

CONFIDENTIEL

ETUDE DE LA VALIDATION AFAQ AFNOR CERTIFICATION DU TEST REBECCA + EB POUR LE DENOMBREMENT DES ENTEROBACTERIES 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 Entérobactéries

SOMMAIRE

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

1. Introduction

1.1. Référentiel de validation

L'étude préliminaire a pour but d'évaluer les performances du test REBECCA™ ENTEROBACTERIE par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 21528-2 selon le référentiel NF EN 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'alimentation humaine et animale des *E. coli* β -D-glucuronidase positive et des Entérobactéries. Dans le cadre de la validation, deux types d'ensemencement ont été testés : l'ensemencement en masse et l'ensemencement en surface.

La notice d'utilisation 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 21528-2 (2004) : méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* 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	7	4
	Charcuterie	4	3
	Plats cuisinés	4	3
	Total	15	10
Produits laitiers	Fromages	9	5
	Fromage blanc	1	1
	Crèmes	2	1
	Glaces	2	2
	Lait	2	1
Total	16	10	
Produits de la mer	Poissons crus	3	3
	Plats cuisinés	8	5
	Crustacés	3	2
	Total	14	10
Produits végétaux	Plats cuisinés et salades de légumes	11	8
	Préparations contenant des fruits	2	2
	Total	13	10
Alimentation animale	Viande crue pour animaux	2	2
	Farines animales	4	2
	Pâtées pour chats	6	6
	Total	12	10
Total		70	50

Pour chaque catégorie, 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, 70 échantillons ont été analysés et 50 résultats sont exploités. Le taux d'échantillons naturellement contaminés est de 76%.

Douze 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>Hafnia alvei</i> - I3 (Taboulé)	20 min à 57°C	0,66	RD 1269, RD 1274, RD 1278, RD 1279, RD 1280
<i>Citrobacter freundii</i> - R35 (CIP 53.62)	20 min à 57°C	0,70	RD 1276, RD 1277, RD 1281, RD 1282, RD 1283
<i>Klebsiella oxytoca</i> - I17 (Salade de soja)	8 jours à -20°C	0,91	RD 1270, RD 1275

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	R	Régression utilisée	T critique	a	t(a)	b	t(b)	P %	
								Ordonnée à 0	Pente à 1
Produits carnés	1,021	GMFR	2,306	-0,019	0,375	0,986	1,407	75	18
Produits laitiers	0,683	GMFR	2,306	0,206	1,993	0,986	0,603	6	55
Produits de la mer	1,704	GMFR	2,306	0,187	1,706	0,962	1,792	11	9
Produits végétaux	1,968	GMFR	2,306	-0,072	0,899	1,016	0,984	38	34
Aliment. animale	0,615	GMFR	2,306	-0,037	0,150	1,048	0,708	89	49
Toutes matrices	1,062	GMFR	2,009	0,092	1,458	0,988	0,926	15	36

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

Matrice	Biais (D) en log		Répétabilité en log			
	Moyen	Médian	r		Rob.r	
			MR	MA	MR	MA
Produits carnés	-0,088	-0,071	0,210	0,214	0,210	0,286
Produits laitiers	0,147	0,124	0,253	0,173	0,284	0,180
Produits de la mer	0,001	0,004	0,170	0,289	0,203	0,246
Produits végétaux	0,000	-0,021	0,198	0,390	0,139	0,223
Aliment. animale	0,129	0,044	0,388	0,239	0,488	0,269
Toutes matrices	0,038	0,020	0,256	0,272	0,210	0,244

MR : méthode de référence, MA : méthode alternative

Tableau 3 : Données statistiques pour l'ensemencement en surface

Matrice	R	Régression utilisée	T critique	a	t(a)	b	t(b)	P %	
								Ordonnée à 0	Pente à 1
Produits carnés	0,993	GMFR	2,306	-0,168	1,484	1,015	0,663	16	52
Produits laitiers	1,257	GMFR	2,306	0,014	0,091	0,994	0,170	93	87
Produits de la mer	1,571	GMFR	2,306	0,041	0,209	0,996	0,114	84	91
Produits végétaux	1,740	GMFR	2,306	-0,117	1,072	1,021	0,905	30	38
Aliment. animale	0,817	GMFR	2,306	-0,149	0,827	1,068	1,392	42	18
Toutes matrices	1,154	GMFR	2,009	-0,042	1,144	1,008	1,067	26	29

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

Matrice	Biais (D) en log		Répétabilité en log			
	Moyen	Médian	r		Rob.r	
			MR	MA	MR	MA
Produits carnés	-0,097	-0,083	0,210	0,214	0,208	0,269
Produits laitiers	-0,010	0,012	0,253	0,318	0,284	0,360
Produits de la mer	0,020	-0,003	0,170	0,266	0,203	0,367
Produits végétaux	-0,027	-0,014	0,198	0,345	0,138	0,186
Aliment. animale	0,087	0,011	0,388	0,317	0,488	0,268
Toutes matrices	-0,006	-0,005	0,256	0,295	0,210	0,284

MR : méthode de référence, MA : méthode alternative

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.

