

SOCIETE BIOMERIEUX

Service Recherche &
Développement Industrie
Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse
Application à la microbiologie alimentaire

Rapport de synthèse

*(Etudes préliminaire et collaborative
conduites selon la norme NF EN ISO 16140)*

**Validation de la méthode Coli ID pour le
dénombrement des *Escherichia coli* à 37°C**

Méthodes quantitatives

Confidentiel

SYNTHESE Coli ID - E. coli 37°C (Version 2)
4 août 2008

Annule et remplace la version précédente

L'ancienne version doit être restituée
à ADRIA Développement ou détruite en interne.

Ce rapport comprend 34 pages dont 4 annexes.

La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

ADRIA DEVELOPPEMENT

Creac'h Gwen - F. 29196 QUIMPER Cedex - Tél. (33) 02.98.10.18.18 - Fax (33) 02.98.10.18.08

E-mail : adria.developpement@adria.tm.fr - Site web : <http://www.adria.tm.fr> - Site réservé adhérents : <http://www.clubiaa.net>
ASSOCIATION LOI DE 1901 - N° SIRET 306 964 271 00036 - N° EXISTENCE 532900006329 - N°TVA FR4530696427100036

Sommaire

1	INTRODUCTION	4
1.1	Référentiel de validation	4
1.2	Protocole et principe de la méthode alternative	4
1.3	Domaine d'application demandé	4
1.4	Méthode de référence	4
1.5	Historique de la validation	4
2	ETUDE COMPARATIVE	7
2.1	Linéarité	7
2.2	Exactitude relative	9
2.3	Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)	11
2.4	Sensibilité relative	12
2.5	Spécificité/Sélectivité	13
2.6	Praticabilité	14
3	ETUDE COLLABORATIVE	14
3.1	Organisation de l'étude	14
3.2	Contrôle des paramètres expérimentaux	16
3.3	Résultats des analyses	18
3.4	Calculs et interprétation statistique	18
4	CONCLUSION	22
	<i>Annexe 1 - Méthode alternative</i>	<i>23</i>
	<i>Annexe 2 - Méthode de référence : NF ISO 16649-2 (juillet 2001) : méthode horizontale pour le dénombrement des Escherichia coli - -glucuronidase positive</i>	<i>28</i>
	<i>Annexe 3 - Linéarité : graphiques bidimensionnels et droites de régression</i>	<i>29</i>
	<i>Annexe 4 - Exactitude relative : graphiques bidimensionnels et droites de régression pour chacune des matrices et pour l'ensemble des matrices</i>	<i>32</i>

Les modifications apportées au rapport sont indiquées par un double trait dans la marge à gauche.

Avant Propos

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation qui sont identifiés par le symbole[♦].

L'ensemble des renseignements permettant de valider la garantie des analyses est tenu à la disposition de la Société BioMérieux.

Les résultats sont synthétisés au sein de tableaux et interprétés selon la norme NF EN ISO 16140.

- | | |
|---|--|
| ○ Fabricant : | Société BIOMERIEUX
Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE |
| ○ Laboratoire expert : | ADRIA Développement
ZA Creac'h Gwen
29196 QUIMPER Cedex |
| ○ Méthode à valider : | Gélose coli ID pour le dénombrement des <i>Escherichia coli</i> |
| ○ Référentiel de validation : | NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives |
| ○ Méthode de référence[♦] : | Norme NF ISO 16649-2 (juillet 2001) : méthode horizontale pour le dénombrement des <i>Escherichia coli</i> - β -glucuronidase positive |
| ○ Etendue de la validation : | Tous produits d'alimentation humaine |

[♦] NF ISO 16649-2 (juillet 2001) : essai effectué sous le couvert de l'accréditation par le laboratoire expert

1 INTRODUCTION

1.1 Référentiel de validation

Le référentiel de validation utilisé est la norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives.

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

Le protocole et la notice technique sont donnés en Annexe 1.

Le milieu Coli ID est un milieu chromogène permettant le dénombrement des coliformes et d'*E. coli* ; ce milieu contient deux substrats chromogènes. Les coliformes autres qu'*E. coli* apparaissent sous forme de colonies bleues, grâce à la mise en évidence de la β -galactosidase ; les colonies d'*E. coli* apparaissent roses grâce à la mise en évidence de la β -glucuronidase.

La validation est demandée avec une incubation à 37°C de la gélose Coli ID.

1.3 Domaine d'application demandé

Tous produits d'alimentation humaine

1.4 Méthode de référence

La méthode de référence est la méthode NF ISO 16649-2 (juillet 2001) « Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive ».

Le protocole est schématisé en Annexe 2.

1.5 Historique de la validation

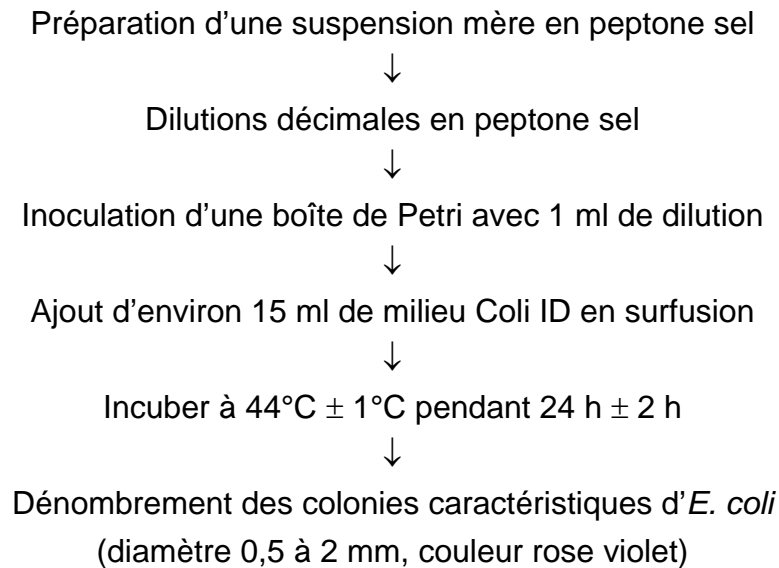
1.5.1 Date de la première validation

La méthode Coli ID a été validée le 19 janvier 1999 (attestation n° BIO 12/5-01/99) avec une incubation à 44°C \pm 1°C pour les abats et à 37°C \pm 1°C pour tous les autres produits. La reconduction a été obtenue le 6 février 2002 avec une incubation à 44°C \pm 1°C pour l'ensemble des produits.

Une extension de validation portant sur la modification du protocole d'ensemencement (de la double couche vers la simple couche) a été obtenue en 2004 sans réalisation d'essais complémentaires.

La validation expire le 19 janvier 2007.

1.5.2 **Protocole validé en 2002**



1.5.3 **Méthodes de référence auxquelles la méthode alternative a été comparée**

- Etude de 1998 : Norme NF V08-017 - Microbiologie alimentaire. Directives générales pour le dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* (incubation au VRBL à $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$)
- Etude de 2002 : Norme NF ISO 16649-2 - Microbiologie alimentaire. Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* - β -glucuronidase positive - Partie 2 : technique du comptage des colonies à 44°C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate (incubation du TBX à $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

1.5.4 Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale et des éventuelles reconductions et extensions

1.4.5.1 Etude menée en 1998

La **méthode Coli ID** est facile à mettre en œuvre, en comparaison à la **méthode de référence NF V08-017** qui nécessite une confirmation d'*E. coli*, rendue aléatoire par le principe même du repiquage au hasard d'un certain nombre de colonies (d'autant plus aléatoire que la charge totale en coliformes thermotolérants est élevée).

Son **délai de réponse** est nettement plus court que celui de la méthode de référence (24 h au lieu de 5 jours).

Cette méthode est **spécifique des souches d'*E. coli* β-glucuronidase positives** ; une seule souche d'*E. coli* sur 20 a donné une réaction négative (pas de coloration rose). En ce qui concerne la sélectivité de la méthode, des faux-positifs peuvent être observés en cas de présence d'*E. vulneris* ou de *Plesiomonas shigelloïdes*.

La méthode Coli ID présente une **linéarité satisfaisante**.

Cette méthode est juste lors de la comparaison de ses résultats à ceux de la méthode de référence NF V08-017. Pour quelques échantillons, la méthode Coli ID a donné un dénombrement supérieur à celui de la méthode de référence ; ces résultats pourraient être expliqués par la différence de sensibilité des deux méthodes, surtout en cas de forte contamination en coliformes thermotolérants.

Cette méthode présente des **caractéristiques de fidélité satisfaisantes** : la répétabilité est comprise entre **0,046 et 0,080 log UFC** ; la reproductibilité est comprise entre **0,13 et 0,57 log UFC**.

1.4.5.2 Etude menée en 2002

La **méthode** de dénombrement de *E. coli* dans les produits alimentaires par la **gélose Coli ID**, incubée à 44°C ± 1°C, a des **performances de praticabilité supérieures** à celles de la méthode de référence.

