



accréditation Cofrac
n°1 - 0144
portée disponible
sur www.cofrac.fr

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 coliformes totaux

Méthodes quantitatives

Confidentiel

SYNTHESE Coli ID - Coliformes totaux (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 30 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
2	ETUDE COMPARATIVE _____	5
	2.1 Linéarité _____	5
	2.2 Exactitude relative _____	6
	2.3 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ) _____	8
	2.4 Sensibilité relative _____	9
	2.5 Spécificité/Sélectivité _____	10
	2.6 Praticabilité _____	10
3	ETUDE COLLABORATIVE _____	11
	3.1 Organisation de l'étude _____	11
	3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux _____	12
	3.3 Résultats des analyses _____	14
	3.4 Calculs et interprétation statistique _____	15
4	CONCLUSION _____	19
	<i>Annexe 1 - Méthode alternative</i> _____	<i>20</i>
	<i>Annexe 2 - Méthode de référence</i> _____	<i>24</i>
	<i>Annexe 3 - Linéarité : Graphiques bidimensionnels et droites de régression</i> _____	<i>25</i>
	<i>Annexe 4 - Exactitude relative : Graphiques bidimensionnels et droites de régression</i> _____	<i>28</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 coliformes totaux |
| ○ Référentiel de validation : | NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives |
| ○ Méthode de référence[♦] : | NF ISO 4832 : méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes - méthode par comptage des colonies |
| ○ Etendue de la validation : | Tous produits d'alimentation humaine |

[♦] NF ISO 4832 : 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 de couleur bleue à bleu-gris, grâce à la mise en évidence de la β -galactosidase ; les colonies d'*E. coli* apparaissent roses à violet grâce à la mise en évidence de la β -glucuronidase.

1.3 Domaine d'application demandé

Tous produits d'alimentation humaine

1.4 Méthode de référence

La méthode de référence est la norme NF ISO 4832 (juillet 2006) : méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes - méthode par comptage des colonies.

Le protocole est schématisé en Annexe 2.

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

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>Enterobacter cloacae</i> 128	50 - 100
Lait	<i>Citrobacter diversus</i> 140	100 - 500
Filet de sandre	<i>Escherichia coli</i> Ad 228	500 - 1 000
Petits pois	<i>Enterobacter agglomerans</i> 62	1 000 - 5 000
Coule d'œuf	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 114	5 000 - 10 000

2.1.2 Résultats bruts

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	2,00	GMFR	51,269	5,41	0	0,991	Log Alt = 1,061 log Ref - 0,280
Lait	0,70	GMFR	11,892	5,41	1	0,993	Log Alt = 1,011 log Ref - 0,055
Filet de sandre	0,36	OLS2	4,015	5,41	8	0,990	Log Ref = 1,207 log Alt - 0,616
Petits pois	1,00	GMFR	6,056	5,41	4	0,994	Log Alt = 0,823 log Ref + 0,409
Coule d'œuf	0,60	GMFR	14,510	5,41	1	0,998	Log Alt = 1,020 log Ref - 0,092

Interprétation statistique :

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

Les droites de régression sont données en Annexe 3.

2.1.4 Conclusion

Pour toutes les matrices testées :

- les coefficients de corrélation sont tous supérieurs à 0,99, valeurs élevées pouvant mettre en défaut la robustesse des tests de linéarité ;
- la répartition des points sur l'axe bidimensionnel montre la corrélation entre les résultats de la méthode de référence et la méthode alternative.

La linéarité de la méthode Coli ID est satisfaisante.

2.2 Exactitude relative

2.2.1 Nombre et nature des échantillons

Les nombres et la diversité des échantillons analysés par catégorie sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau 1 - Nombre et nature des échantillons

Catégories	Types	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats exploités*
Produits carnés	Viandes crues, charcuterie, plats traiteurs	23	14
Produits laitiers	Laits crus, fromages, crèmes, poudres de lait, lait, glaces	20	13
Produits de la mer	Poissons crus, surgelés, plats traiteurs	26	24
Végétaux et divers	Surgelés, 4e gamme, plats traiteurs	22	12
Ovoproduits	Coules d'œuf, pâtisseries	11	10
Total		102	73

* Des échantillons n'ont pu être exploités car :

- les boîtes étaient trop chargées en coliformes et/ou en flore annexe pour être dénombrées,
- le dénombrement était inférieur au seuil par l'une et/ou l'autre des méthodes.

Des milieux VRBL provenant de deux fournisseurs différents ont été utilisés au cours de cette étude pour la réalisation de la méthode de référence. Un premier milieu a été utilisé jusqu'à l'analyse de l'échantillon 728. **De nombreuses colonies atypiques étaient observées sur ce premier milieu, pouvant générer des discordances de dénombrement entre la méthode alternative et la méthode de référence.** Un second milieu a ensuite été employé.

2.2.2 Contamination artificielle des échantillons

Aucune contamination artificielle n'a été réalisée.

2.2.3 Résultats bruts

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log UFC/g)
Produits carnés	1,00 à 6,57
Produits laitiers	1,85 à 4,83
Produits de la mer	1,90 à 6,08
Végétaux et divers	1,48 à 6,09
Ovoproduits	1,30 à 6,08

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie et pour l'ensemble des échantillons sont donnés en Annexe 4.