Les biais entre les deux méthodes sont compris entre -0,071 et +0,124 en log de CFU/g pour l'ensemencement en masse et entre -0,083 et +0,012 en log de CFU/g pour l'ensemencement en surface.

Toutes matrices confondues, la répétabilité est de 0,210 pour la méthode de référence et celle de la méthode alternative est de 0,244 (ensemencement en masse) et de 0,284 (ensemencement en surface).

Le tableau suivant résume les différentes équations obtenues.

	Ensemencement en masse	Ensemencement en surface
Produits carnés	log Alt. = 0,986 log Ref. – 0,019	log Alt. = 1,015 log Ref. – 0,168
Produits laitiers	log Alt. = 0,986 log Ref. + 0,206	log Alt. = 0,994 log Ref. + 0,014
Produits de la mer	log Alt. = 0,962 log Ref. + 0,187	log Alt. = 0,996 log Ref. + 0,041
Produits végétaux	log Alt. = 1,016 log Ref. – 0,072	log Alt. = 1,021 log Ref. – 0,117
Alimentation animale	log Alt. = 1,048 log Ref. – 0,037	log Alt. = 1,068 log Ref. – 0,149
Tous produits	log Alt. = 0,988 log Ref. + 0,092	log Alt. = 1,008 log Ref. - 0,042

L'exactitude relative de la méthode alternative 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 variait entre 10^2 CFU/g et 10^6 CFU/g.

Cinq souches d'Entérobactéries 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	Bœuf	$3.10^1 - 3.10^2$
Lait pasteurisé	<i>Enterobacter aerogenes</i> – I25	Industrie laitière	$3.10^2 - 3.10^3$
Poisson cru	<i>Hafnia alvei</i> – I3	Taboulé	$3.10^3 - 3.10^4$
Légumes surgelés	<i>Klebsiella oxytoca</i> – I17	Salade de soja	$3.10^4 - 3.10^5$
Aliment pour chat	<i>Citrobacter freundii</i> – R35	CIP 53.62	$3.10^5 - 3.10^6$

2.2.2. Résultats bruts

Les interprétations statistiques sont réalisées conformément aux exigences de la norme NF EN 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	R	Régression utilisée	F critique	Rob. F	p (Rob. F)	Coefficient de corrélation	Droite de régression
Viande hachée	0,571	GMFR	5,41	12,26	0,010	0,998	log Alt. = 1,016 log Réf. - 0,023
Lait pasteurisé	1,603	GMFR		0,010	0,998	0,999	log Alt. = 0,999 log Réf. - 0,096
Poisson cru	1,530	GMFR		56,30	0,000	0,999	log Alt. = 1,062 log Réf. - 0,399
Légumes surg.	1,246	GMFR		17,93	0,004	1,000	log Alt. = 0,979 log Réf. + 0,094
Aliment - chat	2,578	OLS 1		1,203	0,398	0,996	log Alt. = 1,014 log Réf. - 0,297

Tableau 6 : Données statistiques pour l'ensemencement en surface

Matrice	R	Régression utilisée	F critique	Rob. F	p (Rob. F)	Coefficient de corrélation	Droite de régression
Viande hachée	4,875	OLS 1	5,41	1,042	0,450	0,997	log Alt. = 1,034 log Réf. - 0,334
Lait pasteurisé	1,101	GMFR		1,016	0,459	0,999	log Alt. = 1,017 log Réf. - 0,135
Poisson cru	1,458	GMFR		72,42	0,000	0,999	log Alt. = 1,007 log Réf. - 0,022
Légumes surg.	2,154	OLS 1		0,369	0,779	0,999	log Alt. = 1,006 log Réf. - 0,065
Aliment - chat	0,658	GMFR		40,55	0,001	0,998	log Alt. = 0,956 log Réf. + 0,052

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 matrice « Lait pasteurisé » et quel que soit le type d'ensemencement, la relation entre les deux méthodes est linéaire au risque α de 0,05.

Pour les matrices « Aliment pour chat » (ensemencement en masse), « Viande hachée » (ensemencement en surface) et « Légumes surgelés » (ensemencement en surface), la relation entre les deux méthodes est linéaire au risque α de 0,05.

Pour les autres modalités (matrice et type d'ensemencement), bien que le test de non-linéarité soit significatif, les droites de régressions correspondantes et les coefficients de corrélation ($R = 0,99$) 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.