Les temps de manipulation avec cette méthode sont moins importants que ceux de la méthode de référence.

La **méthode** est **spécifique**. Elle a une **justesse équivalente** à celle de la méthode de référence et une **fidélité comparable** avec celle de la méthode de référence.

La **méthode** est **linéaire**.

La **méthode** est **répétable et reproductible**.

2 ETUDE COMPARATIVE

2.1 Linéarité

2.1.1 Matrices utilisées

Cinq catégories de produits ont été analysées (une matrice par catégorie), à cinq niveaux de contamination et deux répétitions ont été réalisées par échantillon. Au total, 50 analyses ont été effectuées à la fois par la méthode de référence et par la méthode alternative.

Les niveaux de contamination, les matrices testées, ainsi que les souches utilisées sont listés dans le tableau suivant :

Matrice testée	Souche	Taux d'inoculation (UFC/g)
Steak haché	<i>E. coli</i> 13	50 - 100
Lait	<i>E. coli</i> 94	100 - 500
Filet de sandre	<i>E. coli</i> Ad 228	500 - 1 000
Petits pois	<i>E. coli</i> 19	1 000 - 5 000
Coule d'œuf	<i>E. coli</i> 142	5 000 - 10 000

2.1.2 Résultats bruts

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

Les graphiques bidimensionnels sont donnés en Annexe 3.

2.1.3 Interprétation statistique

Matrice	R	Régression utilisée	Rob.F	Valeur critique	P%	Coefficient de corrélation	Droite de régression
Steak haché	1,80	GMFR	0,000	5,41	100	0,999	Log Alt = 0,987 log Ref + 0,006
Lait	0,43	OLS2	2,686	5,41	16	0,988	Log Ref = 0,990 log Alt + 0,025
Filet de sandre	0,80	GMFR	16,953	5,41	0	0,995	Log Alt = 0,914 log Ref + 0,304
Petits pois	2,00	GMFR	0,856	5,41	52	0,996	Log Alt = 0,903 log Ref + 0,342
Coule d'œuf	0,36	OLS2	0,570	5,41	66	0,995	Log Ref = 0,845 log Alt + 0,470

Interprétation statistique :

$P > 5 \%$: pas significatif
 $0,1 \%$ < $P < 1 \%$: très significatif significatif
 $P < 0,1 \%$: hyper

Les droites de régression sont données en Annexe 3.

2.1.4 Conclusion

Les coefficients de corrélation sont tous supérieurs ou égaux à 0,988, valeur très satisfaisante pouvant mettre en défaut la robustesse du test de linéarité.

Les tests de linéarité sont acceptés avec une valeur de $P >$ à 5 % pour les matrices steak haché, lait, petits pois et coule d'œuf.

Bien que montrant un test de linéarité avec une valeur < 5%, la droite obtenue pour la matrice poisson apparaît satisfaisante :

$$\log \text{Alt} = 0,914 \log \text{Ref} + 0,304$$

La linéarité de la méthode Coli ID apparaît satisfaisante.

2.2 Exactitude relative

2.2.1 Nombre et nature des échantillons

Tableau 1 - Nombre et nature des échantillons

Catégories	Types	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats exploités*
Produits carnés	Viandes crues, charcuterie, plats cuisinés	20	11
Produits laitiers	Laits crus, fromages, pâtisseries	11	10
Produits de la mer	Poissons crus, poissons fumés	10	10
Végétaux	Crus, surgelés, plats traiteurs	21	13
Ovoproduits	Coule d'œuf, mayonnaise, crèmes, pâtisseries	26	21
TOTAL		88	65

* Certains résultats n'ont pas pu être exploités car :

- le résultat est inférieur au seuil par l'une et/ou l'autre des méthodes,
- les boîtes sont très chargées et donc illisibles.

2.2.2 Contamination artificielle des échantillons

Tableau 2

N° échantillon	Type de stress	Evaluation « stress » (ΔLog)*	Souche utilisée	Origine
1287, 1288, 1289	Traitement thermique 50°C, 15 min	0,9	<i>E. coli</i> 6	Saucisse de porc
1290, 1291, 1292, 1293	Traitement thermique 50°C, 15 min, 48 h à 4°C	0,3	<i>E. coli</i> 14	Lait cru
1346, 1347, 1348, 1349	- 20°C	2,1	<i>E. coli</i> 19	Carottes râpées
1342, 1343, 1344, 1345	30 ‰ NaCl	0,8	<i>E. coli</i> Ad 228	Poisson
1350, 1351, 1352, 1353	Traitement thermique 50°C, 15 min, 48 h à 4°C	1,4	<i>E. coli</i> 142	Coule d'œuf

* \log milieu TSYEA – \log milieu TBX

16 échantillons ont été artificiellement contaminés sur un total de 65 résultats exploitables.

Le pourcentage de contamination artificielle est de 25 %.

2.2.3 Résultats bruts

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

Tableau 3

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log UFC/g)
Produits carnés	1,00 à 6,08
Produits laitiers	1,36 à 3,99
Produits de la mer	2,60 à 5,71
Végétaux	1,00 à 5,95
Ovoproduits	1,48 à 4,60

2.2.4 Interprétation

Tableau 4

Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P%	
									Ordonnée à 0	Pente à 1
Produits carnés	11	1,08	GMFR	- 0,291	2,106	1,048	1,118	2,262	4	20
Produits laitiers	10	1,46	GMFR	0,090	0,702	0,953	1,048	2,306	50	33
Produits de la mer	10	0,43	OLS2	0,156	1,059	0,988	0,350	2,306	32	74
Végétaux	13	0,88	GMFR	0,049	0,488	0,974	1,154	2,200	64	27
Ovoproduits	21	0,58	GMFR	- 0,317	1,599	1,096	1,164	2,093	13	12
Tous produits	65	0,64	GMFR	- 0,099	1,960	1,096	1,770	1,998	5	43

Tableau 5

Catégorie	Biais D (médiane)	Répétabilité méthode alternative	Répétabilité méthode de référence
Produits carnés	- 0,095	0,382	0,352
Produits laitiers	- 0,018	0,279	0,191
Produits de la mer	- 0,123	0,146	0,337
Végétaux	- 0,055	0,205	0,235
Ovoproduits	0,020	0,205	0,352
Toutes catégories confondues	- 0,040	0,205	0,322

Les graphiques bidimensionnels et les droites de régression sont donnés en Annexe 4.

2.2.5 Conclusion

Les biais entre les deux méthodes sont compris entre - 0,123 et + 0,020 log UFC/g.

Tous produits confondus, la répétabilité de la méthode alternative est de 0,203 et celle de la méthode de référence de 0,322.

Les tests statistiques valident l'hypothèse des pentes = 1 et des ordonnées = 0 pour chaque catégorie testée et toutes catégories confondues, avec des valeurs de $P \geq 5\%$. Seule une valeur P égale à 4% est observée pour l'hypothèse de l'ordonnée = 0 dans la catégorie produits carnés.

L'équation de la droite pour cette dernière catégorie montre cependant des valeurs de coefficients a et b correctes :

$$\log \text{Alt} = 1,048 \log \text{Ref} - 0,291$$

De même, toutes catégories confondues, la droite est la suivante :

$$\log \text{Alt} = 1,096 \log \text{Ref} - 0,099$$

L'exactitude de la méthode alternative apparaît satisfaisante.

2.3 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

2.3.1 Protocole

La limite de détection de la méthode a été réalisée en cultures pures. Trois niveaux d'inoculation ont été testés, à raison de 6 réplicats par niveau, soit 18 analyses par la méthode alternative. Une souche de *E. coli* a été utilisée pour 6 déterminations indépendantes de diluant stérile.