2.2.4 Interprétation

Tableau 2

Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P%	
									Ordonnée à 0	Pente à 1
Produits carnés	14	1,21	GMFR	- 0,461	2,092	1,108	1,714	2,179	6	11
Produits laitiers	13	1,40	GMFR	0,116	0,365	0,933	0,716	2,201	72	49
Produits de la mer	24	1,23	GMFR	0,379	1,536	1,090	1,492	2,074	14	15
Végétaux	12	1,29	GMFR	- 0,275	1,422	1,036	0,834	2,228	19	42
Ovoproduits	10	0,74	GMFR	0,215	1,413	0,921	2,103	2,306	20	7
Tous produits	73	1,00	GMFR	- 0,229	2,323	1,040	1,654	1,994	2	10

Tableau 3

Catégorie	Biais D (médiane)	Répétabilité méthode alternative	Répétabilité méthode de référence
Produits carnés	- 0,128	0,250	0,205
Produits laitiers	- 0,050	0,411	0,293
Produits de la mer	- 0,128	0,235	0,191
Végétaux	- 0,090	0,322	0,250
Ovoproduits	- 0,153	0,295	0,396
Toutes catégories confondues	- 0,100	0,270	0,264

Les droites de régression pour chacune des matrices et pour l'ensemble des matrices sont données en Annexe 4.

2.2.5 Conclusion

Les biais entre les deux méthodes sont compris entre - 0,153 et - 0,050 log UFC/g.

Les limites de répétabilité de la méthode alternative sont comprises entre 0,235 et 0,411 ; celles de la méthode de référence entre 0,191 et 0,396.

Les tests statistiques valident les hypothèses des pentes = 1 et des ordonnées = 0 pour toutes les catégories testées.

Les valeurs des coefficients a et b de la droite de régression, tous produits confondus, sont satisfaisantes :

$$\log \text{Alt} = 1,040 \log \text{Ref} - 0,229$$

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 *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 4

Niveau	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type	Biais
0	0 / 6	/	/
1	3 / 6	0,816	0,5
5	6 / 6	1,966	4

Tableau 5

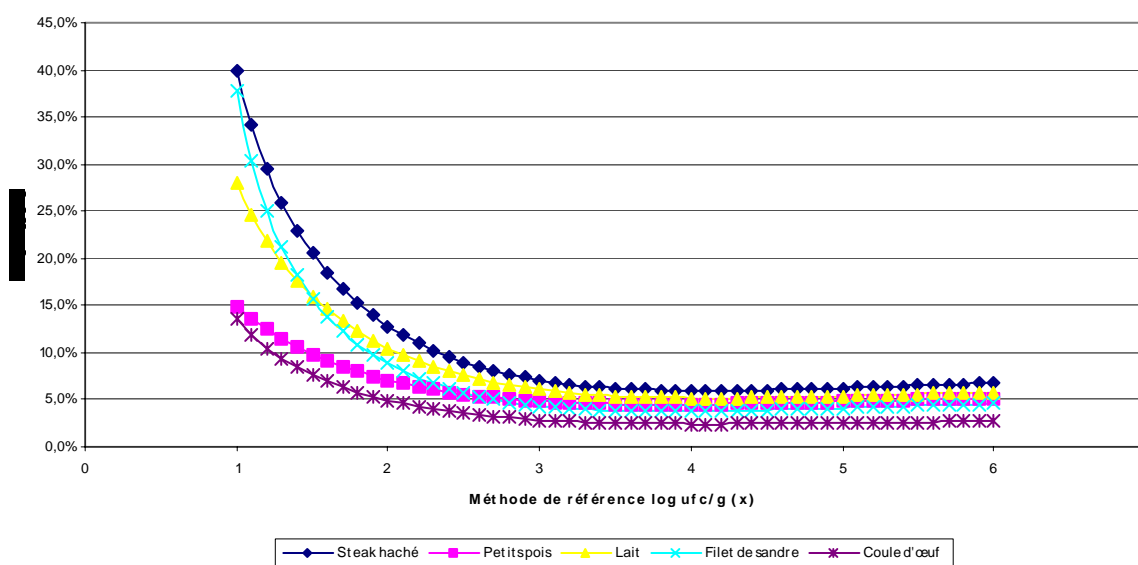
	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 S_0 + X_0$	1,8
LOD	$3,3 S_0 + X_0$	3,2
LOQ	$10 S_0 + X_0$	8,7

2.4 Sensibilité relative

Les données sont intrinsèques à la méthode. Elles sont obtenues à partir des résultats obtenus dans l'étude de linéarité.

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

Trente souches positives et vingt souches négatives ont été testées en parallèle par la méthode de référence et la méthode alternative.

2.5.2 Résultats

✓ Inclusivité

29 souches cibles testées présentent des colonies caractéristiques de couleur :

- bleu à bleu-gris pour les coliformes autres qu'*Escherichia coli*,
- rose pour les souches *Escherichia coli*.

La souche *Hafnia alvei* 168 présente des colonies gris clair.

