



CONFIDENTIEL

Certification *AFNOR validation* de la méthode
RAPID' *E.coli* 2 pour le dénombrement des
Escherichia coli β glucuronidase positive à 37°C
selon le référentiel EN ISO 16140

Rapport de synthèse

<u>Date de validation initiale :</u>	02/12/2004
<u>Date de reconduction :</u>	28/11/2008
<u>Numéro d'attestation :</u>	BRD 07/7-12/04

Etude réalisée par :

L'INSTITUT PASTEUR DE LILLE
S.E.R.M.H.A.
1 rue du Professeur Calmette – BP.245
59019 LILLE CEDEX
FRANCE

pour :

BIO-RAD
3, Bd Raymond Poincaré
92 430 MARNES-LA-COQUETTE

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION	2
1.1	REFERENTIEL DE VALIDATION	2
1.2	PROTOCOLE ET PRINCIPE DE LA METHODE ALTERNATIVE	2
1.2.1	Principe de la méthode.....	2
1.2.2	Protocole de la méthode.....	2
1.3	DOMAINE D'APPLICATION.....	2
1.4	METHODE DE REFERENCE A LAQUELLE LA METHODE ALTERNATIVE A ETE COMPAREE	2
1.5	HISTORIQUE DE LA CERTIFICATION SOUS MARQUE AFNOR VALIDATION	2
2	ETUDE COMPARATIVE DES METHODES	3
2.1	EXACTITUDE RELATIVE.....	3
2.1.1	Nature des essais	3
2.1.2	Contaminations artificielles	3
2.1.3	Résultats bruts	4
2.1.4	Interprétation statistique	4
2.1.5	Conclusion.....	5
2.2	LINEARITE.....	5
2.2.1	Nature des essais	5
2.2.2	Résultats bruts	5
2.2.3	Interprétation statistique	6
2.2.4	Conclusion.....	6
2.3	SPECIFICITE / SELECTIVITE (INCLUSIVITE / EXCLUSIVITE).....	7
3	ETUDE INTERLABORATOIRE	7
3.1	ORGANISATION DE L'ETUDE	7
3.2	CONTROLE DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX	7
3.2.1	Avant ensemencement.....	7
3.2.2	Taux de contamination obtenus.....	7
3.3	TEMPERATURES	8
3.3.1	A réception	8
3.3.2	Conclusion.....	8
3.4	RESULTATS	8
3.4.1	Laboratoire expert.....	8
3.4.2	Laboratoires collaborateurs.....	9
3.4.3	Conclusion.....	9
3.5	CALCULS	9
3.5.1	Calcul du biais D.....	9
3.5.2	Répétabilité et reproductibilité.....	10
4	PRATICABILITE	11
5	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	12
6	CONCLUSION	12

1 Introduction

1.1 Référentiel de validation

L'étude de reconduction de validation de la méthode RAPID'*E.coli* 2 pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive a été réalisée en conformité avec le référentiel NF EN ISO 16140 par rapport à la méthode de référence ISO 16649-2.

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

1.2.1 Principe de la méthode

La méthode utilise un milieu chromogénique de dénombrement.

Le principe du milieu repose sur la mise en évidence simultanée de deux activités enzymatiques : la β -D-Glucuronidase (GLUC) et la β -D-Galactosidase (GAL).

Le milieu contient deux substrats chromogéniques :

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

Les *E.coli* (GAL+/GLUC+) forment des colonies violettes à roses.

1.2.2 Protocole de la méthode

A partir d'une suspension-mère diluée au dixième ou directement à partir de l'échantillon s'il est liquide, des volumes de 1ml sontensemencés dans des boîtes de Petri. Différentes dilutions décimales peuvent être également réalisées etensemencées. Le milieu RAPID'*E.coli* 2 est utilisé en simple couche, afin d'améliorer la lisibilité et la praticabilité.

Les géloses RAPID'*E.coli* 2 sont incubées à 37°C pendant 21 heures +/- 3 heures.

Après incubation, les colonies roses à violettes sont dénombrées comme étant des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive.

Le schéma analytique est présenté en annexe A.

1.3 Domaine d'application

Le domaine d'application concerne tous les produits d'alimentation humaine.

1.4 Méthode de référence à laquelle la méthode alternative a été comparée

La méthode de référence utilisée lors de l'étude initiale était la suivante :

- norme NF EN ISO 16649-2 : 2001 : "Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive : Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44°C au moyen d'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronate", utilisant le milieu TBX,ensemencé en profondeur et incubé à 44°C.

Le schéma analytique est présenté en annexe A.

1.5 Historique de la certification sous marque AFNOR Validation

La méthode RAPID'*E.coli* pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive est validée sous le numéro d'attestation BRD 07/7-07/93 depuis décembre 2004.

Les essais de 2004 avaient été réalisés conformément au référentiel NF EN ISO 16140.

La méthode de référence NF EN ISO 16649-2 et les principe et protocole de la méthode alternative RAPID'*E.coli* 2 pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive n'ayant pas été modifiés depuis 2004, aucun complément d'essai n'a été réalisé pour la reconduction de certification *AFNOR Validation* de la méthode RAPID'*E.coli* 2 pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive.

L'ensemble des résultats obtenus en 2004 est repris dans le présent rapport.

2 Etude comparative des méthodes

Les critères suivant ont été déterminés :

- linéarité
- exactitude relative
- inclusivité et exclusivité
- praticabilité

2.1 Exactitude relative

L'exactitude relative définie dans la norme NF EN ISO 16140 est l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

2.1.1 Nature des essais

Les produits ont été analysés en double par les 2 méthodes :

- la méthode de référence NF EN ISO 16649-2, utilisant la gélose TBX,
- la méthode alternative REC2 (37°C).

Au total, 96 produits ont été analysés, de manière à obtenir au moins 50 résultats exploitables.

Les catégories alimentaires et les types d'échantillons étaient les suivants :

Catégories	Types	Echantillons analysés	Echantillons exploités
Produits carnés	viandes et abats	10	3
	viandes de volaille	8	3
	produits assaisonnés (saucisses)	7	4
	TOTAL	25	10
Produits laitiers	lait cru	3	1
	glaces	2	0
	fromages de vache	4	4
	fromages de brebis	2	2
	fromages de chèvre	3	3
TOTAL	14	10	
Produits végétaux	crus	8	3
	surgelés	3	3
	assaisonnés	6	3
	fruits	1	1
	TOTAL	18	10
Produits de la pêche	poissons crus	9	3
	poissons fumés	5	3
	crustacés	7	4
	TOTAL	21	10
Pâtisseries	crèmes	9	5
	chantilly	5	2
	fruits	4	3
	TOTAL	18	10
TOTAL		96	50

La plupart des échantillons dont les résultats n'ont pu être exploités n'étaient pas contaminés en *Escherichia coli*.