2.3.2 Résultats

Les données sont intrinsèques à la méthode. Les résultats sont donnés dans les tableaux suivants :

Tableau 6

Niveau	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type	Biais
0	0 / 6	/	/
0,5	3 / 6	0,816	0,5
1	6 / 6	1,169	2

Tableau 7

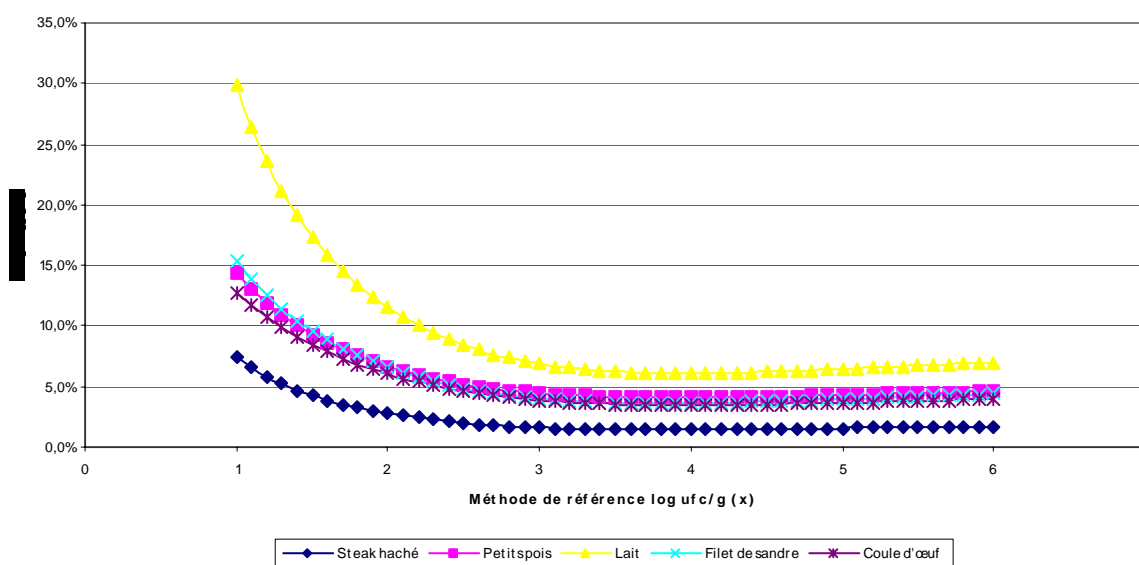
	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 S_0 + X_0$	1,8
LOD	$3,3 S_0 + X_0$	3,2
LOQ	$10 S_0 + X_0$	8,7

2.4 Sensibilité relative

Les données sont intrinsèques à la méthode. Elles sont obtenues à partir des résultats obtenus dans l'étude de linéarité (pas de nouveau protocole spécifique mis en oeuvre)

Les profils de précision obtenus pour les différentes matrices sont présentés figure 1.

Figure 1 - Profils de précision obtenus pour les différentes matrices



2.5 Spécificité/Sélectivité

2.5.1 Protocoles d'essai

L'objectif de cette étude est de vérifier que les souches positives sont bien dénombrées par la méthode alternative et que les souches négatives ne le sont pas.

Au cours de l'étude menée en 1998, 20 souches positives et 23 souches négatives avaient été testées ; les données ont été reprises et complétées avec 10 souches positives. Trois souches négatives ont également été testées.

2.5.2 Résultats

✓ Inclusivité

Sur les 30 souches de *E. coli* testées, 3 donnent des colonies non caractéristiques bleues sur Coli ID.

L'une d'entre elles est une colonie de *E. coli* O157:H7 β glucuronidase négative, qui montre également des colonies non caractéristiques sur gélose TBX.

E. coli 12 et *E. coli* 20 ont été caractérisées sur galerie ID 32E : la souche *E. coli* 20 a donné une réaction négative au test β -glucuronidase, et apparaît également non caractéristique sur gélose TBX de la méthode de référence NF ISO 16649-2.

✓ Exclusivité

Sur les 23 souches testées, seules une souche d'*Escherichia vulneris* (souche *E. vulneris* 51) et une souche de *Plesiomonas shigelloides* ont présenté une coloration rose sur Coli ID. Trois souches supplémentaires d'*E. vulneris* ont été testées : elles ne montrent pas de colonies caractéristiques, ni sur milieu Coli ID , ni sur le milieu TBX de la méthode de référence.

2.6 Praticabilité

La praticabilité du milieu Coli ID a été évaluée selon 13 critères :

- ✓ *Temps réel de manipulation, flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser, leur charge en bactéries* : le gain de temps par la méthode Coli ID est obtenu par le fait qu'une seule boîte est dénombrée par dilution, ainsi que dans la facilité de lecture des tests.

	Temps en minutes			
	Méthode de référence		Méthode Coli ID	
	15 échantillons	25 échantillons	15 échantillons	25 échantillons
Prélèvement	26	40	26	40
Broyage	22,5	37,5	22,5	37,5
Analyse	31	69	25	31
Lecture	25	20	12,5	10
Total	104,5	166,5	86	118,5
Temps / échantillon	7	6,7	5,7	4,7

- ✓ *Délai d'obtention des résultats* : le délai d'obtention des résultats par la méthode Coli ID est identique à celui de la méthode de référence.

	Méthode de référence	Méthode Coli ID
Prélèvement, broyage	J0	J0
Analyse	J0	J0
Lecture	J1	J1

- ✓ *Traçabilité des résultats* : aucune traçabilité particulière n'est proposée. Le laboratoire utilise ses propres procédures.

3 ETUDE COLLABORATIVE

3.1 Organisation de l'étude

3.1.1 Laboratoires collaborateurs

14 laboratoires ont participé à l'étude.

3.1.2 Instructions aux laboratoires collaborateurs

Les instructions détaillées ont été transmises aux laboratoires par le laboratoire expert.

3.1.3 Echantillons

Du lait pasteurisé demi-écrémé a été inoculé par *Escherichia coli* 94.

3.1.4 Inoculation

Les taux d'inoculation visés ont été les suivants :

- 0 UFC/ml,
- 10 – 100 UFC/ml,
- 100 – 1 000 UFC/ml,
- 1 000 - 10 000 UFC/ml.

Les échantillons ont été répartis à raison de 25 ml par flacon. Deux échantillons par taux et par laboratoire ont été préparés, soit huit échantillons par laboratoire.

3.1.5 Etiquetage, expédition

Les échantillons codés (code connu uniquement du laboratoire expert) ont été placés dans des caisses isothermes contenant des blocs réfrigérants et ont été expédiés aux différents laboratoires à l'aide d'un transport express.

Un flacon témoin température contenant un enregistreur de températures a été joint au colis, afin de suivre la température au cours du transport et de la mesurer à réception.

Les échantillons ont été livrés en 24 h à 48 h aux laboratoires collaborateurs. La température des échantillons devait être inférieure ou égale à 8°C pendant le transport et comprise entre 0°C et 8,4°C à l'arrivée.

3.1.6 Analyses

Les laboratoires collaborateurs et le laboratoire expert ont analysé les échantillons par la méthode alternative et par la méthode de référence.

Une étude de stabilité de la souche inoculée dans la matrice a été réalisée afin de vérifier qu'il n'y a pas d'évolution au cours du transport.

3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux

3.2.1 Stabilité de la souche au cours du transport

Afin de vérifier la stabilité de la souche *Escherichia coli* 94, un dénombrement de la flore des six flacons inoculés a été effectué le jour de l'inoculation, ainsi qu'après 24 h (avec simulation de transport) et 48 h de conservation à 4°C ; les résultats sont reportés dans le tableau 8.

Tableau 8 - Dénombrement d'*Escherichia coli* 94 par la méthode NF EN ISO 16649-2 (en UFC/ml)

	Taux 1		Taux 2		Taux 3	
	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2
J0	55	47	450	450	3 500	2 700
J1	36	53	420	350	3 900	4 500
J2	38	47	340	550	5 000	4 400

Aucune évolution de la souche n'est observée au bout de 48 h de conservation à 4°C.

3.2.2 Résultats obtenus pour les deux méthodes

Les résultats de dénombrement des *Escherichia coli* par le laboratoire expert, par la méthode de référence et par la méthode alternative, sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 - Résultats du laboratoire expert (en log UFC/g)

Taux visé (log UFC/g)	Méthode de référence		Méthode alternative	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
1 à 2	1,64	1,68	1,76	1,68
2 à 3	2,54	2,59	2,70	2,69
3 à 4	3,63	3,59	3,83	3,79

Les taux de contamination visés ont été atteints.

3.2.3 Température des échantillons à réception

Les températures mesurées à réception sont données dans le tableau 10.

Tableau 10 - Température des échantillons à réception

Laboratoires	Température mesurée à réception (°C)	Date et heure de réception des échantillons	Température mesurée par le thermobouton
A	7,5	J2 14h00	0,5
B	2,0	J1 11h15	0,0
C	4,0	J1 11h30	<i>Thermobouton non récupéré</i>
D	3,0	J1 08h30	0,0
E	2,5	J2 09h10	0,0
F	0,3	J1 11h20	- 2,5 ¹
G	4,6	J1 10h00	0,00
H	0,2	J1 08h15	0,00
I	0,4	J1 09h30	0,00
J	1,0	J1 11h30	- 1,00 ¹
K	0,6	J1 09h20	0,00
L	0,3	J1 13h15	0,00
M	0,0	J1 11h00	0,00
N	0,3	J1 08h45	0,00

3.2.4 Température des échantillons pendant le transport

Tous les colis ont été livrés à J1 à l'exception de deux laboratoires (A et E) qui ont été livrés à J2. Aucun problème de température n'a été rencontré lors du transport. Toutes les températures à réception étaient inférieures à 8,4°C.

¹ Certaines températures inférieures à 0°C ont été relevées pour ces thermoboutons. Aucune congélation de la matrice n'a été notée par les laboratoires collaborateurs : les résultats ont été conservés dans les interprétations.

3.3 Résultats des analyses

Certains laboratoires n'ont pas inoculé les dilutions 0, -1, -2 et -3 mais uniquement les dilutions -1, -2 et -3, ce qui explique les résultats obtenus pour le niveau 0 (< 1 et < 10 UFC/ml).