Les souches *Enterobacter intermedius* 60, *Hafnia alvei* 130 et *Klebsiella oxytoca* 42 montrent des colonies caractéristiques de diamètre inférieur à 0,5 mm sur gélose VRBL de la méthode de référence.

✓ Exclusivité

Sur les vingt souches testées, seule la souche *Salmonella arizonae* CIP 55.23 a montré des colonies grises sur gélose Coli ID.

La souche *Proteus mirabilis* 55 présente des colonies caractéristiques sur gélose VRBL.

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 réside dans le fait qu'une seule boîte est dénombrée par dilution, pour la méthode Coli ID.

	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 la souche *Escherichia coli* 94 et la souche *Enterobacter cloacae* Fb 2.

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 des souches *Enterobacter cloacae* Fb 2 et *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 6.

Tableau 6 - Dénombrement de *Enterobacter cloacae* Fb 2 et *Escherichia coli* 94 par la méthode NF EN ISO 4832 (en UFC/ml)

	Taux 1		Taux 2		Taux 3	
	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2
J0	71	87	720	760	8 100	8 000
J1	72	78	810	640	9 300	6 600
J2	63	55	880	770	7 500	6 600

Aucune évolution des souches 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 coliformes totaux par le laboratoire expert, par la méthode de référence et par la méthode alternative, sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 - 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	1,97	1,92	1,92	1,85
2 à 3	2,90	2,75	2,90	2,82
3 à 4	3,98	3,89	3,89	3,92

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 8.

Tableau 8 - 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.

3.3 Résultats des analyses

Une remarque a été faite par le laboratoire L concernant l'aspect des coliformes sur la gélose VRBL : les colonies étaient de très petite taille et ont été notées comme atypiques, mais elles ont été confirmées (gazogènes en BLBVB).

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.

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 9.

Tableau 9 - 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	75	45	80	50	660	750	750	640	5800	5900	6600	8200
B	<1	<1	<1	<1	79	90	94	81	960	1000	1000	730	12000	9400	11000	9400
C	<10	<10	<10	<10	86	100	80	50	760	740	530	720	8700	8700	7800	7100
D	<10	<10	<10	<10	40	50	80	90	820	660	790	660	6300	8000	7400	5700
E	<1	<1	<1	<1	75	76	93	63	990	730	920	840	9500	8500	6800	9500
F	<1	<1	<1	<1	80	82	85	76	1200	820	1000	750	12000	13000	7100	8800
G	<10	<10	<10	<10	45	73	50	110	760	670	550	580	7100	8000	5800	6900
H	<1	<1	<1	<1	70	76	61	60	700	750	810	750	8200	8000	8000	8500
I	<1	<1	<1	<1	73	82	73	85	980	1000	900	810	10000	11000	9700	8500
J	<1	<1	<1	<1	70	68	65	69	860	730	770	800	7300	8100	8300	8100
K	<10	<10	<10	<10	110	80	80	50	780	750	710	750	8400	7100	8400	7800
L	<10	<10	<10	<10	130	77	110	80	900	630	630	790	8500	7400	7500	8700
M	<1	<1	<1	<1	72	66	71	66	830	710	820	780	8300	9100	9600	8500
N	<1	<1	<1	<1	72	76	73	65	890	780	820	930	9700	9500	9000	9000

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 10.

Tableau 10 - 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	- 0,003	2,160	Biais non significatif
2	n = 14	- 0,014	2,160	Biais non significatif
3	n = 14	- 0,023	2,160	Biais non significatif

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

Le biais obtenu entre les deux méthodes est non significatif, quel que soit le niveau testé : il est compris entre - 0,023 et - 0,003 log UFC/g.

Le biais entre les deux méthodes déterminé au cours de l'étude préliminaire est égal à - 0,100 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 11.

**Tableau 11 - 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	0,157	0,192	1,490	2,48	23
2	n = 14	0,166	0,147	1,262*	2,48	33
3	n = 14	0,127	0,179	1,981	2,48	11

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 0,270 log UFC/g pour toutes catégories confondues, celle de la méthode de référence à 0,264 log UFC/g.

Les limites de répétabilité de la méthode alternative obtenues au cours de l'étude collaborative montrent des valeurs comparables à celles 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 12.

**Tableau 12 - 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	0,272	0,265	1,058*	2,58	46
2	n = 14	0,158 ⁽²⁾ 0,166	0,199	1,579	2,58	21
3	n = 14	0,234	0,201	1,354*	2,58	30

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.

3.4.5 Rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité

Les rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité sont donnés dans le tableau 13.

Tableau 13 - 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	1,733	1,381
2	n = 14	1,000	1,351
3	n = 14	1,843	1,125

Niveau critique : reproductibilité / répétabilité : < 2

Les rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité sont tous inférieurs à 2, et de même ordre pour les deux méthodes.

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	5,007	2,812	2,55
2	n = 14	1,202	2,651	2,55
3	n = 14	5,791	1,532	2,55

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

La dispersion des résultats entre laboratoires est inférieure par la méthode alternative pour les niveaux 1 et 3 ; par contre, elle est légèrement plus élevée pour le niveau 2.