2.1.2 Contaminations artificielles

Des contaminations artificielles avaient été réalisées sur 7 échantillons, en utilisant des suspensions contaminantes stressées dont le traitement et l'efficacité du stress avaient été déterminés.

2.1.3 Résultats bruts

Chaque échantillon a été analysé en double par la méthode alternative et par la méthode de référence. Les résultats obtenus pour chaque méthode figurent en annexe B.

Selon la norme NF EN ISO 16140, un graphique bidimensionnel avec les valeurs de chaque échantillon a été tracé. A priori, l'axe vertical (y) est utilisé pour la méthode alternative et l'axe horizontal (x) est utilisé pour la méthode de référence. Les données ont ensuite été testées par un programme de régression linéaire, afin de déterminer la valeur de l'intercept (a) et la valeur de la pente (b).

La relation d'exactitude relative est évaluée avec le modèle : $y = bx + a$.

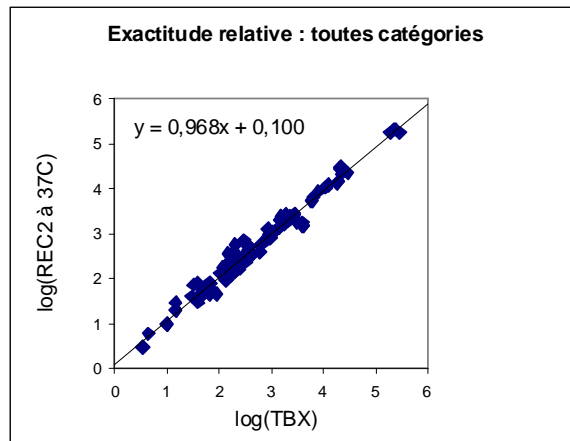
Pour chacune des méthodes, les écarts-type de répétabilité ont calculés (sr(x) et Rob.sr(x) & sr(y) et Rob.sr(y)).

En fonction du rapport de ces écarts-type $R = sr(y) / sr(x)$ et $Rob.R = Rob.sr(y) / Rob.sr(x)$, la régression linéaire à utiliser pour l'interprétation est définie dans la norme NF EN ISO 16140.

Les graphiques suivants représentent les valeurs brutes obtenues pour les échantillons analysés, toute catégories confondues.

La droite représentée est la première bissectrice ($y = x$).

Graphique 1



2.1.4 Interprétation statistique

Afin de vérifier si l'exactitude relative est satisfaisante, les deux hypothèses suivantes doivent être vérifiées au risque $\alpha = 5\%$:

- **Ordonnée à l'origine (ou intercept) {a = 0}**

La méthode alternative présente un biais systématique par rapport à la méthode de référence :

- si la valeur $t = a / S_a$ avec (q-2) degrés de liberté est supérieure à la valeur critique $T_{critique}$, obtenue dans la table de Student, ou
- si la probabilité $p\{a = 0\} < \alpha (=0,05)$, $p\{a = 0\}$ étant définie par la loi de Student

- **Pente {b = 1}**

Si la méthode alternative ne donne pas les mêmes valeurs que la méthode de référence :

- la valeur $t = (b-1) / S_b$ avec (q-2) degrés de liberté est supérieure à la valeur critique $T_{critique}$, obtenue dans la table de Student, ou
- si la probabilité $p\{b = 1\} < \alpha (=0,05)$, $p\{b = 1\}$ étant définie par la loi de Student

Les données ayant été statistiquement analysées selon le référentiel NF EN ISO 16140, les résultats obtenus : régressions utilisées, valeurs de a (ordonnée à l'origine) et de b (pentes) obtenues pour toutes catégories confondues dans le tableau suivant :

Matrice	Rob.R	Régression utilisée	a	t(a)	p(t ;a=0)	b	t(b)	p(t ;b=1)	Conclusion
Tous produits	1,06	GMFR	0,100	1,904	0,063	0,968	1,836	0,072	{a=0} acceptée {b=1} acceptée

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

$$y = 0,100 + 0,968 x \quad (r^2 = 0,984)$$

avec :
 $y = \log(N \text{ méthode alternative})$
 $x = \log(N \text{ méthode de référence})$

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

Méthode alternative	Méthode de référence
r = 0,23	r = 0,22

Le biais entre les deux méthodes (méthode alternative – méthode de référence) était D = 0,01 log.

2.1.5 Conclusion

Pour l'ensemble des produits, les deux hypothèses {a=0} et {b=1} étaient acceptées. Il n'y avait pas de biais systématique entre les méthodes.

Les limites de répétabilité calculées pour toutes catégories confondues sont tout à fait satisfaisantes : 0,22 log pour la méthode de référence NF EN ISO 16649-3 et 0,23 log pour la méthode alternative.

Le biais calculé entre la méthode alternative et la méthode de référence est de 0,01 log UFC/g.

2.2 Linéarité

La linéarité définie dans la norme NF EN ISO 16140 est 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 Nature des essais

Cinq produits ont été contaminés, à cinq niveaux de contamination, par cinq souches d'*Escherichia coli* d'origines différentes. Chaque échantillon par niveau a été dupliqué, en réalisant deux séries de dilutions, et analysé par la méthode alternative et par la méthode de référence.

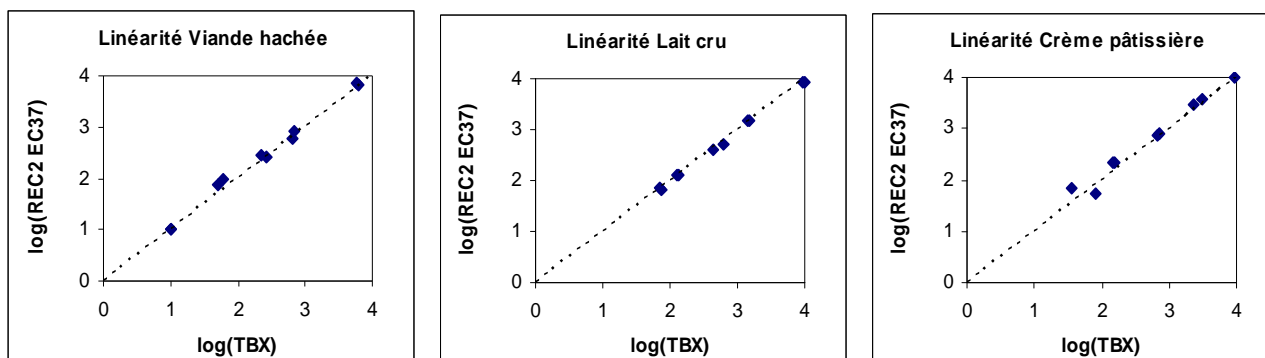
Produit	Souche	Origine
viande de bœuf hachée	<i>E.coli</i>	rognons de porc
lait cru	<i>E.coli</i>	lait cru
filet de poisson	<i>E.coli</i>	crépinette
chou rouge	<i>E.coli</i>	chou rouge
crème pâtissière	<i>E.coli</i>	crème vanille