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile varie de 2 200 à 480 000 UFC/ml. Le laboratoire B n'a pas pu réaliser ce dénombrement, le flacon s'étant cassé au cours du transport.

3.4 Calculs et interprétation statistique

3.4.1 Synthèse des résultats obtenus par les deux méthodes

Une synthèse des résultats est présentée tableau 11

Tableau 11 - Synthèse des résultats obtenus par la méthode alternative et la méthode de référence (en UFC)

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	35	40	30	50	390	510	520	500	3200	3800	4600	6600
B	<1	<1	<1	<1	43	42	55	55	620	550	590	450	5500	4900	7200	6000
C	<10	<10	<10	<10	65	55	40	40	380	400	340	460	5300	4400	4500	4800
D	<10	<10	<10	<10	30	50	50	90	440	360	510	500	3000	3600	4800	3600
E	<1	<1	<1	<1	44	45	49	31	480	380	550	520	4800	4400	6700	5600
F	<1	<1	<1	<1	25	41	54	50	490	600	640	620	5200	7000	4800	4900
G	<10	<10	<10	<10	35	45	40	80	360	330	280	430	3500	3500	3800	4700
H	<1	<1	<1	<1	25	43	24	26	360	400	390	280	4000	5000	4400	4200
I	<1	<1	<1	<1	40	39	45	55	420	510	570	470	4000	4900	5400	6700
J	<1	<1	<1	<1	39	34	42	49	440	400	440	550	6100	5000	4800	5700
K	<10	<10	<10	<10	35	45	40	40	590	420	600	460	4600	5000	7000	5900
L	<10	<10	<10	<10	35	50	50	50	430	480	350	560	4800	6500	5400	5500
M	<1	<1	<1	<1	39	43	45	44	430	480	450	410	4800	6500	6100	3700
N	<1	<1	<1	<1	24	20	47	46	450	360	540	540	3600	3700	6000	6300

3.4.2 Calcul du biais

Pour chaque niveau, la différence des moyennes des réplicats (d_i) obtenues par la méthode alternative et la méthode de référence est calculée : $d_i = (M_{i,alt} - M_{i,réf})$.

La médiane ($MED\{d_i\}$) des d_i permet de déterminer le biais D ($MED\{d_i\} = \text{biais D}$).

Le biais D et l'écart-type robuste $S\{d_i\} = K1Sn$ donnent une statistique de t ($t(d) = MED\{d_i\} \sqrt{n}/S\{d_i\}$). Cette valeur de t obtenue est comparée à une valeur critique trouvée dans la table de Student (pour $n = 14$, $t_{critique} = 2,179$).

Les valeurs de $t(d)$ obtenues par niveau sont reportées dans le tableau 12.

Tableau 12 - Valeurs de $t(d)$ obtenues par niveau

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Biais D	t critique ddl (n-1)	Conclusion
1	n = 14	0,086	2,160	Biais non significatif
2	n = 14	0,036	2,160	Biais non significatif
3	n = 14	0,092	2,160	Biais non significatif

Niveau critique : $t(d) < t_{critique}$

Le biais entre les deux méthodes apparaît non significatif ; il est compris entre + 0,036 et + 0,092 log UFC/g.

Le biais entre les deux méthodes déterminé au cours de l'étude préliminaire est égal à - 0,040 log UFC/g, toutes catégories confondues.

3.4.3 Calcul de la répétabilité

Les valeurs obtenues pour la limite de répétabilité, ainsi que les valeurs obtenues pour le test F sont données dans le tableau 13.

**Tableau 13 - Valeurs obtenues pour la limite de répétabilité
et valeurs pour le Test F**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de répétabilité		F calculé (ou 1/F*)	F critique (0,05 ; n ; n)	P %
		Méthode de référence	Méthode alternative			
1	n = 14	0,223	0,100	4,952*	2,48	0
2	n = 14	0,200	0,265	1,756	2,48	15
3	n = 14	0,235	0,224	1,100*	2,48	43

Interprétation statistique : P > 5% : non significatif 1 % < P < 5 % : significatif
0,1 % < P < 1 % : très significatif P < 0,1 % : hyper significatif

La limite de répétabilité de la méthode alternative déterminée au cours de l'étude préliminaire est égal à 0,205 log UFC/g pour toutes catégories confondues, celle de la méthode de référence à 0,323 log UFC/g.

Les limites de répétabilité de la méthode alternative montrent des valeurs comparables à celles de la méthode de référence, à l'exception de la limite de répétabilité observée pour le niveau 1. La limite de répétabilité de la méthode alternative est alors meilleure que celle de la méthode de référence.

3.4.4 Reproductibilité

Les valeurs obtenues pour la limite de reproductibilité, ainsi que les valeurs obtenues pour le test F sont données dans le tableau 14.

**Tableau 14 - Valeurs obtenues pour la limite de reproductibilité
et valeurs pour le Test F**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de reproductibilité		F calculé (ou 1/F*)	F critique (0,05 ; n - 1 ; n - 1)	P %
		Méthode de référence	Méthode alternative			
1	n = 14	0,216 ⁽²⁾ 0,223	0,310	2,900	2,58	4
2	n = 14	0,240	0,231 ⁽²⁾ 0,265	1,114*	2,58	34
3	n = 14	0,338	0,279	1,466*	2,58	25

Interprétation statistique : P > 5% : non significatif 1 % < P < 5 % : significatif
0,1 % < P < 1 % : très significatif P < 0,1 % : hyper significatif

⁽²⁾ Valeurs calculées < limite de répétabilité, donc la valeur de la limite de répétabilité est retenue.

Les limites de reproductibilité de la méthode alternative montrent des valeurs comparables à celles de la méthode de référence, à l'exception du niveau 1. La limite de reproductibilité est alors supérieure à celle de la méthode de référence.

3.4.5 *Rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité*

Les rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité sont donnés dans le tableau 15.

Tableau 15 - Rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de reproductibilité / limite de répétabilité	
		Méthode de référence	Méthode alternative
1	n = 14	1,000	3,101
2	n = 14	1,198	1,000
3	n = 14	1,44	1,247

Niveau critique : reproductibilité / répétabilité : < 2

Les rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité sont tous inférieurs à 2, excepté pour la méthode alternative au niveau 1.

3.4.6 *Dispersion entre les laboratoires*

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Méthode de référence F (ou 1/F*)	Méthode alternative F (ou 1/F*)	F critique (0,05 ; n - 1 ; n)
1	n = 14	1,129	18,232	2,55
2	n = 14	1,869	1,924	2,55
3	n = 14	3,145	2,110	2,55

Niveau critique : F ou 1/F < F (critique)

La dispersion des résultats entre laboratoires est d'ordre similaire entre les deux méthodes, excepté pour le niveau 1, pour lequel une valeur élevée est obtenue pour la méthode alternative.

4 CONCLUSION

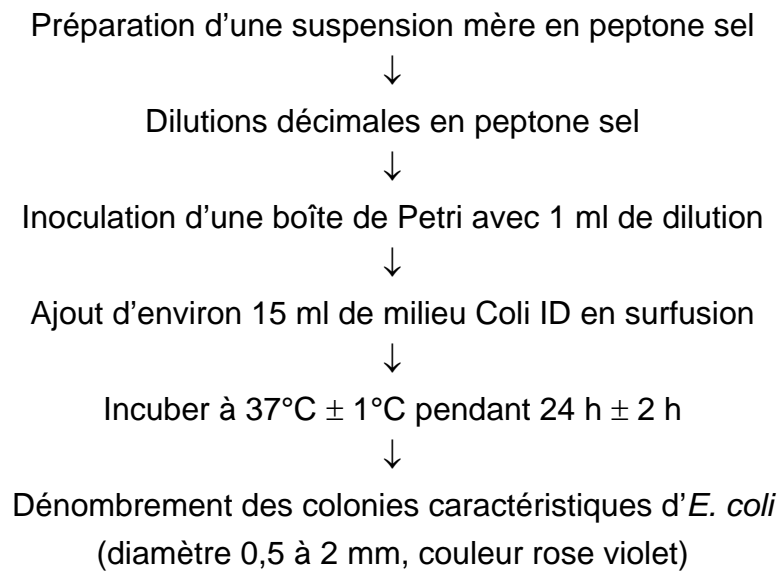
Les **conclusions de l'étude préliminaire** sont les suivantes :

- ✓ La linéarité et l'exactitude de la méthode COLI ID pour le dénombrement des *E. coli* à 37°C sont satisfaisantes.
- ✓ Tous produits confondus, la limite de répétabilité de la méthode alternative est de 0,203 et celle de la méthode de référence de 0,322.
- ✓ Le biais entre les deux méthodes est faible, compris entre - 0,123 et + 0,20 log UFC/ g.
- ✓ La méthode COLI ID est spécifique et sélective.