4 CONCLUSION

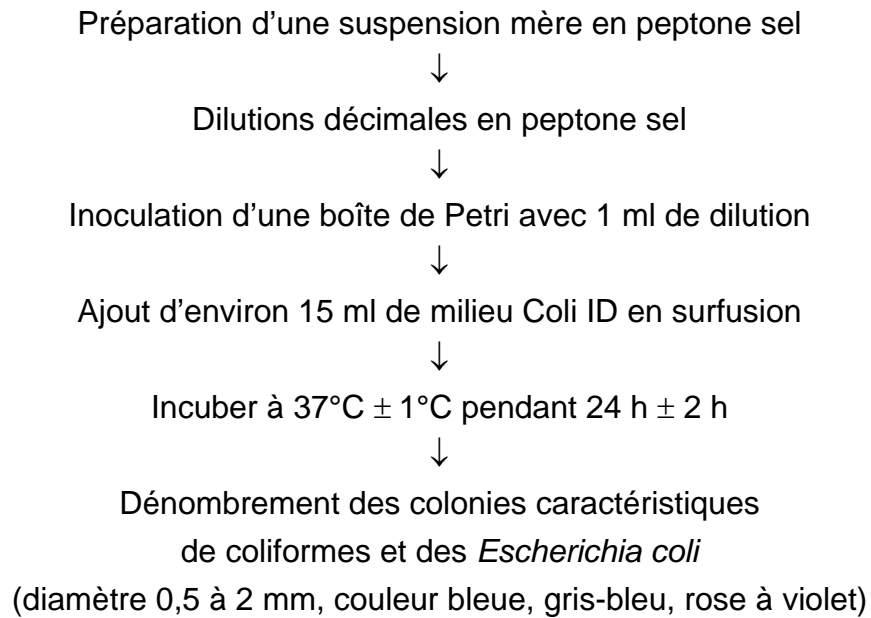
Les **conclusions de l'étude préliminaire** sont les suivantes :

- ✓ Toutes catégories de produits confondues, la linéarité et l'exactitude de la méthode COLI ID pour le dénombrement des coliformes totaux sont satisfaisantes.
- ✓ Les limites de répétabilité de la méthode alternative sont comprises entre 0,233 et 0,411 ; celles de la méthode de référence sont comprises entre 0,191 et 0,396.
- ✓ Le biais entre les deux méthodes est faible, compris entre - 0,153 et - 0,050 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 faible et non significatif; il varie de - 0,023 à - 0,003.
- ✓ Les limites de répétabilité et de reproductibilité de la méthode alternative sont comparables à celles de la méthode de référence.
- ✓ La dispersion entre laboratoires est généralement meilleure pour la méthode alternative que pour la méthode de référence.

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 complété en fonction des critères de performances imposés:

Peptone de gélatine (bovin ou porcine)	7 g
Extrait de levure.....	3 g
Chlorure de sodium	5 g
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'inviolabilité 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

METHODS 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.



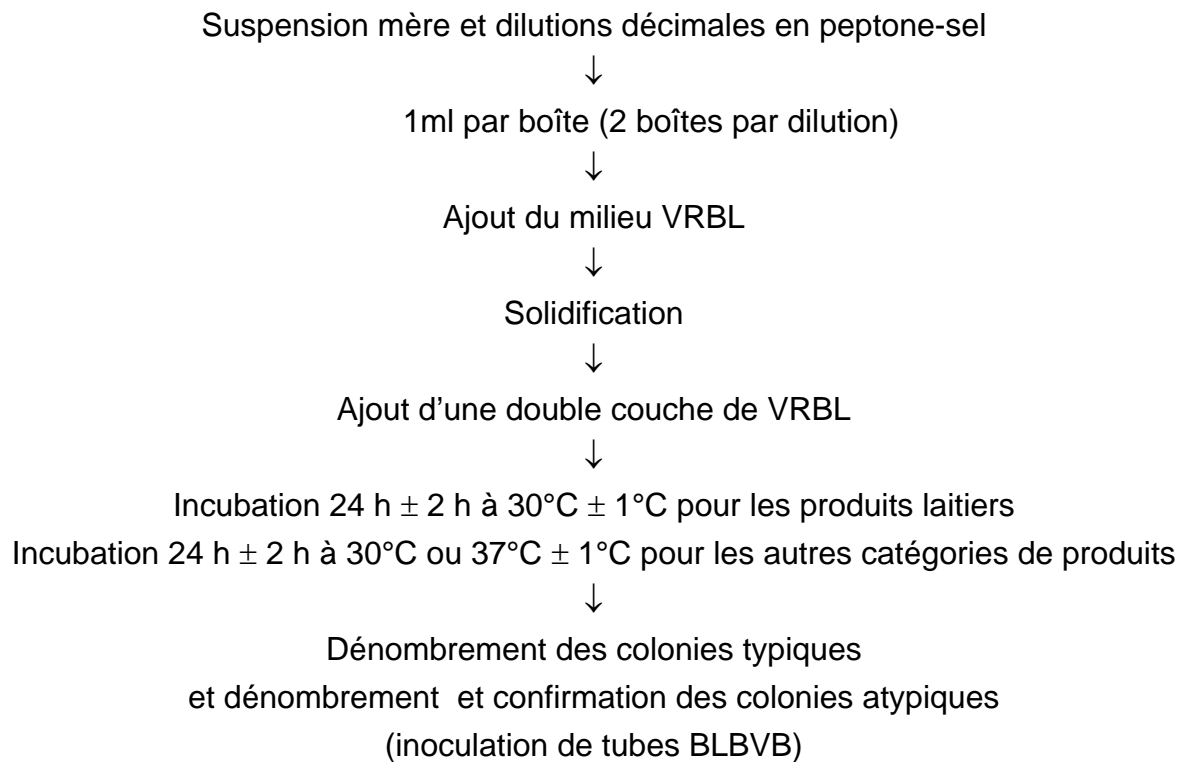
bioMérieux® SA
au capital de 12 029 370 €
673 620 399 RCS LYON

