



CONFIDENTIEL

Certification *AFNOR validation* de la méthode
RAPID' *E.coli* 2 pour le dénombrement des
Escherichia coli β glucuronidase positive à 44°C
selon le référentiel EN ISO 16140

Rapport de synthèse

| | |
|---|----------------|
| <u>Date de validation initiale :</u> | 06/07/1993 |
| <u>Date de 1^{ère} reconduction-extension</u> (<i>Changement de formulation REC en REC2</i>) | 19/11/1997 |
| <u>Date de 2^{ème} reconduction</u> (<i>Modification de la méthode de référence NF EN ISO 16649-2</i>) | 07/03/2002 |
| <u>Date de 3^{ème} reconduction</u> (<i>Mise en conformité par rapport au référentiel NF EN ISO 16140</i>) | 02/12/2004 |
| <u>Date de 4^{ème} reconduction</u> | 28/11/2008 |
| <u>Numéro d'attestation :</u> | BRD 07/1-07/93 |

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 | 10 |
| 3.5.1 | Calcul du biais D..... | 10 |
| 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 44°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

Les méthodes de référence utilisées étaient les suivantes :

- certification initiale et première reconduction : norme NF V08-017 (Juin 1980), annexe à la méthode NF ISO 4832 (Juillet 1991), utilisant le milieu VRBL,ensemencé en profondeur et incubé à 44,5°C
- deuxième et troisième reconduction : norme NF EN ISO 16649-2 : "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 (Juillet 2001)", utilisant le milieu TBX,ensemencé en profondeur et incubé à 44°C.

Le schéma analytique de la méthode de référence NF EN ISO 16649-2 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* à 44°C est validée sous le numéro d'attestation BRD 07/1-07/93 :

- juillet 1993 : validation initiale avec le milieu RAPID'*E.coli*
- novembre 1997 : reconduction et extension suite à la modification de formulation du milieu, nommé RAPID'*E.coli* 2
- décembre 2002 : reconduction en comparaison à la norme NF ISO 16649-2 :2001
- décembre 2004 : reconduction selon le 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.

Les principaux éléments de validation liés à la méthode et obtenus avant le mise en conformité selon le référentiel NF EN ISO 16140 sont repris en annexe A.
L'ensemble des résultats obtenus en 2004 est repris ci-après.

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'écart 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 (44°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 | 4 |
| | viandes de volaille | 8 | 3 |
| | produits assaisonnés (saucisses) | 7 | 5 |
| | TOTAL | 25 | 12 |
| 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 | 52 |

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 C.

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 : $y = bx + a$.

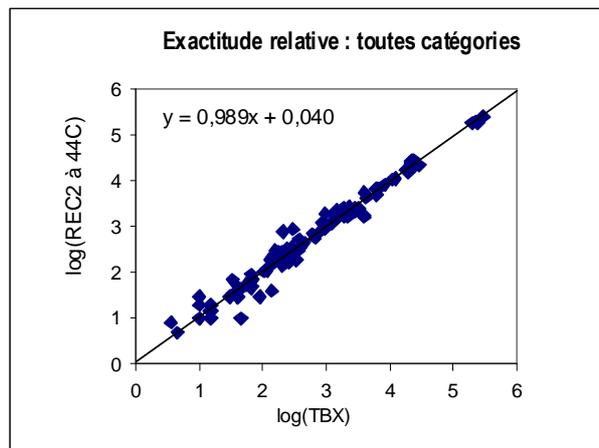
Pour chacune des méthodes, les écarts-type de répétabilité ont calculés (sr(x) et Rob.sr(x) & sr(y) et Rob.sr(y)).

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 | 1,27 | GMFR | 0,040 | 0,758 | 0,452 | 0,989 | 0,556 | 0,581 | {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 :

$y = 0,040 + 0,989 x \quad (r^2 = 0,986)$

avec :

y = log(N méthode alternative)
x = log(N 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 = 0,28 | 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 16649-2 et 0,28 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.