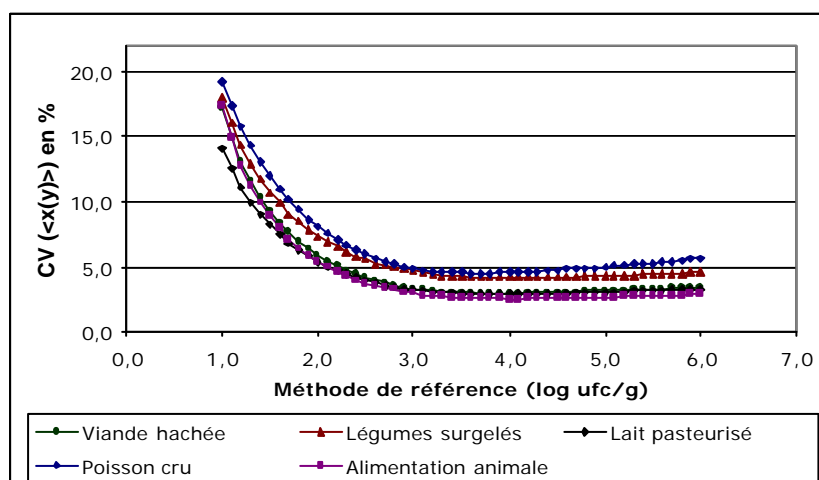
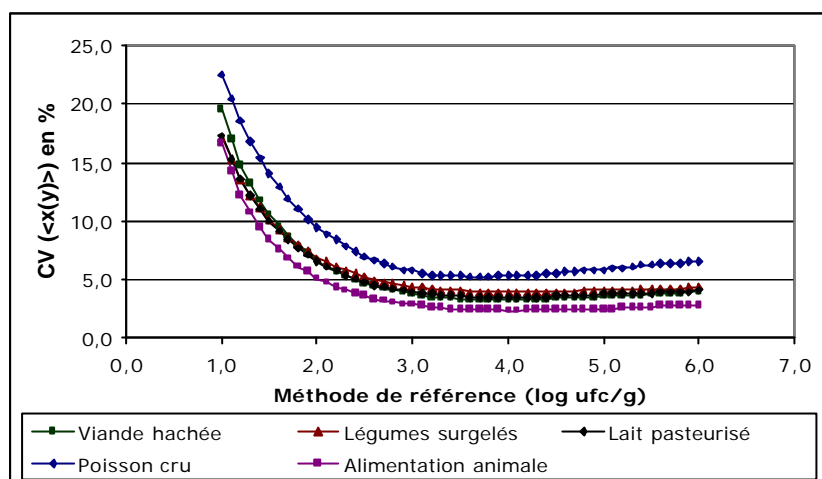
Figure 4 – Profils de précision par matrice – Ensemencement en masse

Figure 5 – 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'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 (S₀ et X₀) 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
0,2	1/6	0,408	0
0,5	2/6	1,033	0
1	2/6	0,837	0
5	6/6	3,619	10

Tableau 8 : Valeurs obtenues pour les ensemencements en masse

	Formules	Valeurs obtenues
Niveau critique (LC)	$1,65 S_0 + X_0$	1,7
Limite de détection (LOD)	$3,3 S_0 + X_0$	3,4
Limite de quantification (LOQ)	$10 S_0 + X_0$	10,3

Tableau 9 : Données (S0 et X0) pour les ensemencements en surface

Taux de contamination (UFC/mL)	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type (S ₀)	Biais (X ₀)
0	0/6	0,000	0
0,2	0/6	0,000	0
0,5	3/6	1,265	0,5
1	3/6	0,816	0,5
5	6/6	1,633	5

Tableau 10 : Valeurs obtenues pour les ensemencements en surface

	Formules	Valeurs obtenues
Niveau critique (LC)	$1,65 S_0 + X_0$	2,6
Limite de détection (LOD)	$3,3 S_0 + X_0$	4,7
Limite de quantification (LOQ)	$10 S_0 + X_0$	13,2

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

Trente souches cibles et vingt souches non cibles (provenant des collections nationale, internationale et interne à l'ISHA). 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 trente souches cibles testées, toutes les colonies dénombrées sont caractéristiques sur milieu REBECCA™ + EB (couleur rouge pour les entérobactéries et couleur bleu-violet pour les 4 souches de *E. coli* β-D-glucuronidase positive).

Sur les 20 souches non cibles testées, aucune croissance n'est observée sur le milieu REBECCA™ + EB.

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 ou coulé en boîtes prêtes à l'emploi. Le supplément EB est sous forme lyophilisée et conditionné dans des flacons.

2- Volume des réactifs

Les flacons de gélose REBECCA™ contiennent 200 ml de milieu et chaque carton contient 6 flacons de milieu. Les boîtes de milieu gélosé REBECCA™ sont conditionnées par 20 et contiennent 16 mL de milieu chacune.