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

Imprimé en France

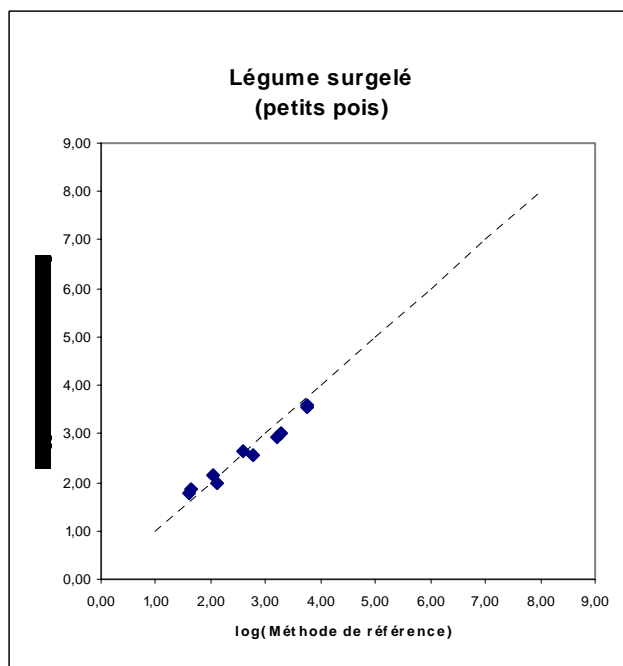
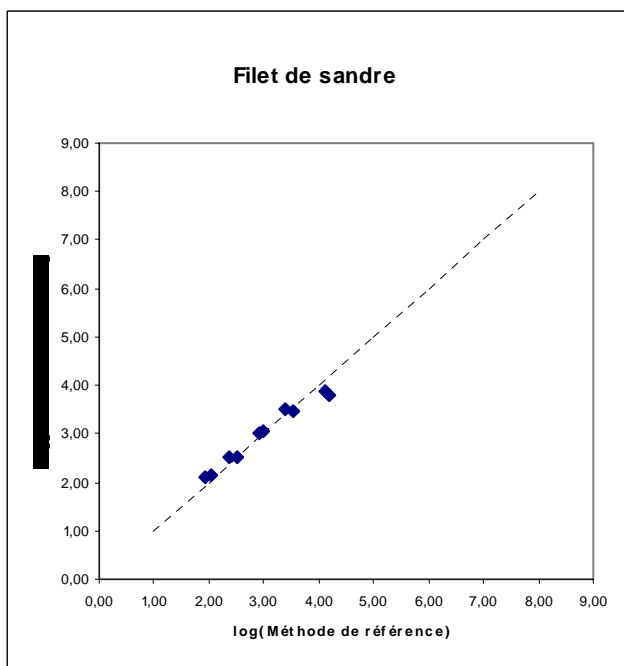
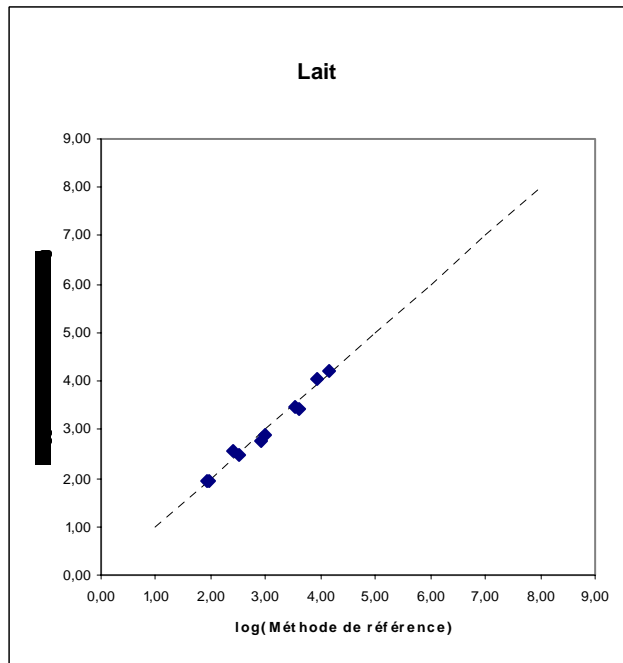
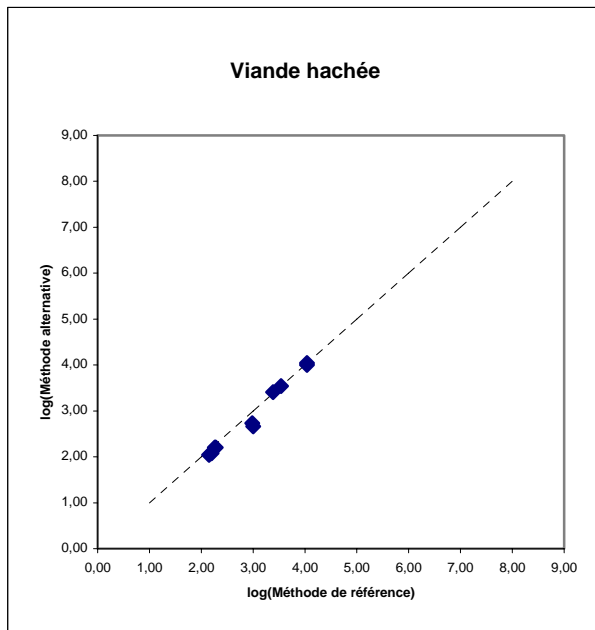
bioMérieux et le logo bleu sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