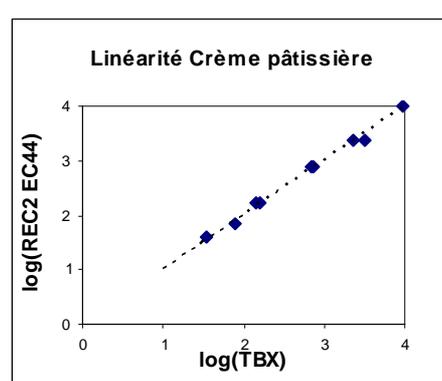
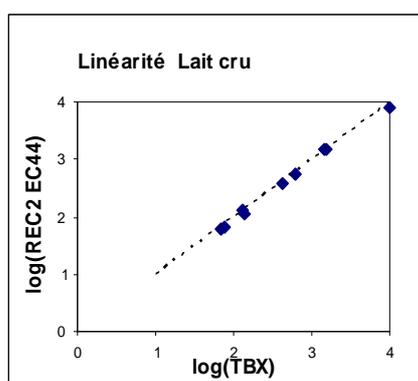
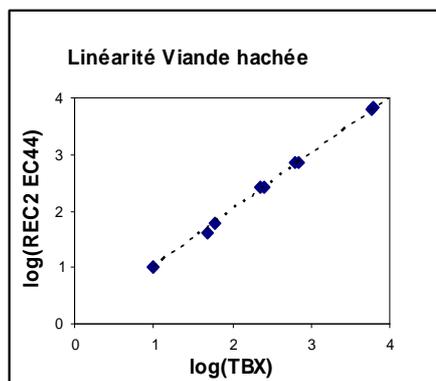
| Produit | Souche | Origine |
|-----------------------|---------------|-----------------|
| viande de bœuf hachée | <i>E.coli</i> | rognons de porc |
| lait cru | <i>E.coli</i> | lait cru |
| filet de poisson | <i>E.coli</i> | crépinette |
| chou rouge | <i>E.coli</i> | chou rouge |
| crème pâtissière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

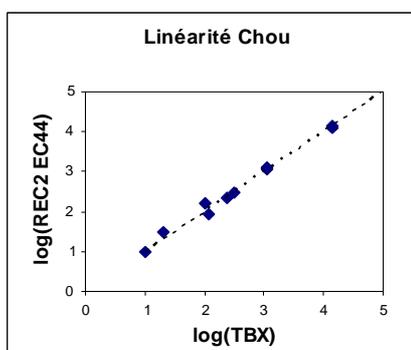
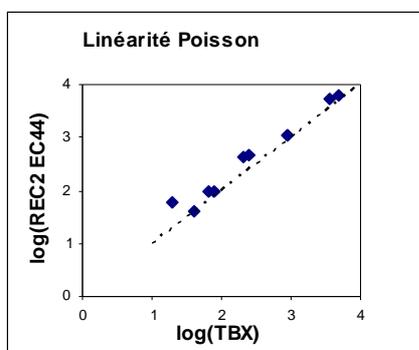
2.2.2 Résultats bruts

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 niveaux (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 | 0,138 | OLS2 | 5,41 | 2,002 | 14 % | linéaire |
| lait cru | 1,670 | OLS1 | 5,41 | 0,898 | 50 % | linéaire |
| crème pâtissière | 0,269 | OLS2 | 5,41 | 0,476 | 71 % | linéaire |
| poisson | 0,462 | OLS2 | 5,41 | 7,208 | 3 % | non linéaire |
| chou | 2,385 | OLS1 | 5,41 | 0,153 | 92 % | linéaire |

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

| | | |
|------------------|-----------------------------------|------------------------|
| viande hachée | Log(Ref) = 0,978 log(Alt) + 0,042 | R ² = 0,999 |
| lait cru | Log(Alt) = 1,021 log(Ref) - 0,089 | R ² = 0,996 |
| crème pâtissière | Log(Ref) = 1,013 log(Alt) - 0,050 | R ² = 0,986 |
| poisson | Log(Ref) = 1,040 log(Alt) - 0,290 | R ² = 0,983 |
| chou | Log(Alt) = 0,969 log(Ref) + 0,101 | R ² = 0,983 |

2.2.4 Conclusion

Pour le poisson, 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 D.

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 boîtes ensemencées par dilution décimale, et par la méthode alternative.