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

La réhydratation du supplément EB est réalisée en une seule fois pour les 6 flacons. Six mL d'un mélange à 50% (eau, éthanol) sont utilisés pour la mise en suspension. Un mL de supplément est ajouté à 200 ml de gélose REBECCA™.

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, ainsi que par l'absence de confirmation.

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
Confirmation	2,5	38	/	/
Total	11,5	166	6	103

9- Délai d'obtention des résultats

Résultats négatifs

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

Résultats positifs

	Méthode de référence	Méthode alternative
Pesée, broyage	J0	J0
Analyse	J0	J0
Lecture	J1	J1
Confirmation	J3	/

10- Type de qualification de l'opérateur

Niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence.

11- Étapes 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. Résultats4.2.1. 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 référence		Méthode alternative		Méthode référence		Méthode alternative		Méthode référence		Méthode alternative		Méthode référence		Méthode alternative	
A	<10	<10	<10	<10	45 ^a	45 ^a	30 ^a	80 ^a	500	500	530	460	5600	4200	4100	5800
B	<10	<10	<10	<10	90	60	10	20	590	500	420	350	5000	4400	4500	4400
C	<10	<10	<10	<10	30	70	40	60	580	420	360	310	5400	5500	3500	4100
D	<10	<10	<10	<10	30	35	60	40	550	590	570	500	6100	6600	4500	5500
F	<10	<10	<10	<10	60	25	50	60	590	530	570	410	5500	5600	5100	4400
G	<10	<10	<10	<10	65	50	50	60	570	550	490	480	5500	5800	6100	4500
H	<10	<10	<10	<10	35	40	100	40	620	530	460	490	5600	5500	5900	5100
I	<10	<10	<10	<10	35	75	50	40	460	440	370	430	4500	5000	5200	4800
J	<10	<10	<10	<10	25	55	10	40	360	440	370	400	5200	4800	4000	3500
Expert	<10	<10	<10	<10	35	55	20	40	500	490	500	440	5700	5000	4200	3800

Tableau 11 : résultats pour le dénombrement en UFC/mL des entérobactéries (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 :

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

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	0,029	0,218	0,400	2,306	Biais non significatif
2		-0,062	0,063	2,975		Biais significatif
3		-0,036	0,070	1,531		Biais non significatif

Le biais est compris entre -0,062 et +0,029 log UFC/mL. Le biais est non significatif pour les niveaux 1 et 3. Cependant, le biais est significatif pour le niveau 2. Cette significativité peut s'expliquer par les valeurs très proches du biais (-0,062 log) et de l'écart-type robuste (0,063 log).

Toutefois les valeurs des 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(*) calc.	F crit. (0,05 ;9 ;9)	Conclusion
		r	Rsr	r	Rsr			
1	9	0,517	11,167	0,517	10,923	1,000	3,18	Répétabilité comparables
2		0,134	1,752	0,174	6,496	1,679		Répétabilité comparables
3		0,100	0,955	0,196	1,902	3,869		Répétabilité différentes

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

Pour ce niveau de contamination, la limite de répétabilité de la méthode alternative (0,196 log) est moins bonne que celle de la méthode de référence (0,100 log).

Toutefois les valeurs de répétabilité sont satisfaisantes 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'analyse, 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(*) calc.	F crit. (0,05 ; 8 ;8)	Conclusion
		R	RSR	R	RSR			
1	9	0,473	10,222	0,410	8,659	1,334 [†]	3,44	Reproductibilités comparables
2		0,176	2,300	0,293	3,914	2,772		Reproductibilités comparables
3		0,188	1,797	0,184	1,778	1,048 [†]		Reproductibilités comparables

Pour chaque niveau, la reproductibilité de la méthode alternative est statistiquement comparable à celle de la méthode de référence.

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 F	Méthode alternative F	F crit. (0,05 ; 8 ; 9)
1	9	0,676	0,257	3,23
2		2,449	4,694	
3		6,086	0,747	

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 entérobactéries.

La dispersion entre les laboratoires est supérieure au niveau critique :

- au niveau 2 pour la méthode alternative
- 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	Entérobactéries	
	Méthode de référence	Méthode alternative
1	0,915	0,793
2	1,313	1,684
3	1,880	0,939

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™ pour le dénombrement des Entérobactéries 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™ pour le dénombrement des Entérobactéries est spécifique et sélective.

5.2. Conclusions de l'étude collaborative

Le biais entre les deux méthodes est faible. Les valeurs sont comprises entre -0,062 et +0,029 log UFC/mL.

Les valeurs de répétabilité de la méthode alternative sont comparables à celles de la méthode de référence pour les niveaux 1 et 2. Pour le niveau 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.