Annexe 2 - Méthode de référence



Annexe 3 - Linéarité : Graphiques bidimensionnels et droites de régression

Linéarité : graphique bidimensionnel



Linéarité : graphique bidimensionnel

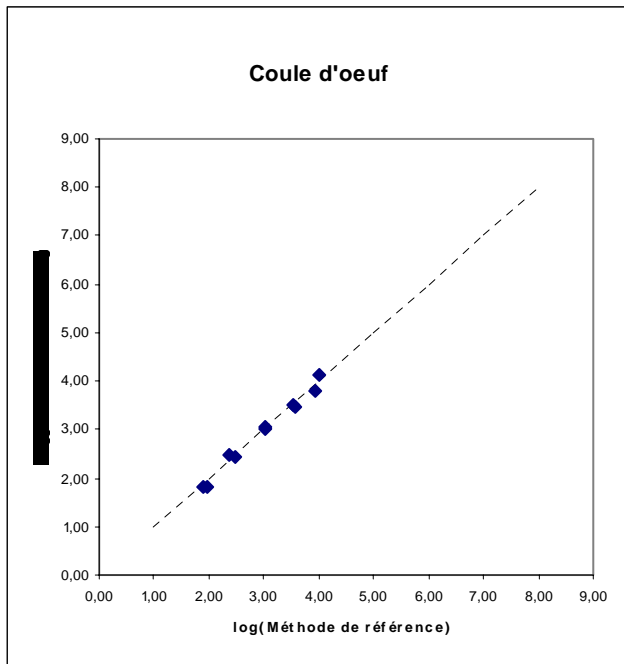
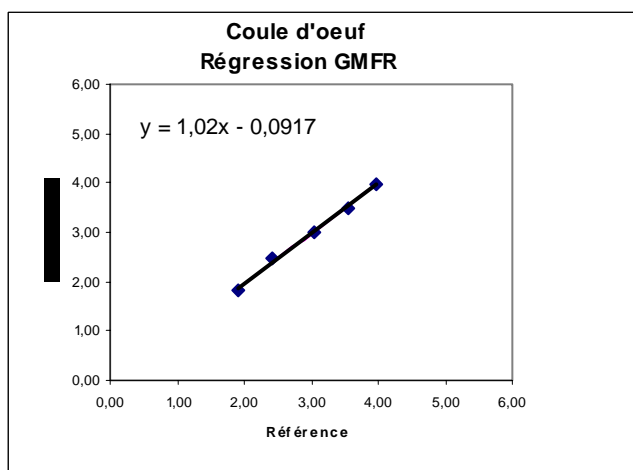
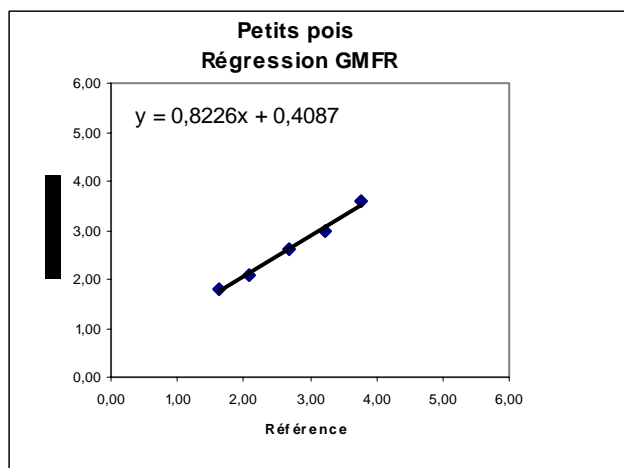