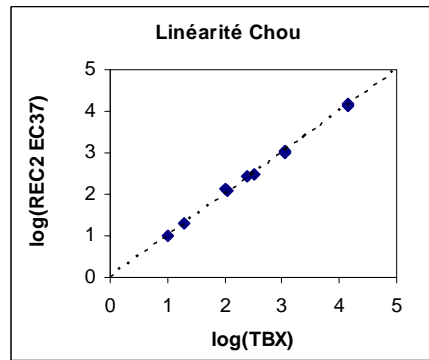
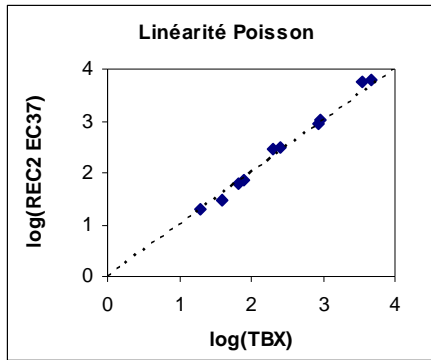
2.2.2 Résultats bruts

Comme pour l'exactitude relative, selon la norme NF EN ISO 16140, un graphique bidimensionnel avec les valeurs de chaque échantillon a été tracé pour chaque produit contaminé. L'axe vertical (y) est utilisé pour la méthode alternative et l'axe horizontal (x) est utilisé pour la méthode de référence.

La droite représentée sur les graphiques suivants est la première bissectrice ($y = x$).

Les graphiques bidimensionnels obtenus sont présentés ci-dessous :





2.2.3 Interprétation statistique

La non linéarité est déterminée par l'évaluation du défaut d'ajustement (lack of fit).
Il s'agit de calculer la valeur Rob.F :

$$\text{Rob.F} = \frac{(N-2) (s^2_{y:x} / \text{Rob.sr}(y)^2) - q (n-1)}{q-2}$$

avec q, le nombre de niveaux (q = 5)
n, le nombre de réplicats pour chaque niveau (n = 2)
N, le nombre d'échantillons (N = nq)

La relation n'est pas linéaire

- si [Rob.F > Fcrit (vnum, vden)]

ou

- si p(F, vnum, vden).< α (=0,05)

Les droites des régressions obtenues, ainsi que les valeurs de Rob.F et les conclusions associées sont reprises dans le tableau suivant :

Matrice	Rob.R	Régression utilisée	Fcritique	Rob.F	p (Rob.F) %	Conclusion
viande hachée	1,015	GMFR	5,41	17,054	0 %	non linéaire
lait cru	0,727	GMFR	5,41	4,885	6 %	linéaire
crème pâtissière	0,865	GMFR	5,41	2,070	22 %	linéaire
poisson	0,555	GMFR	5,41	5,261	5 %	linéaire
chou	1,072	GMFR	5,41	0,405	76 %	linéaire

Les équations des droites de régression et les coefficients de corrélation obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

viande hachée	log(Ref) = -0,061 + 1,003 log(Alt)	R ² = 0,995
lait cru	log(Ref) = -0,002 + 0,990 log(Alt)	R ² = 0,999
crème pâtissière	log(Ref) = 0,202 + 0,951 log(Alt)	R ² = 0,996
poisson	log(Ref) = -0,188 + 1,096 log(Alt)	R ² = 0,997
chou	log(Ref) = 0,037 + 0,990 log(Alt)	R ² = 0,999

2.2.4 Conclusion

Pour la viande hachée, les tests statistiques concluent à une non linéarité. Néanmoins, les résultats obtenus, ainsi que la droite de corrélation sont tout à fait satisfaisants.

Pour les autres matrices, les tests statistiques concluent à la linéarité de la relation entre la méthode de référence et la méthode alternative au risque α = 5%.

2.3 Spécificité / Sélectivité (Inclusivité / Exclusivité)

L'objectif de cette étude était de s'assurer que les *Escherichia coli* β -glucuronidase positive était détectés et qu'il n'existait pas de réactions croisées avec d'autres souches que *Escherichia coli* β -glucuronidase positive. Ces essais ont été réalisés lors de l'étude de reconduction de 2004.

30 souches positives et 54 souches négatives ont été testées, en double, par la méthode alternative. Les résultats figurent en annexe C.

Toutes les souches d'*Escherichia coli* β -glucuronidase positive ont cultivé sur le milieu et ont donné des colonies caractéristiques.

Toutes les souches négatives, lorsqu'elles se sont développées, ont donné un aspect non caractéristique, sauf *Shigella sonnei* et deux souches de *Salmonella arizonae* (Lactose +).

Ces trois souches ont été testées en parallèle avec la méthode de référence (inclusion en milieu TBX). Elles ont donné un aspect caractéristique sur le milieu TBX également (colonies bleues).

3 Etude interlaboratoire

3.1 Organisation de l'étude

- Nombre de laboratoires participants

16 laboratoires étaient destinataires des échantillons.

- Echantillons

La matrice « lait pasteurisé » a été contaminée par une souche d'*Escherichia coli* β -glucuronidase positive (EC 27) isolée à partir d'une pâtisserie.

- Nombre d'échantillons

Huit échantillons par laboratoire ont été préparés, avec deux flacons par niveau de contamination.

- Analyses

Les laboratoires participants et le laboratoire expert ont réalisé les analyses par la méthode de référence NF EN ISO 16649-2 et deux boîtesensemencées par dilution décimale, et par la méthode alternative.

Les analyses ont été réalisées deux jours après envoi des échantillons.

3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux

3.2.1 Avant ensemencement

Le lait pasteurisé utilisé a été analysé (5 prises d'essai), selon la méthode de référence NF ISO 16649-2, avant les contaminations, pour nous assurer de l'absence d'*Escherichia coli* β -glucuronidase.

Aucune des prises d'essai de 25 ml ne contenait d'*Escherichia coli* β -glucuronidase.

La flore naturelle présente dans la matrice variait entre <1 UFC/ml et $9,2 \cdot 10^2$ UFC/ml.