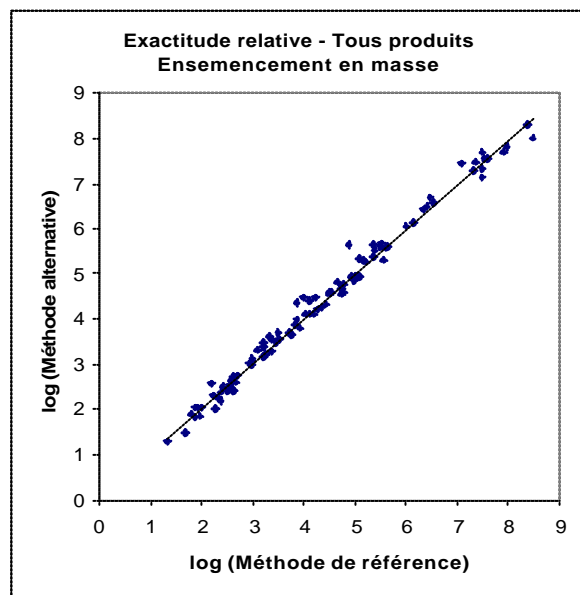
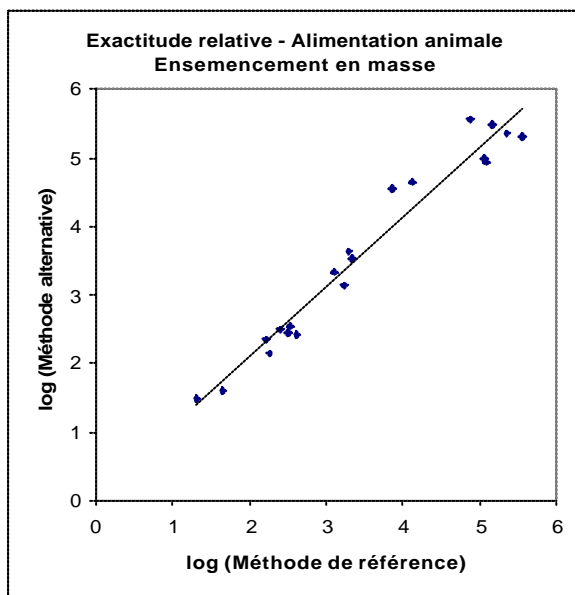
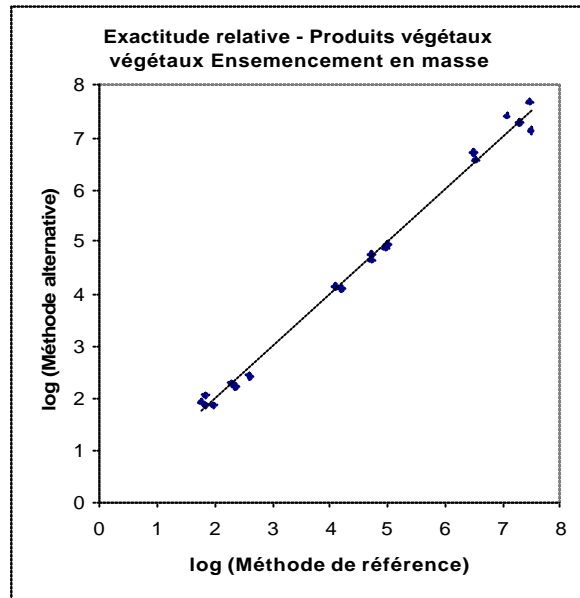
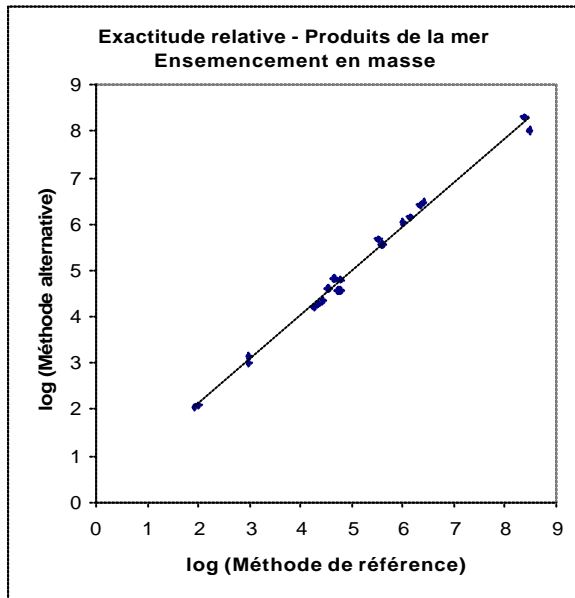
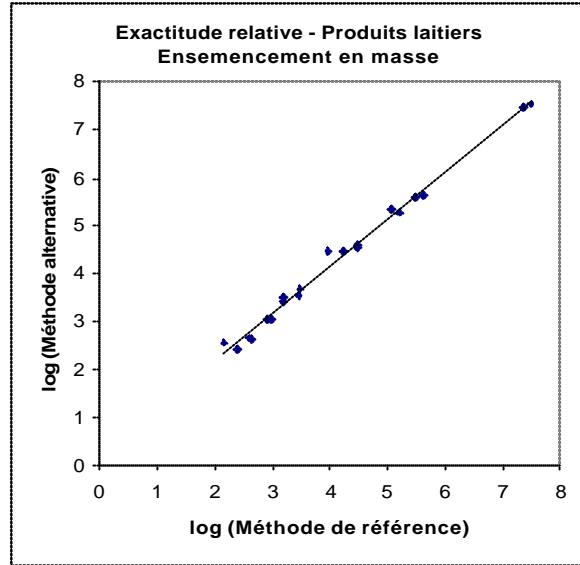
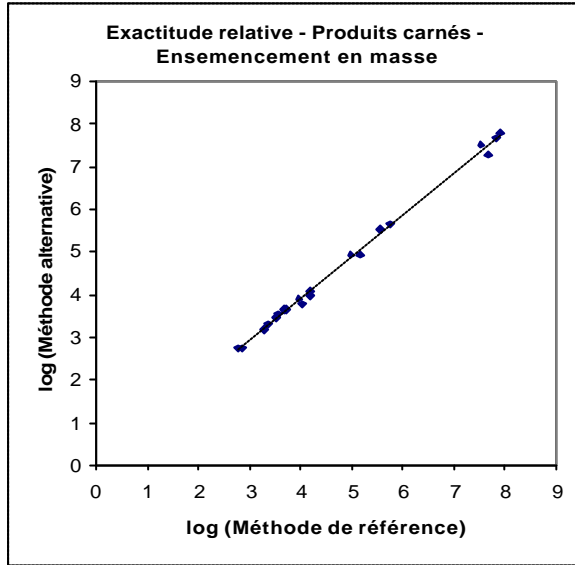
Les valeurs de reproductibilité de la méthode alternative sont comparables à celles de la méthode de référence pour tous les niveaux de contamination