Les **conclusions de l'étude interlaboratoire** sont les suivantes :

- ✓ Le biais entre les deux méthodes est très faible (0,036 à 0,092 log UFC/g).
- ✓ Les limites de répétabilité et de reproductibilité de la méthode alternative sont généralement comparables à celles de la méthode de référence.
- ✓ La dispersion entre laboratoires est généralement similaire entre les deux méthodes, à l'exception du niveau 1 où une valeur plus élevée est obtenue pour la méthode alternative.

Annexe 1 - Méthode alternative



REF 42 017

08142 H - fr - 2007/02

Gélose Coli ID (COLI ID-F)*Pour contrôle microbiologique exclusivement*Milieu chromogène sélectif pour la détection et le dénombrement d' *E. coli* β D-glucuronidase positive et des autres coliformes à partir d'échantillons alimentaires.**INTRODUCTION ET OBJET DU TEST**

La gélose Coli ID est un milieu chromogène sélectif pour la détection et le dénombrement d' *E. coli* β D-glucuronidase positive et des autres coliformes à partir d'échantillons alimentaires.

Le milieu Coli ID est validé AFNOR :

- pour une incubation à 44°C par rapport à la méthode normalisée NF ISO 16649-2 (3) pour le dénombrement d' *E. coli* β D-glucuronidase positive.
- pour une incubation à 37°C d'une part par rapport à la méthode normalisée NF ISO 4832 pour le dénombrement des coliformes par comptage des colonies (2) et d'autre part par rapport à la méthode normalisée NF ISO 16649-2 (3) pour le dénombrement d' *E. coli* β D-glucuronidase positive.

La validation a été conduite selon la norme ISO 16140.

PRINCIPE

Le milieu Coli ID contient deux substrats chromogènes : l'un pour la mise en évidence de la β D-glucuronidase colorant les colonies d' *E. coli* en rose et l'autre pour la mise en évidence de la β -galactosidase colorant les colonies des autres coliformes en bleu. La combinaison de ces deux substrats optimise la détection d' *E. coli* et des autres coliformes. La plupart des bactéries Gram positif est inhibée.

	<i>E. coli</i> β D-glucuronidase positive	Autres coliformes	Autres Gram négatifs
Couleur	Rose/violet	Bleu/gris	Incolore
Taille (mm)	0,5 à 2,0	0,5 à 2,0	0,1 à 1,0

PRESENTATION

	Milieu prêt à l'emploi
REF 42 017	Coffret de 6 flacons de 200 ml + 1 notice

COMPOSITION

Formule théorique .

Ce milieu peut être ajusté et/ou supplémenté en fonction des critères de performances imposés:

Peptone de gélatine (bovin ou porcine)	7 g
Extrait de levure.....	3 g
Chlorure de sodium.....	5g
Sels biliaires (bovin ou ovin).....	1,5 g
Mélange des activateurs	0,3 g
Mélange chromogène	0,3 g
Agar.....	15 g
Eau purifiée	1 l

pH 7,2

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS**Réactifs :**

- Bouillon Tryptone sel (Réf. 42 076 ou 42 021).

Matériel :

- Boîtes de Petri stériles.
- Etuve bactériologique.
- Bains-marie.

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour contrôle microbiologique exclusivement.
 - Pour usage professionnel uniquement
 - Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler).
 - Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation; se référer à "CLSI/NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Révision en vigueur*". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH - Dernière édition ", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
 - Les milieux de culture ne doivent pas être utilisés comme matériau ou composant de fabrication.
 - Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
 - Ne pas utiliser des flacons présentant une suspicion de contamination.
 - Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité des ergots d'invulnérabilité de la capsule des flacons.
 - Un flacon de gélose ne peut subir que deux régénérations.
 - Le milieu doit être utilisé selon le mode opératoire indiqué dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut modifier les résultats.
- CONDITIONS DE STOCKAGE**
- Les flacons se conservent entre 2°C et 8°C dans leur coffret jusqu'à la date de péremption.
 - Conserver à l'abri de la lumière.

ECHANTILLONS

Suivre les recommandations des normes en vigueur pour la réalisation des prélèvements et la préparation des échantillons.

MODE OPERATOIRE**Préparation de la gélose:**

1. Desserrer au préalable la capsule du flacon de gélose.
2. Mettre le flacon à régénérer dans un bain marie sécurisé à environ 50°C, monter la température jusqu'à 95°C et laisser fondre la gélose (environ 45 minutes).
3. Homogénéiser après fermeture de la capsule (utiliser des gants de protection contre les risques thermiques).
4. Laisser les flacons à température ambiante au moins 15 secondes avant de les transférer dans un bain d'eau thermostaté à 47 ± 2°C. Maintenir les flacons à cette température jusqu'au moment de l'utilisation, sans excéder 6 heures.

Préparation de la suspension mère :

A effectuer conformément à la norme décrite pour l'analyse du produit concerné.

Protocoles :

1. Dénombrement d' *E.coli* β D-glucuronidase positive à 44°C : Protocole validé AFNOR (BIO 12/5 - 01/99) (Reconduction obtenue en décembre 2006 – validité janvier 2011)

Le milieu Coli ID est validé AFNOR par rapport à la norme NF ISO 16649-2 (3) pour le dénombrement des *E. coli* β D-glucuronidase positive dans tous les produits d'alimentation humaine, selon le protocole suivant :

1. Dans une boîte de Petri stérile, placer 1 ml de la suspension mère (réalisée par exemple en bouillon tryptone sel) ou des dilutions décimales, à raison d'une boîte par dilution.
2. Ajouter environ 15 ml de milieu Coli ID maintenu en surfusion (47°C environ) et homogénéiser soigneusement avant de laisser refroidir sur une surface plane jusqu'à solidification de la gélose.
3. Incuber les boîtes (couvercle en bas) à 44°C \pm 1 °C pendant 24 \pm 2 heures.

Note : Si on suspecte une forte contamination de la matrice par des micro-organismes susceptibles d'envahir la gélose en surface à 44°C, il peut être nécessaire, pour faciliter la lecture, de couler une double couche de milieu Coli ID (environ 5 ml) maintenu en surfusion.

Lecture et interprétation :

E. coli β D-glucuronidase positive donne en 24 heures des colonies de 0,5 à 2 mm de diamètre de coloration rose à violet.

Retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques (il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies) et se reporter à la formule générale de calcul. Dans le cas où la plus faible dilution testée contient un nombre inférieur à 15 colonies caractéristiques, utiliser l'estimation pour les petits nombres.

2. Dénombrement simultané d' *E.coli* β D-glucuronidase positive et des autres coliformes à 37°C, par ensemencement en profondeur : Protocole validé AFNOR.

- pour *E.coli* : BIO 12/19 – 12/06 (Validité décembre 2010) et
 - pour les coliformes : BIO 12/20 – 12/06 (Validité décembre 2010).
1. Dans les boîtes de Petri stériles, placer 1 ml du produit et/ou les différentes dilutions (réalisées par exemple en Tryptone sel). N'utiliser qu'une boîte par dilution.
 2. Couler environ 15 ml du milieu Coli ID maintenu en surfusion.
 3. Agiter pour bien mélanger et laisser refroidir sur une surface fraîche et horizontale. Laisser le milieu se solidifier.
 4. Pour faciliter la lecture en évitant un envahissement en surface de certains micro-organismes, possible après une incubation à 37°C, il est recommandé de couler une deuxième couche de milieu Coli ID (environ 5 ml) maintenu en surfusion. Laisser refroidir jusqu'à solidification.
 5. Incuber les boîtes (couvercle en bas) à 37°C \pm 1°C pendant 24 \pm 2 heures.

Lecture et interprétation :

E. coli β D-glucuronidase positive donne des colonies de 0,5 à 2 mm de diamètre de coloration rose à violette. Les autres coliformes donnent des colonies de 0,5 à 2 mm de diamètre de coloration bleue à bleu-gris.

Le nombre de coliformes totaux correspond à la somme des colonies roses à violettes et des colonies bleues à gris-bleu.

Mode de calcul :

Retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques (il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies caractéristiques) et se reporter à la formule générale de calcul. Dans le cas où la plus faible dilution testée contient un nombre inférieur à 15 colonies caractéristiques, utiliser l'estimation pour les petits nombres.

3. Dénombrement d' *E.coli* β D-glucuronidase positive par ensemencement en surface : protocole non validé AFNOR.

Après avoir coulé la gélose en boîte de Petri (90 mm ou 55 mm), l'ensemencement peut être effectué soit en déposant la membrane utilisée pour la filtration, soit en étalant 0,1 ml du liquide à tester ou de ses dilutions à la surface du milieu.

Incuber les boîtes (couvercle en bas) à 37°C \pm 1°C pendant 24 \pm 2 heures.

Lecture et interprétation:

E. coli β D-glucuronidase positive donne des colonies de 0,5 à 2 mm de diamètre de coloration rose à violette.

CONTROLE DE QUALITE

La gélose Coli ID est conçue et développée afin de répondre aux exigences de qualité les plus strictes.