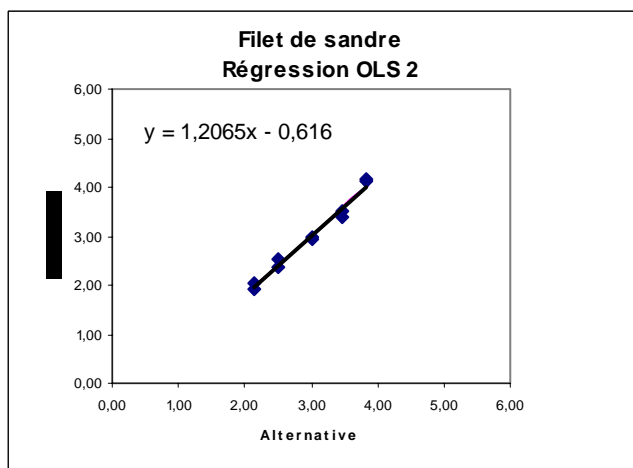
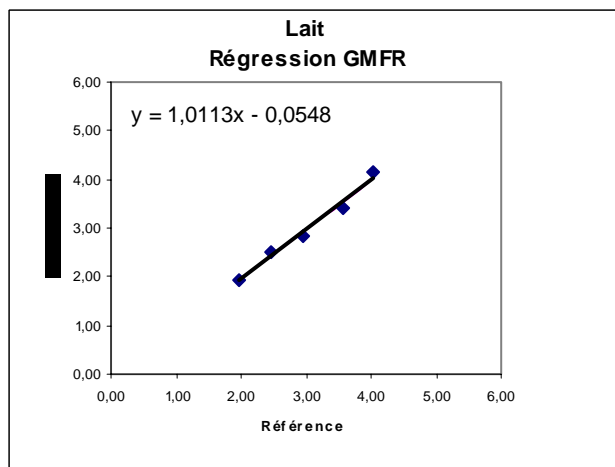
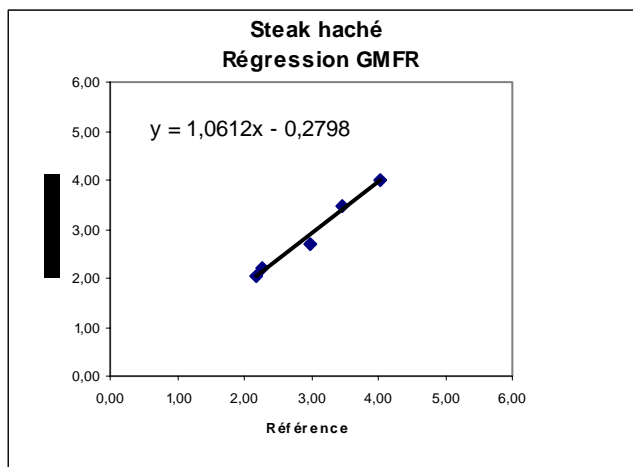
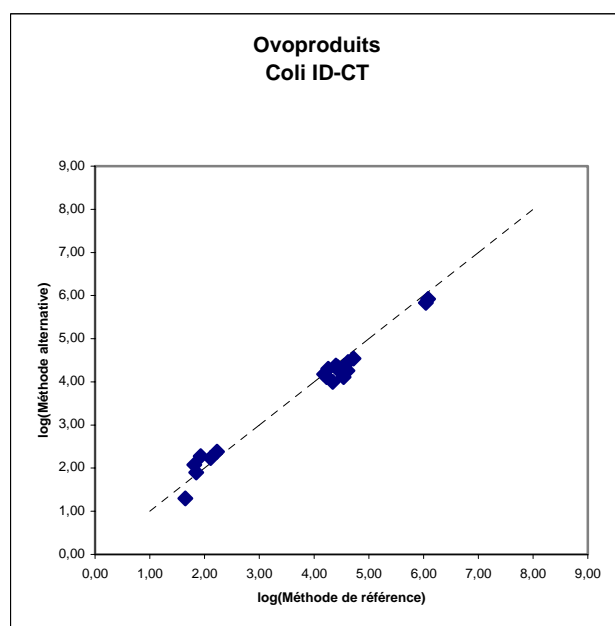
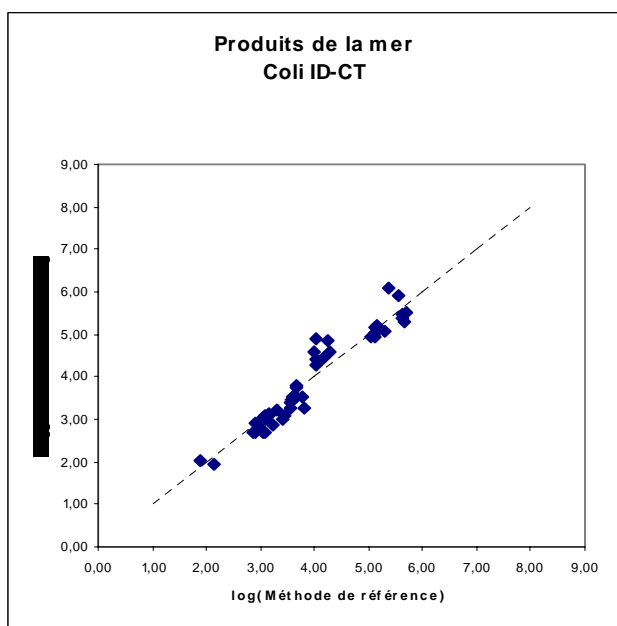
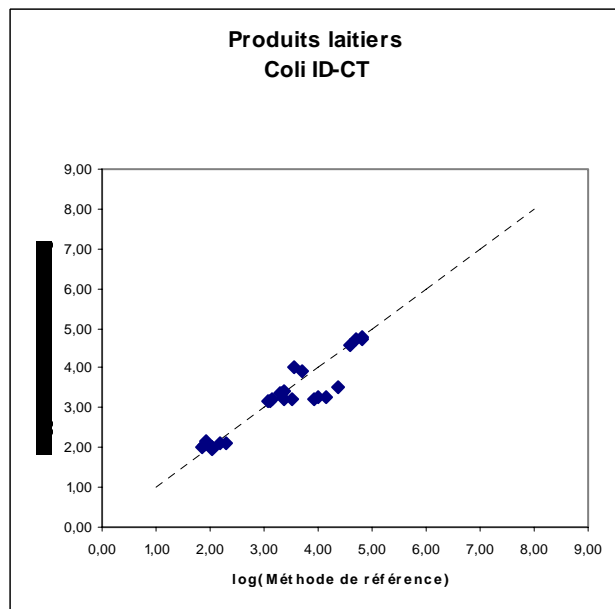
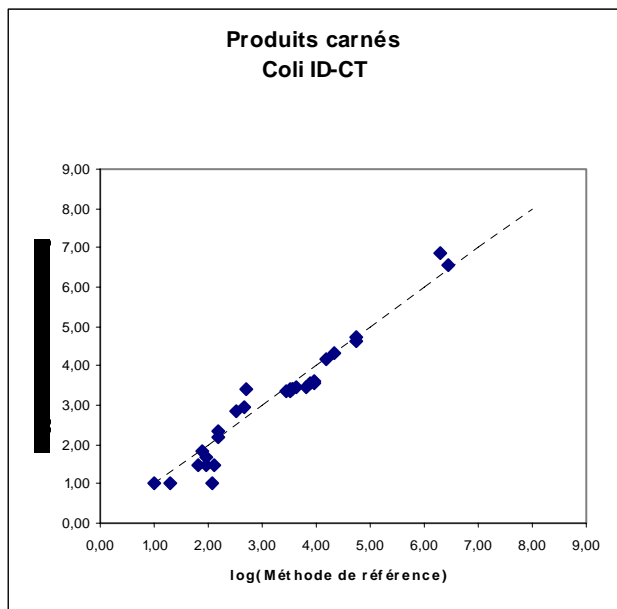