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

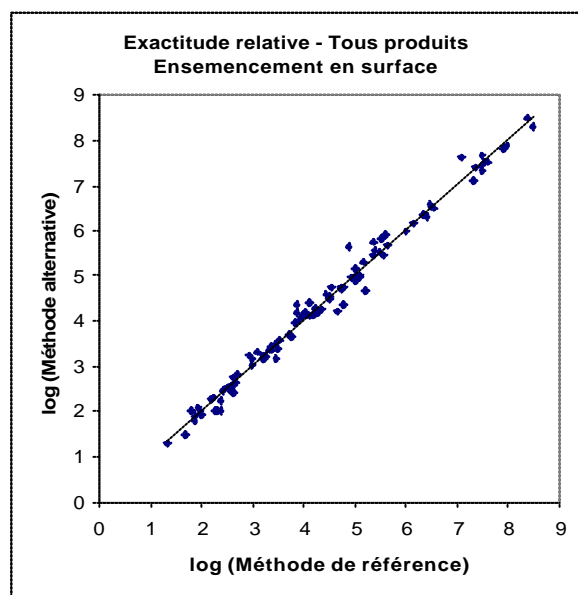
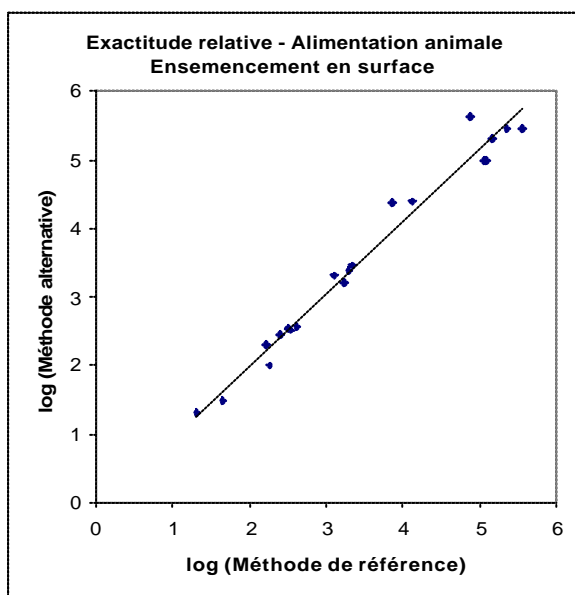
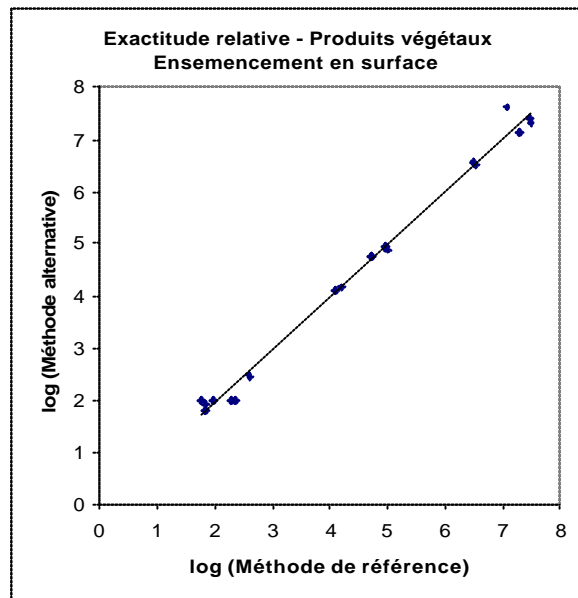
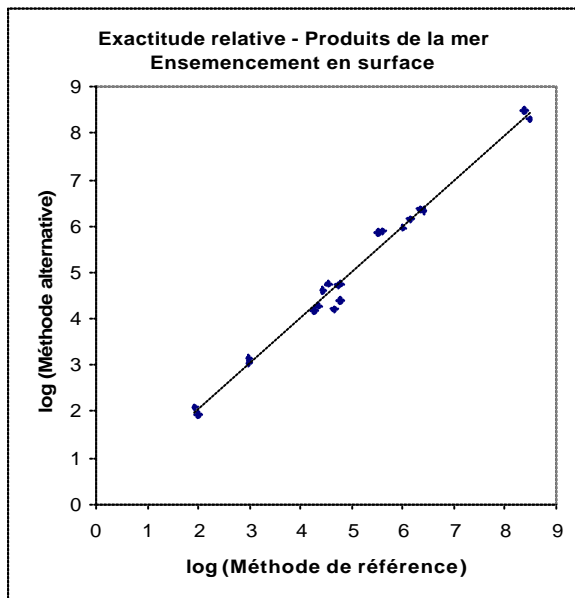
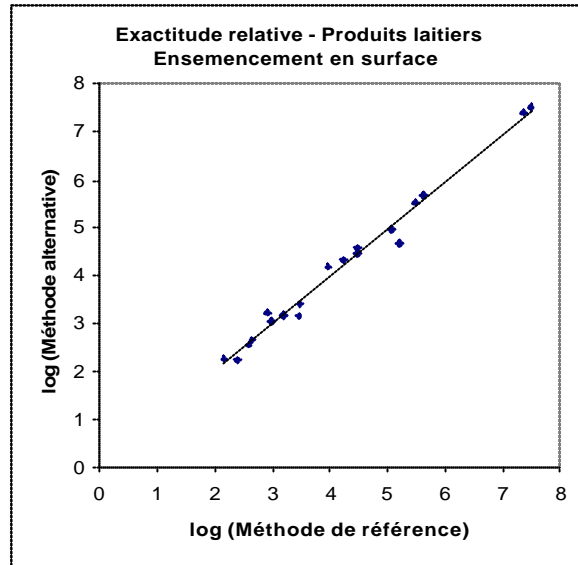
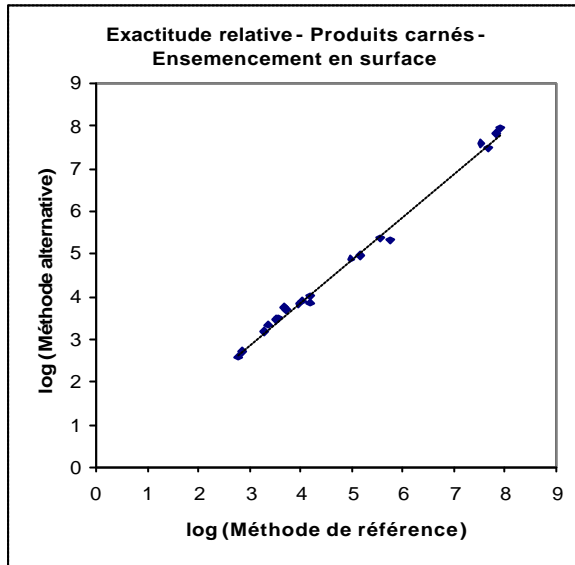
La dispersion entre les laboratoires est du même ordre pour les deux méthodes.

