



Méthodes alternatives d'analyse pour l'agroalimentaire
Performances analytiques certifiées

**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE
SUIVANT LA NORME NF EN ISO 16140 : 2003**

N° attestation : BKR 23/06 – 02/10

Date de validation : 05.02.2010
Fin de validité : 05.02.2014

La Société
(siège social, distributeur,
et site de production)

SOLABIA S.A.S.
Division BOKAR DIAGNOSTICS
29 rue Delizy
93698 PANTIN Cedex

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

COMPASS® *Bacillus cereus* Agar
pour le dénombrement des *Bacillus cereus* présomptifs

Référence du protocole : BK189/F/2006-06 : 7

DOMAINE D'APPLICATION

Produits d'alimentation humaine et animale.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE(S) DE REFERENCE

NF EN ISO 7932 (2005) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs - Technique par comptage des colonies à 30 °C.

Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN

AFNOR Certification

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode COMPASS® *Bacillus cereus* Agar pour le dénombrement des *Bacillus cereus* présumptifs est une méthode fondée sur un milieu de culture chromogénique qui permet le dénombrement des spores et formes végétatives des espèces appartenant au groupe des *Bacillus cereus*. Les colonies caractéristiques de couleur verte apparaissent dès 24 heures d'incubation à 30°C (±1°C). Les deux protocoles d'ensemencement (étalement ou profondeur) sont applicables dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, en cas de doute sur l'aspect caractéristique des colonies, il est possible de confirmer l'appartenance au groupe des *Bacillus cereus* en réalisant le test de l'hémolyse tel que décrit dans la norme NF EN ISO 7932, à raison d'une colonie par boîte.

LINEARITE et EXACTITUDE relative

Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Etude de linéarité :

Des essais ont été effectués en 2009 sur les 5 combinaisons produit alimentaire/souche et dans les catégories d'aliments figurant dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**, aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants : 100, 500, 1 000, 5 000, 10 000 UFC/ gramme.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Méthode par étalement		
Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Paté de campagne / <i>Bacillus cereus</i> 35	$Y = 1,030X - 0,107$
Produits laitiers	Poudre de lait / <i>Bacillus cereus</i> Ad 420	$Y = 0,803X + 0,319$
Ovoproduits	Pâtes fraîches cuisinées / <i>Bacillus weihenstephanensis</i> Ad 780	$Y = 0,945X + 0,147$
Produits végétaux	Purée de légumes / <i>Bacillus mycoïdes</i> Ad 761	$Y = 0,923X + 0,247$
Alimentation animale	Croquettes pour chien / <i>Bacillus cereus</i> 29	$Y = 1,072X - 0,266$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

Méthode par inclusion		
Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Paté de campagne / <i>Bacillus cereus</i> 35	$Y = 0,986X - 0,031$
Produits laitiers	Poudre de lait / <i>Bacillus cereus</i> Ad 420	$Y = 0,881X + 0,287$
Ovoproduits	Pâtes fraîches cuisinées / <i>Bacillus weihenstephanensis</i> Ad 780	$Y = 0,915X + 0,161$
Produits végétaux	Purée de légumes / <i>Bacillus mycoïdes</i> Ad 761	$Y = 0,950X + 0,041$
Alimentation animale	Croquettes pour chien / <i>Bacillus cereus</i> 29	$Y = 1,000X - 0,089$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2009. L'exploitation statistique a porté sur 86 résultats interprétables (dont 62 provenant d'échantillons artificiellement contaminés) pour la méthode par étalement, et 83 résultats interprétables (dont 59 provenant d'échantillons artificiellement contaminés) pour la méthode par inclusion.

Les échantillons appartenait aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, végétaux et ovoproduits, produits de la pêche, échantillons d'environnement

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**.

