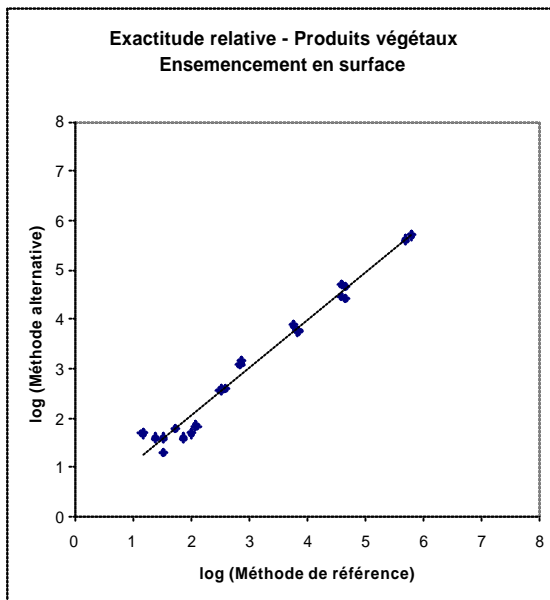
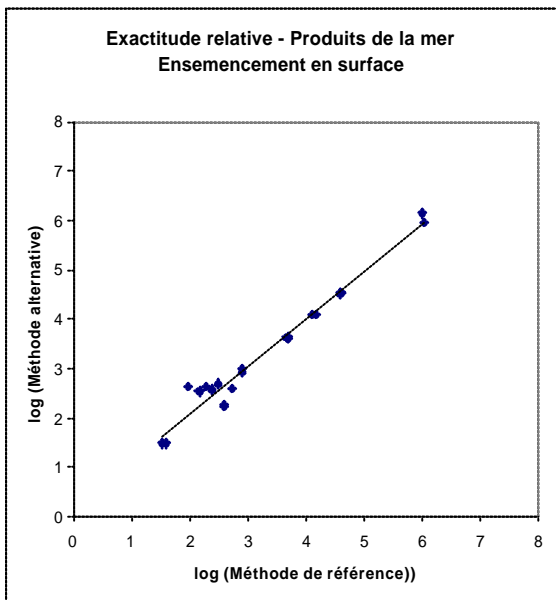
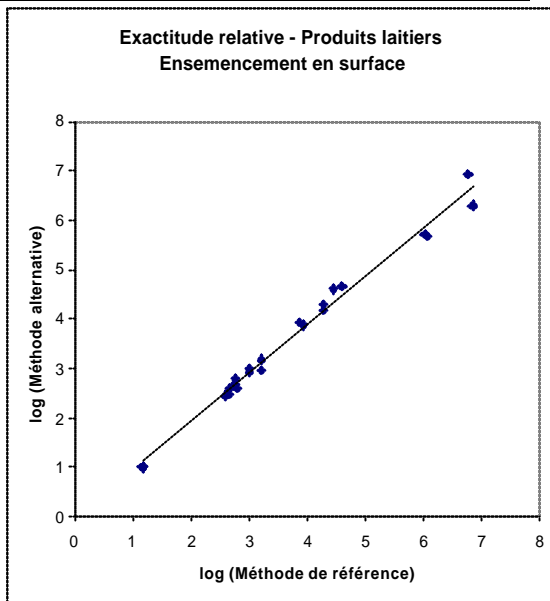
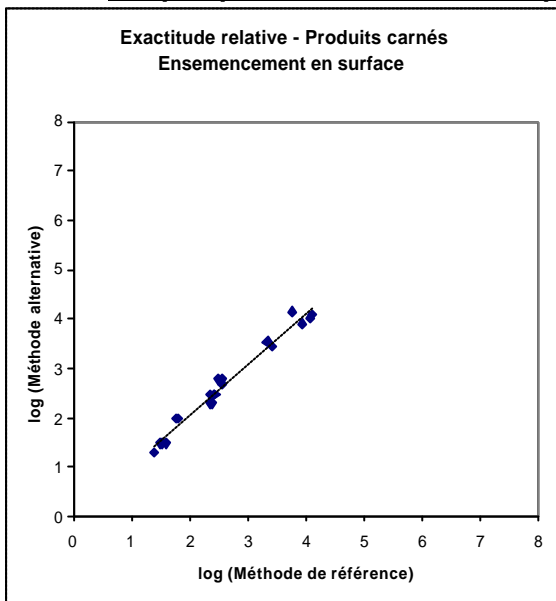
La reproductibilité est satisfaisante pour les deux méthodes pour chaque niveau de contamination.

La dispersion entre les laboratoires est du même ordre pour les deux méthodes.