3.2.2 Taux de contamination obtenus

Les taux de contaminations obtenus dans la matrice, avant envoi, figurent dans le tableau ci-dessous :

Taux visé (UFC / ml)	Taux obtenu pour <i>E.coli</i> (UFC / ml)
100	47
1000	455
10000	5750

3.3 Températures

3.3.1 A réception

Les températures obtenues sont reprises dans le tableau ci-dessous :

Laboratoire	Température à réception	Commentaires
A	/	
B	5.0°C	Thermobouton : 3.8°C
C	3.3°C	Thermobouton non reçu
D	/	
E	-0.3°C	Aucun échantillon congelé Thermobouton : 0.5°C
F	6.8°C	Thermobouton : 2.5°C
G	4.1°C	Thermobouton : 4.5°C
H	7.1°C	Thermobouton : 4.9°C
I	/	
J	/	
K	5.4°C	Thermobouton non reçu
L	8.5°C	Thermobouton : 3.2°C
M	5.0°C	Thermobouton non reçu
N	/	Thermobouton : 4.5°C
O	Non transmise	Thermobouton : 3.2°C
P	7.0°C	Thermobouton : 4.2°C

3.3.2 Conclusion

Les températures relevées par les laboratoires correspondent globalement aux températures enregistrées par les thermoboutons, sauf pour les laboratoires H et L.

Après analyse des courbes, il s'avère que la température à l'arrivée au laboratoire est plus basse que celle relevée. Les températures indiquées ont vraisemblablement été prises quelque temps après l'ouverture du colis.

Parmi les 11 laboratoires ayant réalisé les essais, nous n'avons pas réceptionné les thermoboutons de trois laboratoires (C, K et M). Au vu de leur température à réception, nous pouvons considérer que leurs essais sont valables.

3.4 Résultats

3.4.1 Laboratoire expert

	Méthode de référence NF EN ISO 16649-2		Méthode alternative	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
Niveau 0	<1	<1	<1	<1
Niveau 1	60	55	49	42
Niveau 2	514	455	436	382
Niveau 3	4818	5682	3545	3455

Les résultats obtenus par la méthode NF ISO 16649-2 et par la méthode alternative sont concordants.

3.4.2 Laboratoires collaborateurs

Les résultats des 10 laboratoires ayant réalisé les analyses conformément aux instructions sont repris dans les tableaux suivants, selon les exigences de la norme NF EN ISO 16140 : 2003.

a) Niveau 1 (résultats en UFC/ml)

Laboratoire	Méthode de référence		Méthode alternative	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
B	48	51	49	40
C	58	49	53	59
E	52	65	63	55
F	45	43	55	66
H	26	48	52	55
K	48	55	55	55
L	41	20	42	90
M	22	30	43	50
O	32	20	41	65
P	54	45	49	43

b) Niveau 2 (résultats en UFC/ml)

Laboratoire	Méthode de référence		Méthode alternative	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
B	441	464	527	536
C	718	714	600	645
E	518	527	636	564
F	427	436	473	582
H	559	482	609	791
K	314	423	564	500
L	364	473	391	418
M	468	477	482	473
O	286	250	436	518
P	673	609	418	391

c) Niveau 3 (résultats en UFC/ml)

Laboratoire	Méthode de référence		Méthode alternative	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
B	4273	5045	5182	5182
C	9500	6818	7273	7182
E	6773	6409	7818	6000
F	3773	3409	4455	4818
H	6000	4091	7364	5182
K	3091	5545	5727	5455
L	4636	5273	5182	5545
M	6591	4273	6364	5273
O	4864	5182	5000	6818
P	5909	7818	5727	5818

3.4.3 Conclusion

Parmi les 11 laboratoires ayant réalisé les essais, le laboratoire G a analysé les échantillons 48 heures après réception, soit 72 heures après contamination des flacons de lait pasteurisé. Ces résultats n'ont pas été exploités. Les dénombrements obtenus pour tous les laboratoires sont du même ordre que ceux du laboratoire expert.

Au final, l'interprétation a été réalisée avec les résultats de 10 laboratoires.

3.5 Calculs

L'exploitation des résultats a été réalisée selon la norme NF EN ISO 16140 : 2003, par niveau de contamination. Les résultats ont préalablement été convertis en log.

3.5.1 Calcul du biais D

Pour chaque niveau et par laboratoire, les différences de résultats (d_i) obtenus entre la méthode alternative et la méthode de référence sont calculées, ce qui permet de déterminer le **biais D** ($=MED\{d_i\}$), ainsi que l'**écart-type robuste** $s\{d_i\}$ ($=k_1 S_n$).

Afin de vérifier si l'exactitude relative est satisfaisante, l'**hypothèse {D = 0}** est testée pour chaque niveau, en calculant la statistique :

$$t(d) = MED\{d_i\} \sqrt{n} / s\{d_i\} \quad \text{pour } n-1 \text{ degrés de liberté (n étant le nombre de laboratoires) au risque } \alpha = 5\%$$

Le biais entre les deux méthodes est significatif si la valeur $t(d)$ est supérieure à la valeur critique, $T_{critique}$, obtenue dans la table de Student, ce qui signifie également que la méthode alternative manque d'exactitude par rapport à la méthode de référence pour le niveau testé.

Les valeurs du biais (alternative – référence), de l'écart-type robuste des différences et de la statistique $t(d)$ sont reprises dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : Biais D, Ecart-type des différences $s\{d_i\}$ et statistique $t(d)$
(calculs réalisés en 2004 selon le référentiel NF EN ISO 16140)

	Biais D (log)	$s\{d_i\}$	$t(d)$	$T_{critique}$	Conclusion
Niveau 1	0,083	0,190	1,380	2,262	{D=0} acceptée
Niveau 2	0,073	0,108	2,156	2,262	{D=0} acceptée
Niveau 3	0,043	0,074	1,830	2,262	{D=0} acceptée

Conclusion

Pour tous les niveaux, l'hypothèse, selon laquelle le biais entre les deux méthodes (méthode alternative – méthode de référence) est nul, est acceptée au risque $\alpha = 5\%$.

3.5.2 Répétabilité et reproductibilité

3.5.2.1 Limite de répétabilité

Pour chaque méthode et chaque niveau a été calculée la **limite de répétabilité** : $r = 2,8 S_r$, avec S_r : écart-type de répétabilité

Tableau 2 : Limites de répétabilité r (log UFC/ml)

	r (ISO 16649-2)	r (REC2 EC37)
Niveau 1 (10 – 100 UFC/ml)	0,20	0,19
Niveau 2 (100 – 1 000 UFC/ml)	0,16	0,16
Niveau 3 (1 000 – 10 000 UFC/ml)	0,19	0,20

Conclusion

Pour les niveaux 1 et 2, les deux méthodes sont comparables en terme de répétabilité.