ANNEXE A
EXACTITUDE RELATIVE
GRAPHIQUES BIDIMENSIONNELS

Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en masse



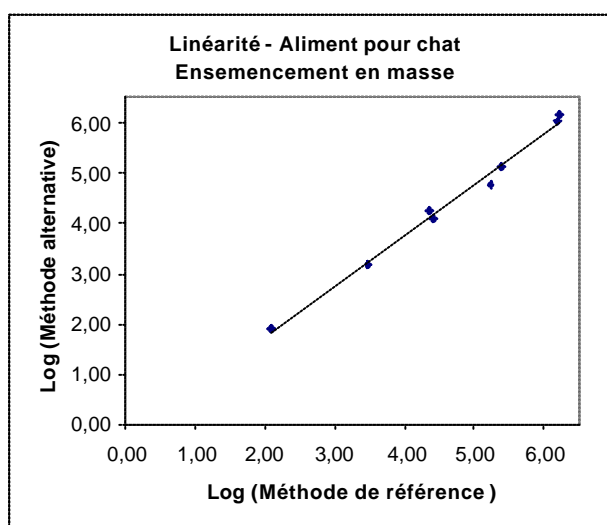
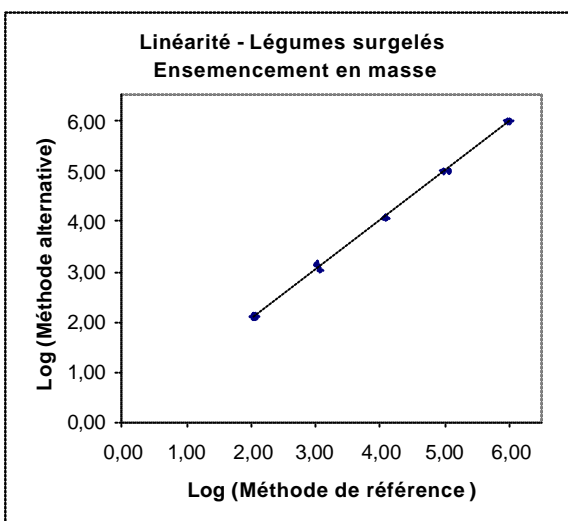
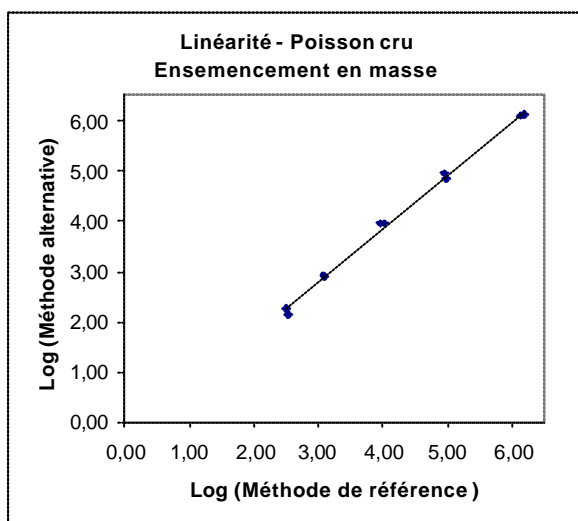
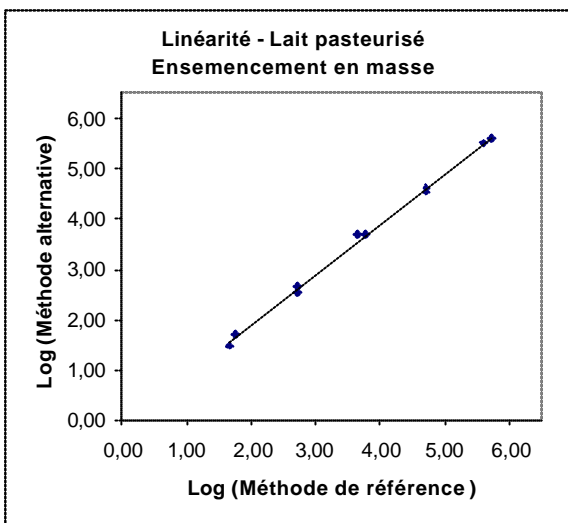
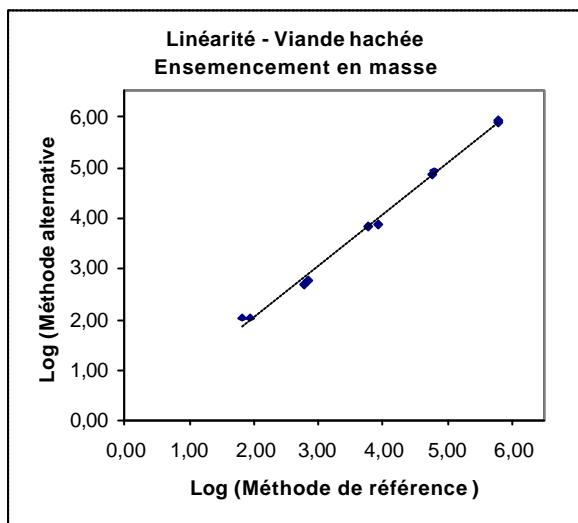
Graphiques bidimensionnels pour les ensemcements en surface



ANNEXE B

LINEARITE

GRAPHIQUES BIDIMENSIONNELS

Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en masse

Graphiques bidimensionnels pour les ensemencements en surface