Les analyses ont été réalisées le lendemain du jour d'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 était de $6,0 \cdot 10^5$ cellules par 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) |
|-------------------------|--|
| 50 | 40 |
| 500 | 400 |
| 5000 | 4100 |

3.3 Températures

3.3.1 A réception

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

| Laboratoire | Température à réception | Commentaires |
|-------------|-------------------------|--------------------------------------|
| A | 4.0°C | |
| B | 3.0°C | |
| C | 9.2°C | Température à réception non conforme |
| D | 5.0°C | |
| E | 2.0°C | |
| F | 4.6°C | |
| G | 0.9°C | |
| H | 5.5°C | |
| I | 6.3°C | |
| J | / | Echantillons reçus après 48 heures |
| K | 5.0°C | |
| L | 3.0°C | |
| M | 6.4°C | |
| N | 5.0°C | |
| O | 5.0°C | |
| P | 1.3°C | |

3.3.2 Conclusion

Un laboratoire (J) avait reçu ses échantillons 48 heures après envoi et ne les avait pas analysés. La température de réception du laboratoire C était de 9,2°C. Ce laboratoire avait réalisé les analyses, mais ses résultats n'ont pas été exploités.

Les températures obtenues pour les quatorze autres laboratoires, ayant reçu leurs échantillons dans un délai de 24 heures après envoi, étaient conformes aux exigences (entre 0°C et 8°C). Leurs résultats ont donc été interprétés.

3.4 Résultats

3.4.1 Laboratoire expert

NB :

Les échantillons ont été stockés à 2°C et à 8°C pour évaluer l'évolution d'E.coli et interpréter les résultats des laboratoires participants qui analysaient des échantillons conservés entre 0 et 8°C.

| <i>stockage à +2°C pendant 24 heures</i> | Méthode de référence NF EN ISO 16649-2 | | Méthode alternative | |
|--|--|------------|----------------------------------|------------|
| | Duplicat 1 | Duplicat 2 | Duplicat 1 | Duplicat 2 |
| | Lecture à 18 heures d'incubation | | Lecture à 18 heures d'incubation | |
| Niveau 0 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| Niveau 1 | 37 | 39 | 47 | 35 |
| Niveau 2 | 390 | 460 | 400 | 440 |
| Niveau 3 | 4500 | 3800 | 4500 | 4700 |
| | Lecture à 24 heures d'incubation | | Lecture à 24 heures d'incubation | |
| Niveau 0 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| Niveau 1 | 37 | 39 | 47 | 35 |
| Niveau 2 | 390 | 460 | 400 | 440 |
| Niveau 3 | 4500 | 3800 | 4500 | 4700 |

| <i>stockage à +8°C pendant 24 heures</i> | Méthode de référence NF EN ISO 16649-2 | | Méthode alternative | |
|--|--|------------|----------------------------------|------------|
| | Duplicat 1 | Duplicat 2 | Duplicat 1 | Duplicat 2 |
| | Lecture à 18 heures d'incubation | | Lecture à 18 heures d'incubation | |
| Niveau 0 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| Niveau 1 | 52 | 47 | 47 | 50 |
| Niveau 2 | 380 | 430 | 440 | 550 |
| Niveau 3 | 4500 | 4700 | 5500 | 3600 |
| | Lecture à 24 heures d'incubation | | Lecture à 24 heures d'incubation | |
| Niveau 0 | <1 | <1 | <1 | <1 |
| Niveau 1 | 52 | 47 | 47 | 50 |
| Niveau 2 | 380 | 430 | 440 | 550 |
| Niveau 3 | 4500 | 4700 | 5500 | 3600 |

Les résultats obtenus par la méthode NF ISO 16649-2 et par la méthode alternative sont concordants. Les résultats obtenus après stockage à 2°C et 8°C ne montraient pas d'évolution significative du nombre d'*Escherichia coli* par ml. De même, les lectures à 18 heures et à 24 heures d'incubation ne montraient aucune différence.

3.4.2 Laboratoires collaborateurs

Les résultats des 14 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 |
| A | 20 | 45 | 19 | 19 |
| B | 17 | 19 | 34 | 31 |
| D | 19 | 36 | 48 | 32 |
| E | 39 | 37 | 32 | 50 |
| F | 10 | 45 | 60 | 60 |
| G | 28 | 38 | 37 | 34 |
| H | 37 | 19 | 44 | 44 |
| I | 40 | 45 | 53 | 48 |
| K | 40 | 41 | 35 | 48 |
| L | 28 | 43 | 50 | 39 |
| M | 38 | 35 | 44 | 42 |
| N | 25 | 21 | 38 | 42 |
| P | 39 | 43 | 45 | 36 |