Pour le niveau 3, la méthode alternative diffère de la méthode de référence : la répétabilité de la méthode alternative est meilleure que celle de la méthode de référence.

3.5.2.2 Limite de reproductibilité

Pour chaque méthode et chaque niveau a été calculée la **limite de reproductibilité** : $R = 2,8 S_R$, avec S_R : écart-type de reproductibilité

Tableau 3 : Limites de reproductibilité R (log UFC/ml)

	R (ISO 16649-2)	R (REC2 EC37)
Niveau 1 (10 – 100 UFC/ml)	0,48	0,22
Niveau 2 (100 – 1 000 UFC/ml)	0,37	0,25
Niveau 3 (1 000 – 10 000 UFC/ml)	0,36	0,15

Conclusion

Pour les niveaux 1 et 3, la méthode alternative diffère de la méthode de référence : la reproductibilité de la méthode alternative est meilleure que celle de la méthode de référence.

Pour le niveau 2, les deux méthodes sont comparables en terme de reproductibilité.

4 Praticabilité

La praticabilité a été étudiée en fonction des 13 critères définis par le bureau technique en comparant la méthode de référence NF EN ISO 16649-2 dans son ensemble au dénombrement des *E.coli* β-glucuronidase positive.

- mode de conditionnement des éléments de la méthode :

Le milieu RAPID'*E.coli* 2 est proposé en flacons de milieu prêt à l'emploi ou en flacons de poudre déshydratée.

- volumes des réactifs :

100 ml par flacon de milieu prêt à l'emploi

500 g par flacon de poudre déshydratée

- conditions de stockage :

La température de stockage est indiquée sur les conditionnements, ainsi que dans la fiche technique.

La température de stockage est de +2 ° 8°C pour le milieu prêt à l'emploi et de +15 ° 25°C pour le milieu déshydraté

- péremption :

Précisions sur le coffret et sur chaque boîte.

La validité du milieu est de 14 mois pour le milieu prêt à l'emploi et de 39 mois pour le milieu déshydraté.

- modalités d'utilisation après première utilisation :

Pour le milieu déshydraté, il est nécessaire de bien agiter la poudre avant chaque utilisation.

- équipements ou locaux spécifiques nécessaires :

Configuration normale et matériel courant d'un laboratoire de microbiologie.

- réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer :

/

- durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode :

Pour un opérateur formé aux techniques classiques de microbiologie, la formation à la technique nécessite moins de 1 jour.

- temps réel de manipulation et flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser

Etapas	Temps moyen pour un échantillon (min)	
	Norme ISO 16 649-2	RAPID' <i>E.coli</i> 2
Préparation, pesée, dilutions	7	7
Ensemencement	3	1,5
Lectures, interprétation et calcul	1	1
Temps total moyen	11 minutes	9.5 minutes

- délai d'obtention des résultats :

Les résultats sont obtenus en 18 à 24 heures pour les deux méthodes : méthode NF ISO 16649-2 et méthode RAPID'*E.coli* 2.

- type de qualification de l'opérateur :

Niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence

- étapes communes avec la méthode de référence :

Seuls le milieu utilisé et la couleur des colonies caractéristiques diffèrent entre les deux méthodes.

- traçabilité des résultats d'analyse :

/

5 Etude bibliographique

Aucune publication mentionnant l'utilisation du milieu RAPID'E.coli 2 dans le domaine alimentaire n'a été trouvée.

Un article a été publié dans le domaine des eaux :

[Prats, J., Garcia-Armisen, T., Larrea, J. and Servais, P. \(2008\) Comparison of culture-based methods to enumerate *Escherichia coli* in tropical and temperate freshwaters *Letters Appl Microbiol* **46**, 243-248](#)

Des comparaisons entre 3 milieux chromogènes, dont le milieu RAPID'E.coli, et la méthode NPP ont été réalisées et les corrélations obtenues sont similaires quel que soit le milieu utilisé pour une utilisation sur des eaux tempérées. A noter également, que le protocole n'est pas celui de la méthode validée pour l'alimentation humaine.

La méthode RAPID'E.coli 2 est validée par d'autres organismes :

- [la validation AOAC RI](#), Certificate N° 050601 a été obtenue en 2005, en comparaison à la méthode AOAC officielle par NPP, et a donné lieu à la publication suivante :
[Lauer, W.F., Martinez, F. and Patel, A. \(2007\) Validation of RAPID E.coli 2 for enumeration and differentiation of *Escherichia coli* and other coliform bacteria in selected foods – Performance-Tested Method 050601 *J. AOAC Int.* **90\(5\)**, 1284-315](#)
- [la validation NORDVAL](#), Ref. N° 2005-30-5408-00050, a été obtenue en 2005 sur la base des résultats de l'étude de validation réalisée dans le cadre de la certification AFNOR Validation :

6 Conclusion

La méthode RAPID'E.coli 2 (37°C) a été comparée à la méthode NF EN ISO 16649-2.

Les résultats obtenus lors de l'étude comparative des méthodes permettent de conclure que :

- la relation entre les deux méthodes est linéaire,
- l'exactitude relative de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence est satisfaisante. Les valeurs de répétabilité (en log) obtenues pour la méthode alternative et la méthode de référence sont de 0,23 log pour la méthode alternative et 0,22 log pour la méthode de référence. Le biais entre les deux méthodes (méthode alternative – méthode de référence), calculée sur les données d'exactitude est $D = 0,01 \text{ log}$.

Les résultats obtenus lors de l'étude interlaboratoire permettent de conclure que :

- pour tous les niveaux, l'exactitude relative de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence est satisfaisante. L'hypothèse, selon laquelle le biais entre les deux méthodes est nul, est vérifiée,
- les valeurs de répétabilité sont satisfaisantes : elle varie de 0,15 à 0,28 log (UFC/ml) pour la méthode de référence et de 0,09 à 0,18 log (UFC/ml) pour la méthode alternative,
- les valeurs de reproductibilité sont meilleures pour la méthode alternative que pour la méthode de référence : elle varie de 0,36 à 0,48 log (UFC/ml) pour la méthode de référence et de 0,15 à 0,25 log (UFC/ml) pour la méthode alternative,
- la dispersion des résultats entre les laboratoires est plus importante pour la méthode de référence que pour la méthode alternative.