Figure 2 - Linéarité : Droites de régression

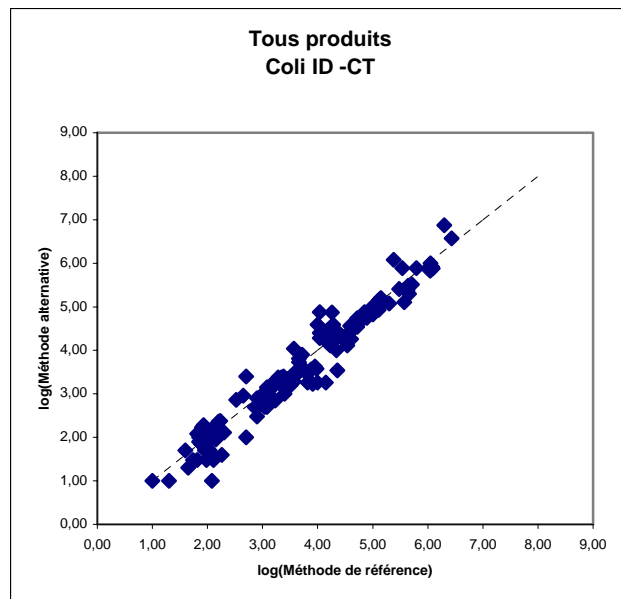
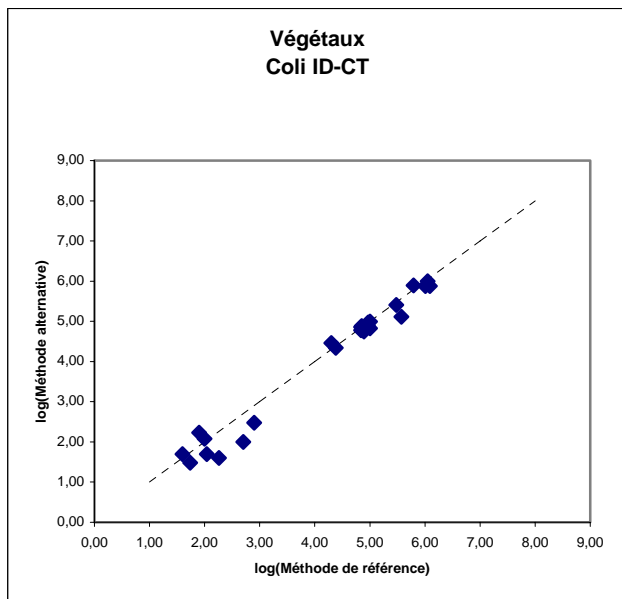


Annexe 4 - Exactitude relative : Graphiques bidimensionnels et droites de régression

Exactitude relative : Graphique bidimensionnel



Exactitude relative : Graphique bidimensionnel



Exactitude : droites de régression