Les résultats des souches testées lors du contrôle de qualité lot par lot figurent sur le certificat de contrôle qualité disponible sur demande.

LIMITES DU TEST

- Coli ID a été évalué sur les principales matrices alimentaires et sur un grand nombre de souches bactériennes. Compte tenu de la diversité des produits alimentaires, des procédés de fabrication et de la flore microbienne, il peut être nécessaire de vérifier que Coli ID est bien adapté à la spécificité de vos produits.
- Une inhibition de la β -galactosidase des coliformes, se traduisant par une absence de coloration bleue des colonies, est exceptionnellement observée. Cette inhibition a été constatée pour certains fromages principalement avec la suspension mère.
- Le sérotype *E. coli* O157 H7, ne possédant pas de β D-glucuronidase, apparaît sous forme de colonies bleues à gris-bleu.
- Certaines souches, autres que *E. coli* possèdent une β D-glucuronidase et sont susceptibles de donner des colonies roses. Par exemple : certaines souches de *Pleisiomonas shigelloïdes*, d'*Enterobacter* et d'*Escherichia vulneris*
- Le développement est fonction des exigences propres à chaque micro-organisme. Il est donc possible que certaines souches ayant des exigences spécifiques (substrat, température, ...) ne se développent pas.

Le paramètre Gélose Coli ID est validé selon la norme EN ISO 16140 (4) en tant que méthode alternative d'analyse pour tous produits alimentaires et échantillons d'environnement. Cette validation délivrée par AFAQ AFNOR Certification, a été obtenue par rapport aux méthodes de référence décrites dans les normes NF ISO 16649-2(3) et NF ISO 4832(2).

L'attestation BIO- 12/5 - 01/99 est valide jusqu'au 19 janvier 2011.

L'attestation BIO- 12/19 - 12/06 est valide jusqu'au 15 décembre 2010.

L'attestation BIO- 12/20 - 12/06 est valide jusqu'au 15 décembre 2010.

Ces attestations peuvent être obtenues auprès de notre service Assistance Technique.



BIO 12/5 - 01/99
BIO 12/19 - 12/06
BIO 12/20 - 12/06

METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFAQ AFNOR Certification
www.afnor.org

TABLE DES SYMBOLES

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limites de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Conserver à l'abri de la lumière

ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer les réactifs utilisés et non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MIONI R, GRIMALDI M, BORDIN P. et al. - Comparison between selective media for *Escherichia coli* and coliforms simultaneous determination in food of animal origin - istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Italie - *Rev. Industrie Alimentari*- Sept. 97 p. 1014 à 1020
2. Norme NF ISO 4832 - Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes - Méthode par comptage des colonies - Juillet 2006.
3. Norme NF ISO 16649-2 - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β D-glucuronidase positive. Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44°C au moyen de 5-bromo-4 chloro - 3 indolyl β D glucuronate. Juillet 2001. ISSN 0335-3931.
4. Norme NF EN ISO 16140 - Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives. Octobre 2003.



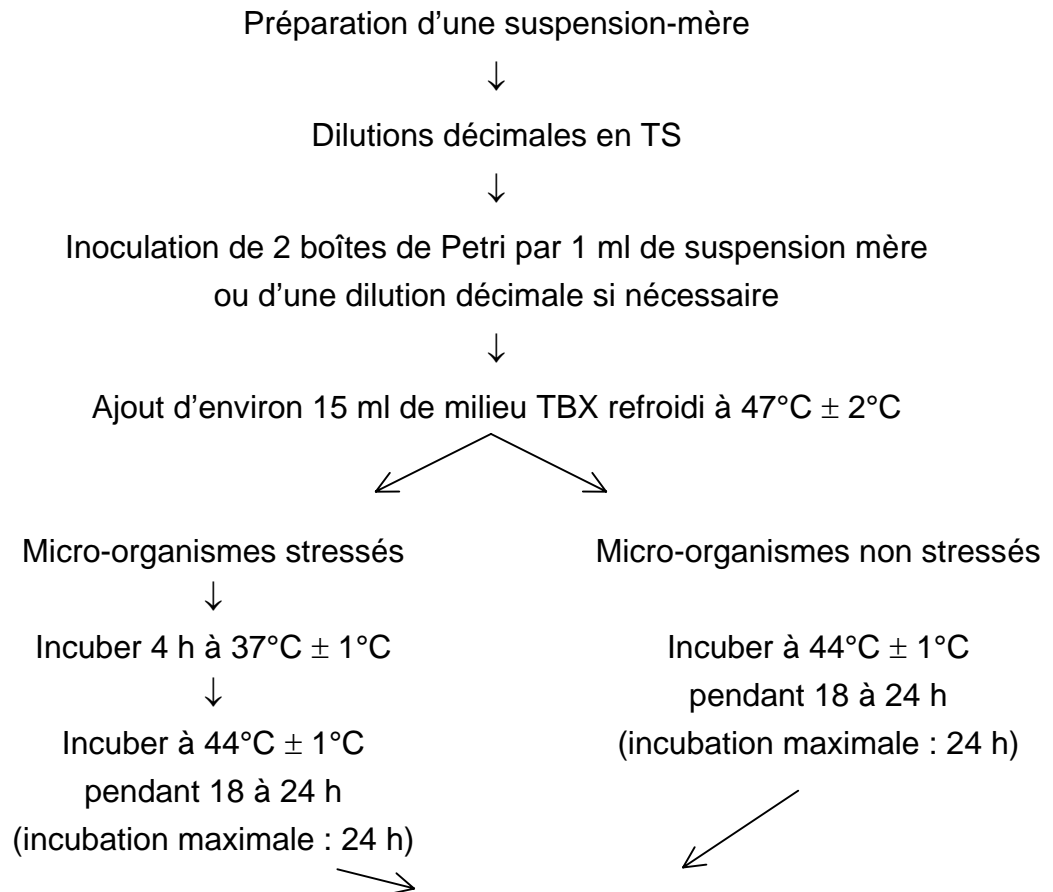
bioMérieux® SA
au capital de 12 029 370 €
673 620 399 RCS LYON

69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

Imprimé en France

bioMérieux et le logo bleu sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

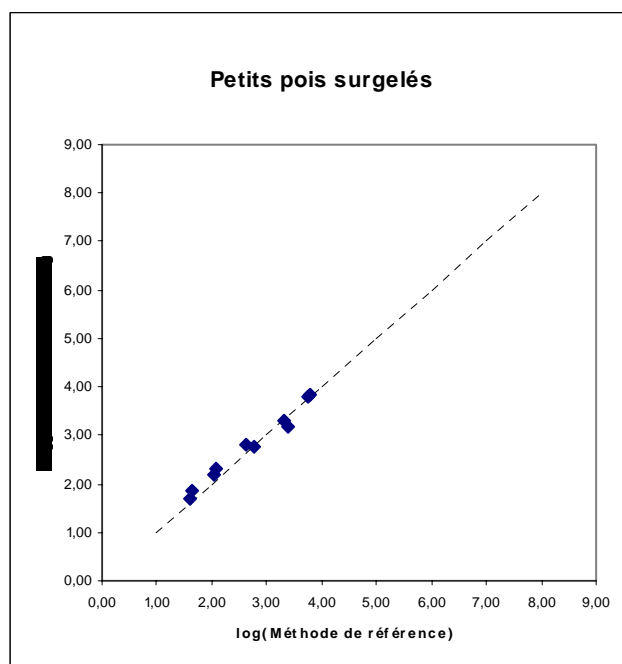
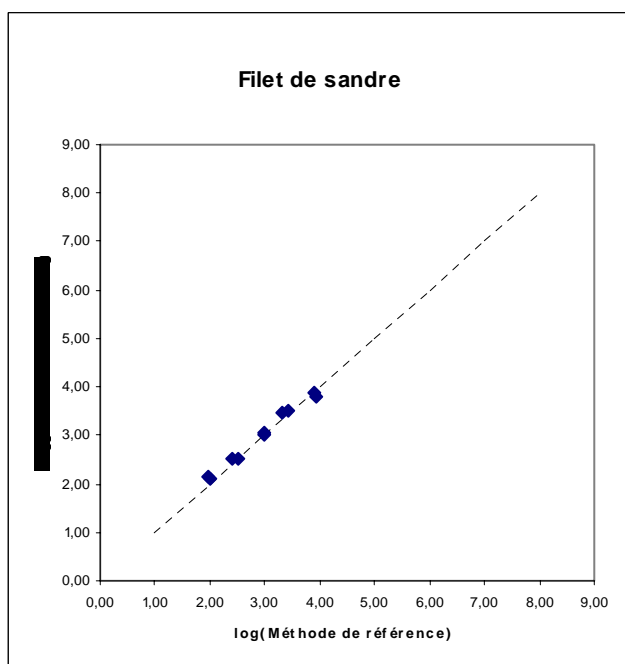
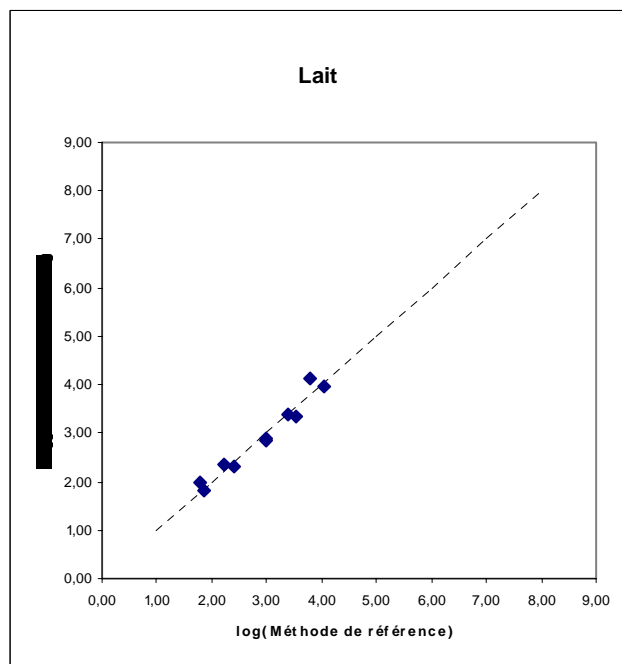
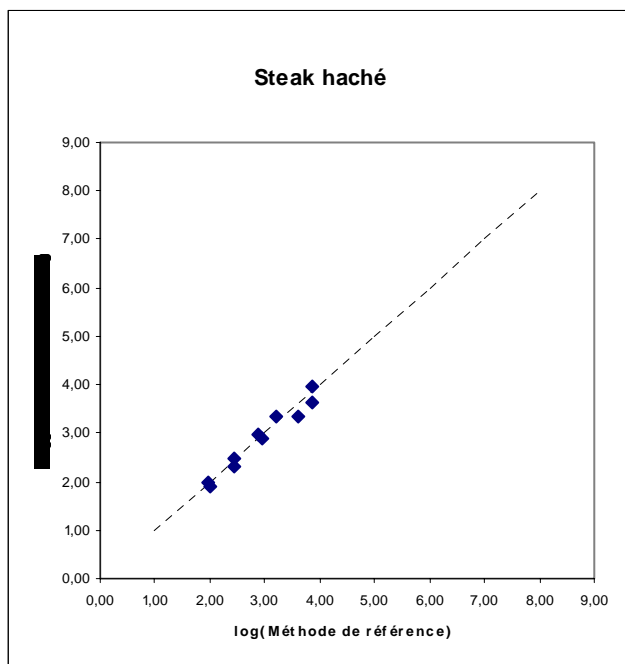
**Annexe 2 - Méthode de référence : NF ISO 16649-2 (juillet 2001) :
méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* -
 β -glucuronidase positive**