Lille, le 27 juillet 2009



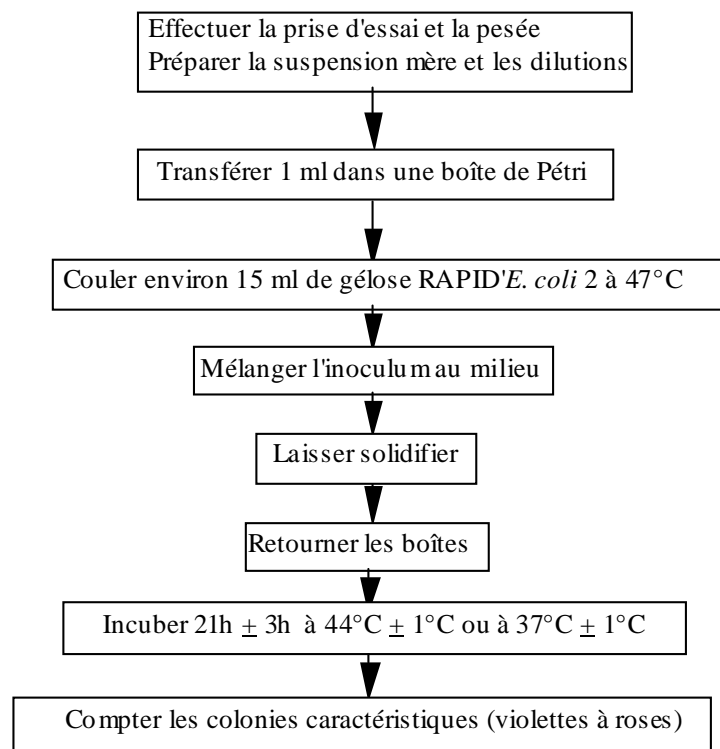
Virginie Ewe
Responsable Etudes

ANNEXES

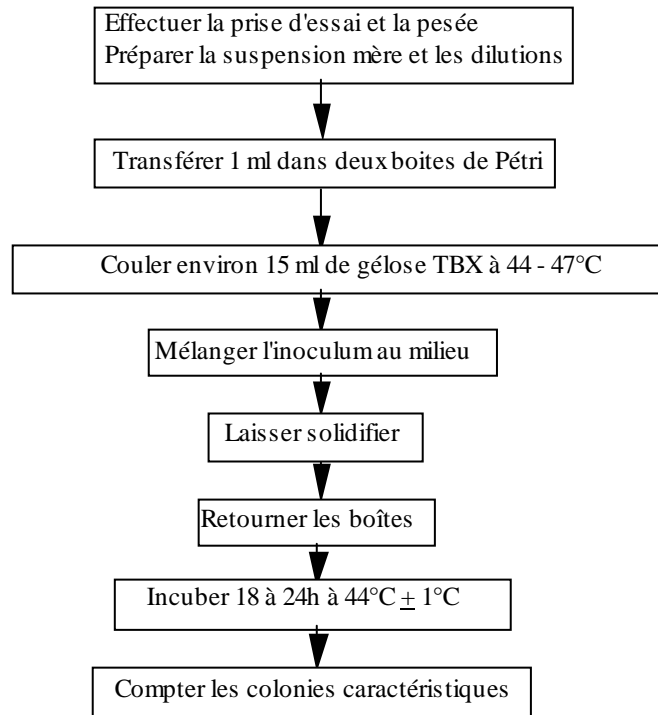
ANNEXE A :

PROTOCOLES ANALYTIQUES

DENOMBREMENT DES *Escherichia coli* β glucuronidase positive SELON LA METHODE RAPID'*E. coli* 2



DENOMBREMENT DES *Escherichia coli* β glucuronidase positive SELON LA NORME NF ISO 16649-2



ANNEXE B :

EXACTITUDE RELATIVE
-
RESULTATS

RESULTATS DES DENOMBREMENTS D'E.coli (UFC/g)

Code	Cat	Produit	Méthode de référence (TBX)		Méthode alternative (REC2 à 37°C)	
			Résultat 1	Résultat 2	Résultat 1	Résultat 2
1	PC	abats	232	232	ND	ND
2	PC	bœuf haché	<10	<10	<10	<10
3	PC	merguez	118	205	182	200
4	PC	saucisse de veau	150	177	209	118
6	PC	saucisse aux herbes	382	364	518	445
11	PC	gigot d'agneau	<10	<10	<10	<10
12	PC	blanquette de dinde	<10	<10	<10	<10
13	PC	merguez	15	10	ND	ND
14	PC	escalope de dinde	127	141	ND	ND
26	PC	steak de dinde	10	5	<10	<10
27	PC	filet de poulet	10	35	ND	ND
28	PC	filet de dinde	5	5	<10	<10
29	PC	rognons de bœuf	70	105	60	130
31	PC	saucisse	30	15	40	20
32	PC	escalope de dinde	832	932	827	827
33	PC	steak haché	55	45	64	40
34	PC	chipolata	964	1214	845	1109
35	PC	escalope de veau	195	450	400	345
38	PC	escalope de dinde	<10	<10	<10	<10
39	PC	steak de dinde	15	10	20	10
64	PC	viande hachée	<10	<10	<10	<10
65	PC	viande hachée	ND	ND	ND	ND
82	PC	bœuf haché	ND	ND	ND	ND
83	PC	jambon fumé	ND	ND	ND	ND
84	PC	steak de cheval	ND	ND	ND	ND
L1	PL	lait cru	<1	<1	<1	<1
L2	PL	lait cru	<1	<1	<1	<1
L3	PL	glace nougat	<1	<1	<1	<1
L4	PL	glace chocolat	<1	<1	<1	<1
5	PL	lait cru	4	5	3	6
10	PL	reblochon	868	950	1273	800
24	PL	reblochon	40	45	30	64
25	PL	roquefort	209	300	564	700
36	PL	fromage au lait cru	19500	18000	15000	13000
37	PL	tomme	332	359	236	273
59	PL	fromage lait cru	2773	3182	2636	1818
77	PL	brie	1423	1395	1373	1345
78	PL	reblochon	6227	8227	5273	8909
90	PL	fromage lait cru CA	1545	1455	2455	2000
15	PV	taboulé	<10	<10	<10	<10
16	PV	concombre	<10	<10	<10	<10
21	PV	salade de tomates	<10	5	<10	<10
30	PV	épinards	6045	6545	5455	6545
45	PV	concombre	<10	<10	<10	<10
47	PV	betterave rouge	1014	918	1080	990
48	PV	pomme de terre	4182	4000	1500	1500
49	PV	carottes rapées nature	<10	<10	<10	<10
50	PV	macédoine	65	65	45	82
56	PV	compote de fruits	655	605	582	400
58	PV	chou rouge	15	10	30	10
66	PV	chou rouge CA	305	155	309	355
67	PV	chou rouge	<10	<10	<10	<10
68	PV	chou rouge	<10	<10	<10	<10
69	PV	pommes de terre	136	118	91	136
71	PV	tomates au thon	140	245	127	164
89	PV	carottes rapées nature	1591	2091	2364	1909