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)	
	Méthode par étalement	Méthode par inclusion
Produits carnés et produits de la mer	1,70 à 5,23	1,43 à 5,20
Produits laitiers	1,48 à 4,30	1,48 à 4,30
Ovoproduits	1,60 à 6,79	1,90 à 6,79
Produits végétaux	1,70 à 5,72	1,43 à 5,72
Produits d'alimentation animale	1,48 à 3,74	1,48 à 3,74

L'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues, a été établie pour les deux méthodes (étalement et inclusion).

Méthode par étalement :

$$Y = 0,992X - 0,084$$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

Méthode par inclusion :

$$Y = 0,980X - 0,027$$

La répétabilité pour les deux méthodes et le biais entre les deux méthodes ont été déterminés selon le mode de calcul utilisé pour l'étude interlaboratoire (Cf. §6.3.5 et §6.3.6 de la norme NF EN ISO 16140). Ces résultats apportent une information complémentaire pour le critère exactitude.

	Biais D (moyenne des biais individuels)	Limite de répétabilité (en log) méthode alternative	Limite de répétabilité (en log) méthode de référence
Méthode par étalement	- 0,083	0,235	0,235
Méthode par inclusion	- 0,115	0,205	0,235

Conclusion pour la linéarité et l'exactitude relative :

Les études de linéarité et d'exactitude montrent que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence. Le biais entre les deux méthodes est faible. La répétabilité de la méthode alternative par étalement est légèrement supérieure à celle de la méthode de référence, et équivalente avec le protocole par inclusion.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 34 souches du groupe *Bacillus cereus* ont été détectées sur 41 testées. Une souche de *B. pseudomycoïdes* a donné des colonies caractéristiques uniquement par inclusion. Trois autres souches de *Bacillus pseudomycoïdes* (Ad 765, Ad 766 et DSM 307) ne se sont pas développées sur gélose COMPASS® *Bacillus cereus* Agar (mais ont donné des colonies caractéristiques par la méthode de référence). Une souche de *B. weihenstephanensis* (Ad 782) (sur les cinq testées) s'est développée en donnant des colonies blanches. Ces souches ont donné des colonies caractéristiques sur gélose COMPASS® *Bacillus cereus* Agar lors de l'utilisation d'EPT supplémentée avec 1 % de lait stérilisé.
- L'étude de 41 souches ne faisant pas partie du groupe *Bacillus cereus* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats** : L'obtention des résultats positifs et négatifs se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 3 jours avec la méthode de référence.
- **Temps de manipulation** : La méthode COMPASS® *Bacillus cereus* Agar offre un gain de temps important, le temps de manipulation étant réduit.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2009 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de crème anglaise, contaminés artificiellement avec des spores d'une souche de *Bacillus cereus* aux 4 niveaux suivants :

- 0 UFC/g
- 10 – 100 UFC/g
- 100 – 1 000 UFC/g
- 1 000 – 10 000 UFC/g

Les laboratoires ont testé, par la **méthode de référence** et la **méthode alternative** (protocole par étalement), **deux réplicats par niveau** de contamination.

Les résultats obtenus, calculés conformément au projet d'amendement 1 de la norme EN ISO 16140 :2003 (version prA1 :2009), sont les suivants :

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		Biais
		Ecart type de Répétabilité S_r	Ecart type de Reproductibilité S_R	Ecart type de Répétabilité S_r	Ecart type de Reproductibilité S_R	
Niveau 1	14	0,0460	0,1010	0,0911	0,1160	- 0,1077
Niveau 2	14	0,0677	0,1067	0,0523	0,0903	- 0,0430
Niveau 3	14	0,1190	0,1099	0,0900	0,1429	- 0,0451

*Un laboratoire n'a pas respecté les délais d'analyse. Un autre laboratoire n'a pas respecté le protocole d'analyse. Leurs résultats n'ont pas été exploités.

Note : Les limites de répétabilité et de reproductibilité sont calculées à partir des écarts-type de répétabilité et de reproductibilité (facteur multiplicatif de 2,8).

Conclusion

L'étude interlaboratoire montre que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables à ceux obtenus avec la méthode de référence.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire
sur le site www.afnor-validation.org