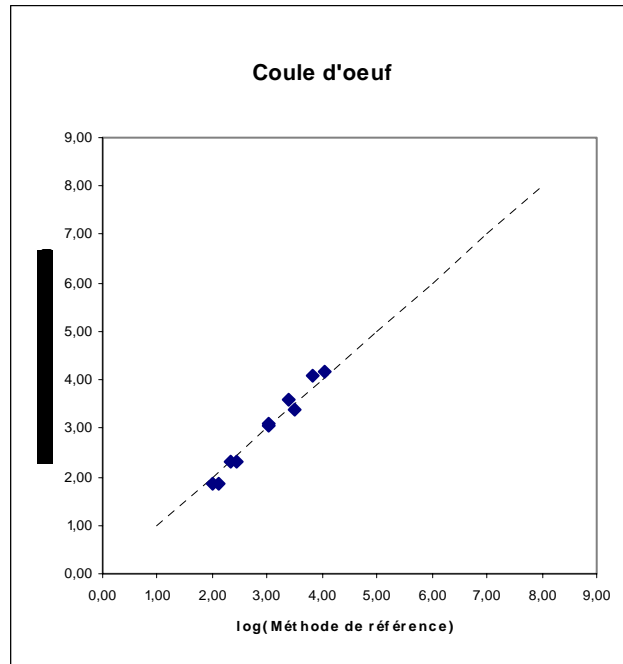
Retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques (bleues)
et moins de 300 colonies au total. Dénombrer les colonies bleues

Annexe 3 - Linéarité : graphiques bidimensionnels et droites de régression

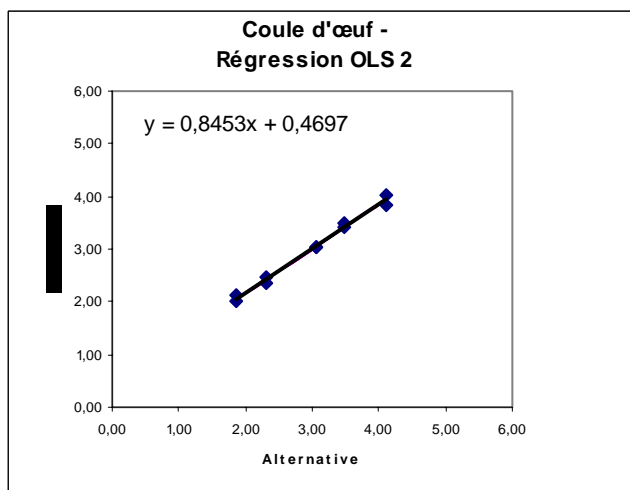
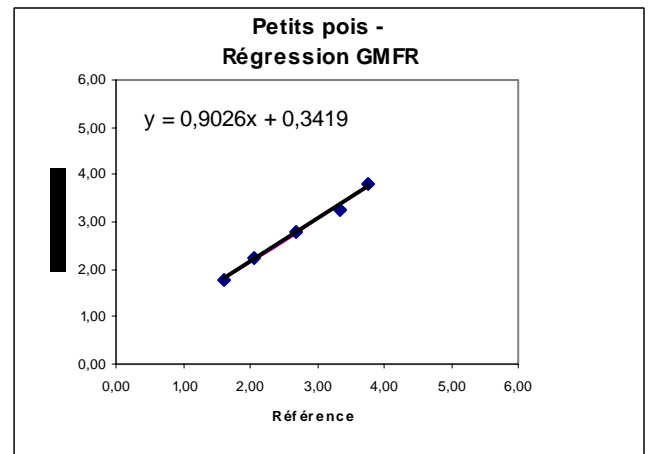
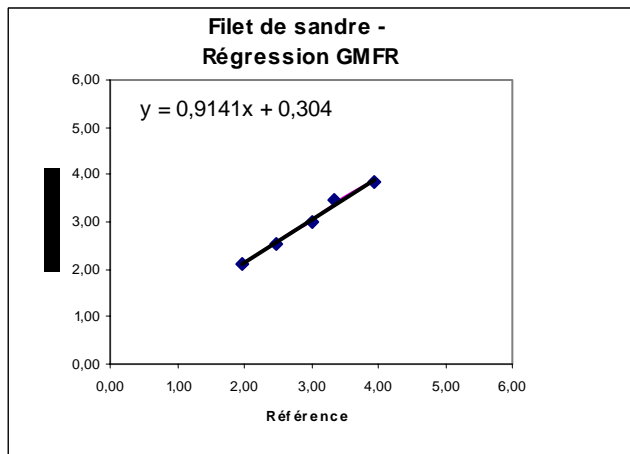
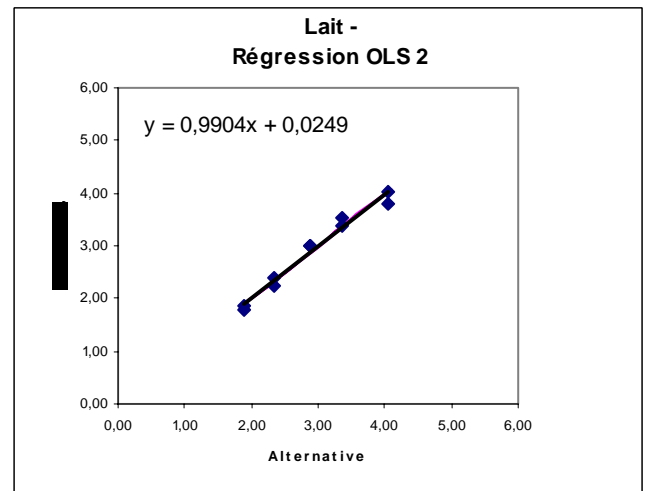
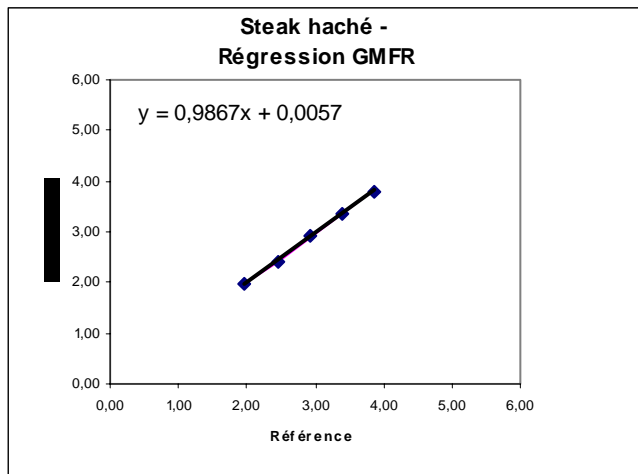
Graphiques bidimensionnels