**ANNEXE A**  
**EXACTITUDE RELATIVE**  
**GRAPHIQUES BIDIMENSIONNELS**

**Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en masse**

**Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en surface**

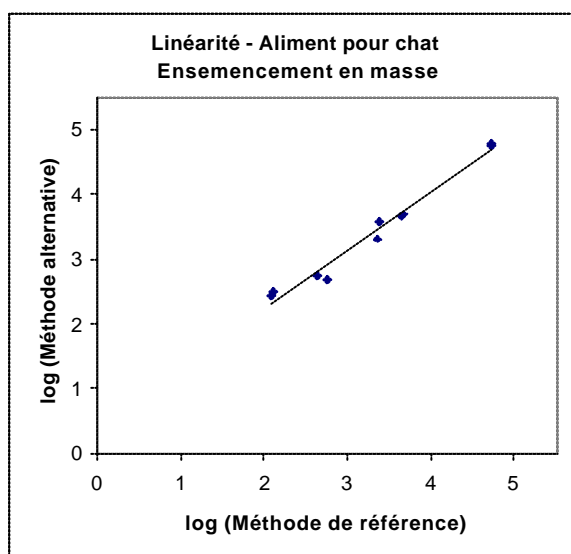
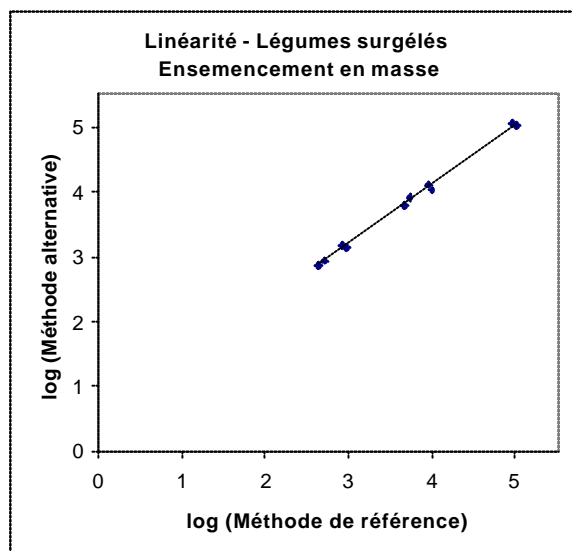
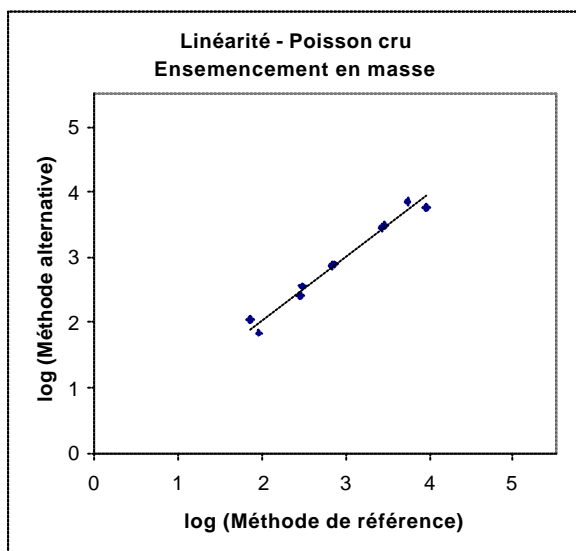
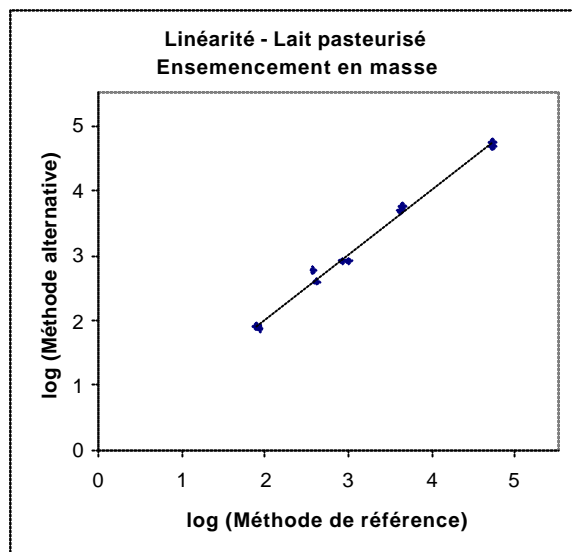
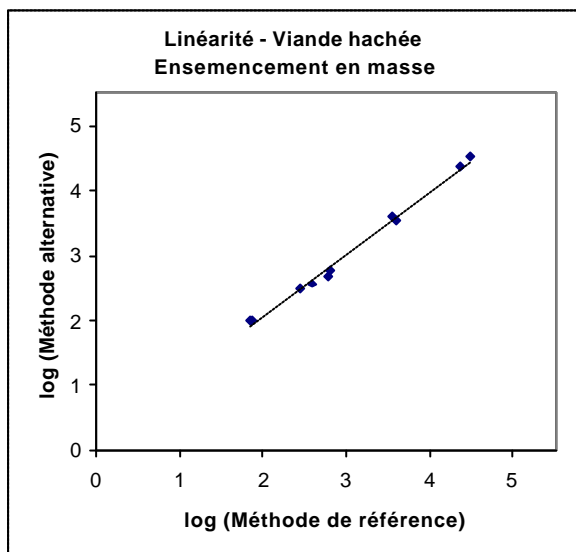


**ANNEXE B**

**LINEARITE**

**GRAPHIQUES BIDIMENSIONNELS**

## Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en masse



## Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en surface