RESULTATS DES DENOMBREMENTS D'E.coli (UFC/g)

Code	Cat	Produit	Méthode de référence (TBX)		Méthode alternative (REC2 à 37°C)	
			Résultat 1	Résultat 2	Résultat 1	Résultat 2
7	PP	poisson	<10	<10	<10	<10
8	PP	poisson	<10	<10	<10	<10
9	PP	poisson	<10	<10	<10	<10
22	PP	thon	<10	<10	<10	<10
41	PP	moules	<10	<10	<10	<10
42	PP	moules	127	214	164	327
43	PP	filet de cabillaud	<10	<10	<10	<10
52	PP	filet de rouget	21500	21000	30000	28000
53	PP	darne de saumon	29000	22000	22000	21000
54	PP	poisson	290000	225000	180000	200000
55	PP	saumon fumé	240000	195000	200000	180000
61	PP	crevettes CA	2318	1955	2273	2455
62	PP	moules	ND	ND	ND	ND
63	PP	crevettes	ND	ND	ND	ND
73	PP	calamars CA	1009	1018	1073	1100
74	PP	calamars CA	2273	2773	2364	2818
79	PP	saumon fumé	ND	ND	ND	ND
80	PP	filet de cabillaud	ND	ND	ND	ND
81	PP	filet de marlin fumé	<10	<10	<10	<10
91	PP	saumon fumé CA	255	200	209	145
92	PP	saumon fumé CA	1864	1909	2636	2273
17	PAT	savarin choco	5	<10	10	10
18	PAT	éclair crème	<10	<10	<10	<10
19	PAT	salade de pâtes	5	5	<10	<10
20	PAT	éclair au café	90	40	45	40
23	PAT	crème chocolat	<10	5	<10	10
40	PAT	crème à la banane	70	40	80	80
44	PAT	crème à la fraise	<10	<10	<10	<10
46	PAT	chou à la crème	<10	<10	<10	<10
51	PAT	tarte pommes	<10	<10	<10	<10
57	PAT	fraisier	33	67	73	60
60	PAT	gateau abricot	286	241	282	300
70	PAT	éclair au café	138	133	191	191
72	PAT	gateau aux pêches	4000	3864	1764	1764
75	PAT	chou à la crème	<10	<10	<10	<10
76	PAT	chou à la crème	<10	<10	<10	<10
93	PAT	chou crème	177	173	145	191
94	PAT	tarte pommes	1773	2000	1636	2000
95	PAT	versillais	23182	21818	25455	30000
96	PAT	gateau choco	12136	11000	12273	10364

ANNEXE C :

SPECIFICITE

Souche	Origine	PCA à 30°C		REC2 à 37°C	
		Culture	Nombre de colonies	Couleur des colonies	Nombre de colonies
<i>Citrobacter diversus</i>	Aliments animaux	Positive	146	bleu	120
		Positive	132	bleu	112
<i>Citrobacter diversus</i>	Herbes séchées	Positive	136	bleu	152
		Positive	143	bleu	140
<i>Citrobacter diversus</i>	Levure	Positive	164	bleu	123
		Positive	112	bleu	99
<i>Citrobacter freundii</i>	Produit carné	Positive	39	bleu	40
		Positive	55	bleu	58
<i>Citrobacter freundii</i>	Végétaux	Positive	38	bleu	44
		Positive	59	bleu	56
<i>Citrobacter freundii</i>	Poisson	Positive	33	bleu	46
		Positive	51	bleu	50
<i>Citrobacter freundii</i>	Lait	Positive	66	bleu	67
		Positive	90	bleu	93
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Brochette de poisson	Positive	96	bleu	87
		Positive	71	bleu	76
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Jambon	Positive	60	bleu	70
		Positive	67	bleu	73
<i>Enterobacter cloacae</i>	Produit laitier	Positive	86	bleu	91
		Positive	81	bleu	75
<i>Enterobacter cloacae</i>	Produit laitier	Positive	48	bleu	50
		Positive	63	bleu	42
<i>Enterobacter cloacae</i>	Produit laitier	Positive	118	bleu	127
		Positive	110	bleu	124
<i>Enterobacter cloacae</i>	Produit laitier	Positive	88	bleu	105
		Positive	91	bleu	86
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Aliments animaux	Positive	135	bleu	140
		Positive	113	bleu	104
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Pâtisserie	Positive	75	bleu	85
		Positive	59	bleu	51
<i>Erwinia spp.</i>	Collection	Positive	23	blanc-gris	22
		Positive	112	blanc-gris	98
<i>Escherichia coli</i> O157	Collection	Positive	36	bleu	35
		Positive	103	bleu	89
<i>Escherichia hermanii</i>	Aliments animaux	Positive	56	bleu-gris	44
		Positive	102	bleu-gris	67
<i>Escherichia hermanii</i>	Produit carné	Positive	50	bleu	56
		Positive	143	bleu	124
<i>Escherichia hermanii</i>	Produit laitier	Positive	22	bleu	19
		Positive	89	bleu	78
<i>Escherichia vulneris</i>	Produit carné	Positive	31	bleu	14
		Positive	112	bleu	86
<i>Hafnia alvei</i>	Foie de porc	Positive	90	bleu très clair	90
		Positive	82	bleu-gris	69
<i>Hafnia alvei</i>	Reblochon	Positive	80	blanc	95
		Positive	75	blanc	71
<i>Hafnia alvei</i>	Persil	Positive	75	blanc	90
		Positive	76	bleu-gris	81
<i>Hafnia alvei</i>	Flétan	Positive	84	blanc	75
		Positive	50	bleu-gris	65
<i>Hafnia alvei</i>	Viande hachée	Positive	127	bleu-gris	134
		Positive	119	bleu-gris	124
<i>Hafnia alvei</i>	Lait cru	Positive	109	bleu	90
		Positive	134	bleu	132
<i>Hafnia alvei</i>	Echine de porc	Positive	126	bleu-gris	118
		Positive	97	bleu-gris	94
<i>Hafnia alvei</i>	Rognons de porc	Positive	150	blanc	132
		Positive	101	blanc	99