Graphiques bidimensionnels

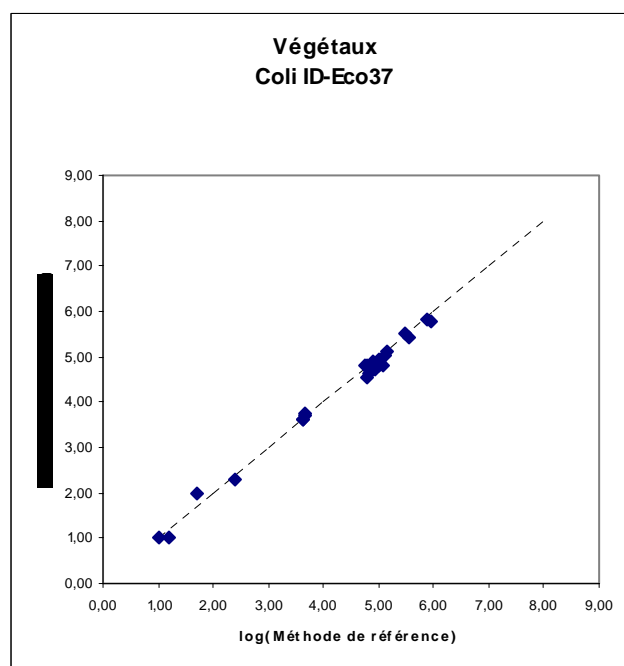
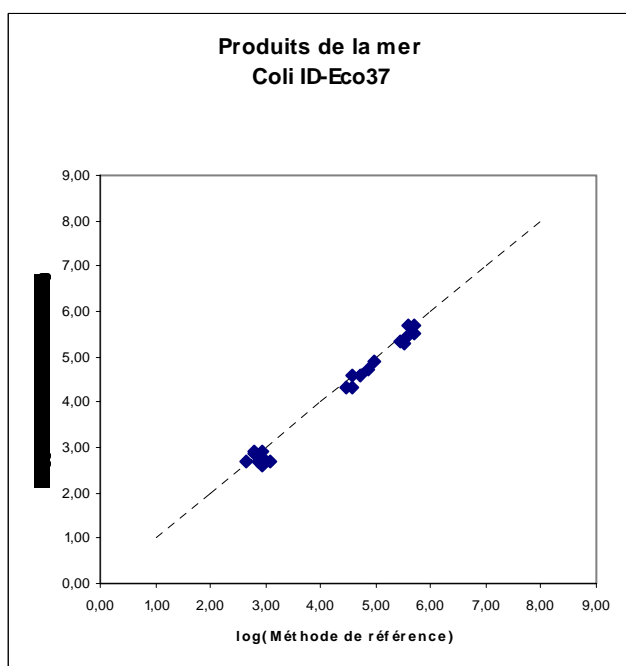
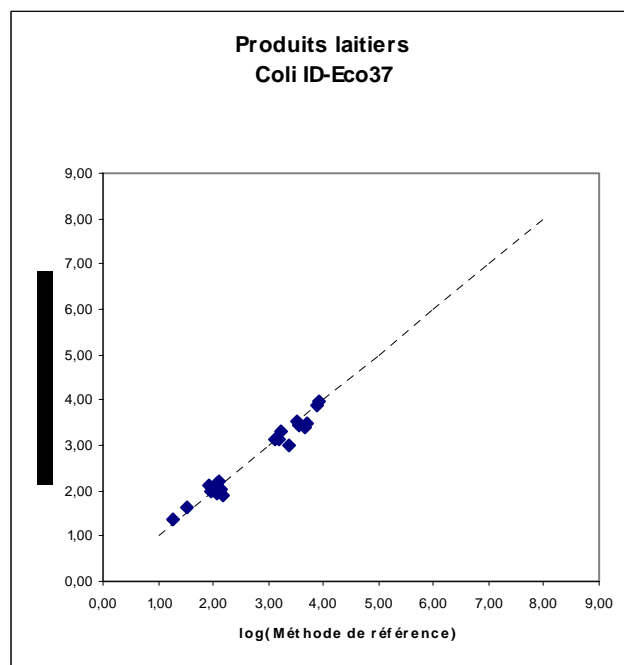
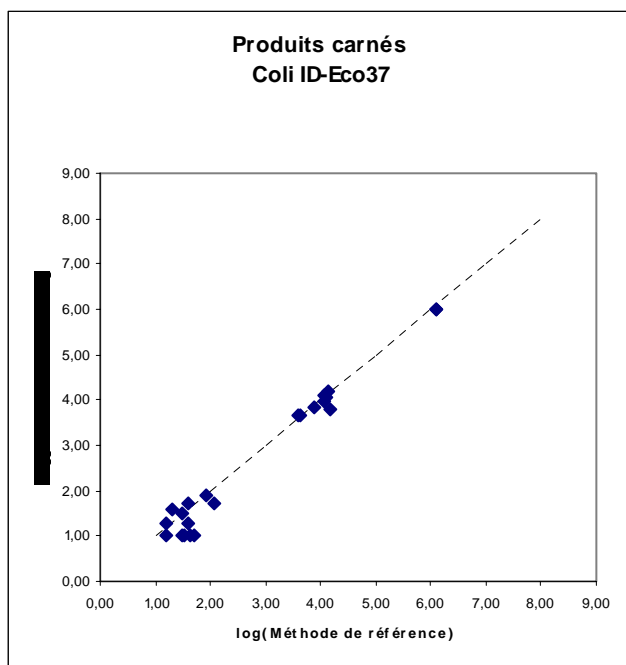


Droites de régression

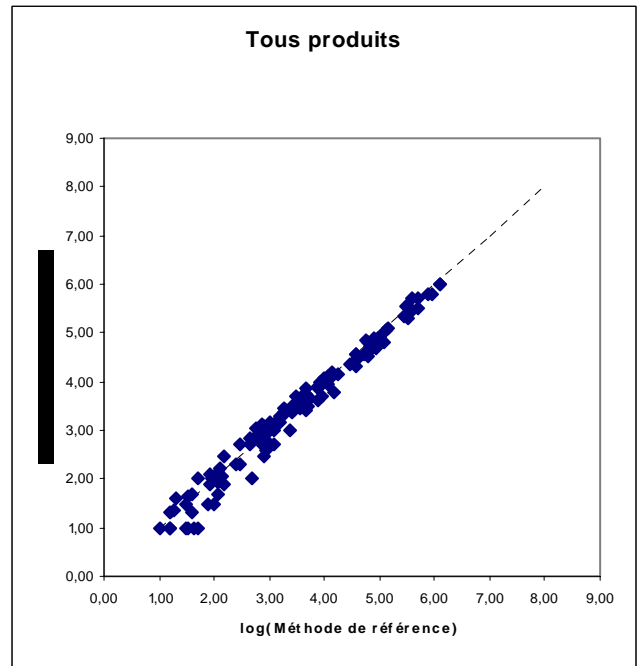
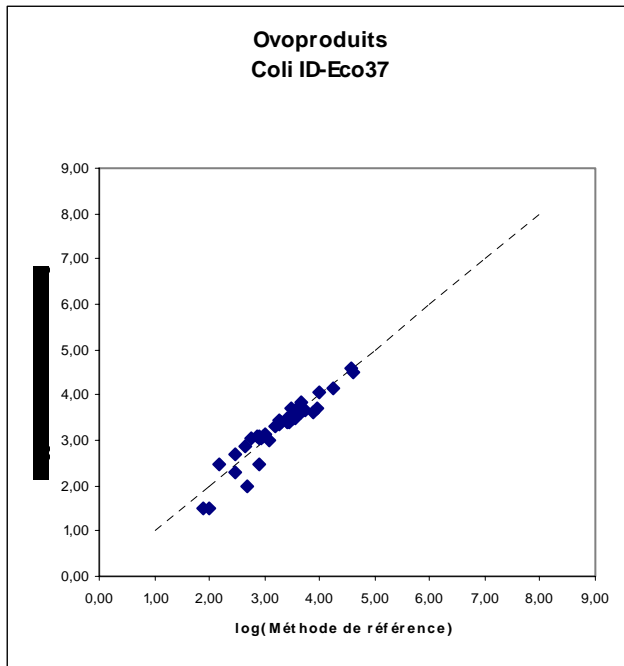


Annexe 4 - Exactitude relative : graphiques bidimensionnels et droites de régression pour chacune des matrices et pour l'ensemble des matrices

Graphique bidimensionnel



Graphique bidimensionnel



Droites de régression