Souche	Origine	PCA à 30°C		REC2 à 37°C	
		Culture	Nombre de colonies	Couleur des colonies	Nombre de colonies
<i>Hafnia alvei</i>	Persil	Positive	123	bleu-gris	135
		Positive	59	bleu-gris	59
<i>Hafnia alvei</i>	Brochette de poisson	Positive	134	bleu-gris	115
		Positive	128	bleu-gris	109
<i>Hafnia alvei</i>	Concombre	Positive	121	bleu-gris	121
		Positive	107	bleu-gris	100
<i>Hafnia alvei</i>	Tomate	Positive	150	bleu-gris	147
		Positive	89	bleu-gris	82
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Aliments animaux	Positive	40	bleu	54
		Positive	134	bleu	133
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Poisson	Positive	62	bleu	65
		Positive	36	bleu	41
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Poudre de lait	Positive	42	bleu	40
		Positive	36	bleu	42
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Macédoine	Positive	55	bleu	58
		Positive	38	bleu	37
<i>Moellerella wisconsensis</i>	Andouillette	Positive	45	bleu	80
		Positive	46	bleu	56
<i>Proteus mirabilis</i>	Produit carné	Positive	93	gris	72
		Positive	145	gris	132
<i>Proteus mirabilis</i>	Foies de volaille	Positive	115	blanc	93
		Positive	102	blanc	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Filet de rouget	Positive	30	blanc	26
		Positive	87	blanc	77
<i>Salmonella arizonae</i> IIIb 61:-:-	Dinde	Positive	66	violet	72
		Positive	45	violet	32
		Positive	75	violet	63
		Positive	64	violet	46
<i>Salmonella arizonae</i> IIIa 48:24:223	Elevage d'oie	Positive	116	bleu	115
		Positive	76	bleu	79
<i>Salmonella arizonae</i> IIIb 61:i:z53	Cuisse de poulet	Positive	96	violet	90
		Positive	97	violet	90
		Positive	112	violet	96
		Positive	85	violet	84
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Ovoproduit	Positive	121	blanc-gris	103
		Positive	105	blanc-gris	100
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Foie de porc	Positive	83	blanc-gris	70
		Positive	103	blanc-gris	79
<i>Serratia marcescens</i>	Lait cru	Positive	45	bleu	33
		Positive	55	bleu	34
<i>Serratia liquefaciens</i>	Andouillette	Positive	63	bleu	51
		Positive	45	bleu-gris	35
<i>Shigella flexneri</i>	Collection	Positive	25	blanc-gris	22
		Positive	56	blanc-gris	44
<i>Shigella flexneri</i>	Collection	Positive	30	bleu-gris	41
		Positive	35	bleu-gris	40
<i>Shigella sonnei</i>	Collection	Positive	26	violet	30
		Positive	33	violet	27
		Positive	39	violet	33
		Positive	21	violet	19
<i>Yersinia kristensenii</i>	Collection	Positive	27	blanc	16
		Positive	67	blanc	46
<i>Yersinia enteritidis</i>	Ovoproduit	Positive	12	blanc	0
		Positive	34	blanc	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ovoproduit	Positive	28	blanc	20
		Positive	45	blanc	43

TBX à 44°C		
Couleur des colonies	des colonies	Nombre de colonies
bleu		56
bleu		31

TBX à 44°C		
Couleur des colonies	des colonies	Nombre de colonies
bleu		63
bleu		55

TBX à 44°C		
Couleur des colonies	des colonies	Nombre de colonies
bleu		23
bleu		11

* très petites colonies

Souche	Origine	PCA à 30°C		REC2 à 37°C	
		Culture	Nombre de colonies	Couleur des colonies	Nombre de colonies
<i>Escherichia coli</i>	Rognons de porc	Positive	60	violet	45
		Positive	74	violet	71
<i>Escherichia coli</i>	Chou rouge	Positive	47	violet	41
		Positive	70	violet	72
<i>Escherichia coli</i>	Persil	Positive	89	violet	88
		Positive	88	violet	78
<i>Escherichia coli</i>	Pâtisserie	Positive	123	violet	121
		Positive	122	violet	109
<i>Escherichia coli</i>	Crépinette	Positive	56	violet	53
		Positive	106	violet	98
<i>Escherichia coli</i>	Crépinette	Positive	111	violet	114
		Positive	145	violet	137
<i>Escherichia coli</i>	Chair à saucisse	Positive	134	violet	123
		Positive	98	violet	94
<i>Escherichia coli</i>	Tomate	Positive	87	violet	69
		Positive	84	violet	99
<i>Escherichia coli</i>	Céleri rémoulade	Positive	79	violet	78
		Positive	105	violet	111
<i>Escherichia coli</i>	Crème vanille	Positive	65	violet	60
		Positive	126	violet	120
<i>Escherichia coli</i>	Merguez	Positive	143	violet	141
		Positive	96	violet	98
<i>Escherichia coli</i>	Foie de porc	Positive	54	violet	56
		Positive	107	violet	110
<i>Escherichia coli</i>	Lait cru	Positive	67	violet	66
		Positive	122	violet	121
<i>Escherichia coli</i>	Fromage au lait cru	Positive	132	violet	142
		Positive	141	violet	129
<i>Escherichia coli</i>	Moules	Positive	128	violet	108
		Positive	109	violet	100
<i>Escherichia coli</i>	Chair à saucisse	Positive	76	violet	71
		Positive	56	violet	59
<i>Escherichia coli</i>	Carottes râpées	Positive	97	violet	89
		Positive	89	violet	81
<i>Escherichia coli</i>	Pâtisserie	Positive	104	violet	100
		Positive	76	violet	77
<i>Escherichia coli</i>	Chou à la crème	Positive	57	violet	61
		Positive	98	violet	91
<i>Escherichia coli</i>	Crème pâtissière	Positive	113	violet	101
		Positive	73	violet	77
<i>Escherichia coli</i>	Taboulé	Positive	93	violet	91
		Positive	91	violet	84
<i>Escherichia coli</i>	Crème chantilly	Positive	71	violet	67
		Positive	107	violet	100
<i>Escherichia coli</i>	Lardons	Positive	132	violet	129
		Positive	99	violet	94
<i>Escherichia coli</i>	Saumon fumé	Positive	96	violet	91
		Positive	141	violet	136
<i>Escherichia coli</i>	Filet de rouget	Positive	153	violet	152
		Positive	38	violet	30
<i>Escherichia coli</i>	Sandwich	Positive	49	violet	46
		Positive	99	violet	91
<i>Escherichia coli</i>	Pâtisserie	Positive	100	violet	99
		Positive	116	violet	109
<i>Escherichia coli</i>	Foie de porc	Positive	113	violet	111
		Positive	125	violet	123
<i>Escherichia coli</i>	Rognons de porc	Positive	88	violet	85
		Positive	94	violet	93
<i>Escherichia coli</i>	Lait cru	Positive	111	violet	100
		Positive	114	violet	109