Un laboratoire ne nous a pas rendu de résultats sur TBX pour le faible taux, suite à un problème d'ensemencement.

b) Niveau 2 (résultats en UFC/ml)

| Laboratoire | Méthode de référence | | Méthode alternative | |
|-------------|----------------------|------------|---------------------|------------|
| | Duplicat 1 | Duplicat 2 | Duplicat 1 | Duplicat 2 |
| A | 110 | 101 | 364 | 355 |
| B | 120 | 345 | 436 | 445 |
| D | 490 | 486 | 545 | 445 |
| E | 368 | 427 | 491 | 491 |
| F | 345 | 323 | 464 | 336 |
| G | 373 | 509 | 473 | 355 |
| H | 450 | 200 | 509 | 355 |
| I | 545 | 455 | 555 | 436 |
| K | 573 | 518 | 545 | 509 |
| L | 545 | 400 | 564 | 500 |
| M | 509 | 568 | 636 | 555 |
| N | 332 | 336 | 355 | 490 |
| O | 459 | 491 | 345 | 363 |
| P | 490 | 480 | 573 | 518 |

c) Niveau 3 (résultats en UFC/ml)

| Laboratoire | Méthode de référence | | Méthode alternative | |
|-------------|----------------------|------------|---------------------|------------|
| | Duplicat 1 | Duplicat 2 | Duplicat 1 | Duplicat 2 |
| A | 3591 | 4318 | 3909 | 3909 |
| B | 2500 | 3000 | 4090 | 4272 |
| D | 5364 | 5818 | 6090 | 5182 |
| E | 3682 | 3818 | 5273 | 3818 |
| F | 4818 | 4545 | 6000 | 5455 |
| G | 3818 | 4409 | 3636 | 3545 |
| H | 6136 | 6318 | 5545 | 5090 |
| I | 5773 | 5682 | 6090 | 6909 |
| K | 5909 | 5772 | 6090 | 7818 |
| L | 7455 | 7455 | 5909 | 7000 |
| M | 5136 | 4909 | 5909 | 8273 |
| N | 4909 | 4682 | 5000 | 4545 |
| O | 5773 | 6318 | 4545 | 4364 |
| P | 1500 | 5818 | 5636 | 4000 |

3.4.3 Conclusion

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 14 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 $s\{d\}$ 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 | 0,075 | 0,161 | 1,683 | 2,179 | {D=0} acceptée |
| Niveau 2 | 0,053 | 0,105 | 1,891 | 2,160 | {D=0} acceptée |
| Niveau 3 | 0,010 | 0,088 | 0,428 | 2,160 | {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)

| | 1997 (ISO 5725) | 2002 (ISO 5725) | | 2004 (ISO 16140) | |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|
| | r REC2 EC44 | r ISO 16649-2 | r REC2 EC44 | r ISO 16649-2 | r REC2 EC44 |
| Niveau 1 (10 – 100 UFC/ml) | 0.067 | 0.33 | 0.20 | 0,22 | 0,13 |
| Niveau 2 (100 – 1 000 UFC/ml) | 0.014 | 0.41 | 0.17 | 0,13 | 0,16 |
| Niveau 3 (1 000 – 10 000 UFC/ml) | 0.014 | 0.09 | 0.16 | 0,07 | 0,14 |

Conclusion

Pour les niveaux 1 et 3, la méthode alternative diffère de la méthode de référence :

- pour le niveau 1, la répétabilité de la méthode alternative est meilleure que celle de la méthode de référence
- pour le niveau 3, la répétabilité de la méthode alternative est moins bonne que celle de la méthode de référence

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

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)

| | 1997 (ISO 5725) | 2002 (ISO 5725) | | 2004 (ISO 16140) | |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|
| | R REC2 EC44 | R ISO 16649-2 | R REC2 EC44 | R ISO 16649-2 | R REC2 EC44 |
| Niveau 1 (10 – 100 UFC/ml) | 0.240 | 0.43 | 0.35 | 0.42 | 0.18 |
| Niveau 2 (100 – 1 000 UFC/ml) | 0.060 | 0.63 | 0.22 | 0.32 | 0.29 |
| Niveau 3 (1 000 – 10 000 UFC/ml) | 0.030 | 0.39 | 0.30 | 0.35 | 0.35 |

Conclusion

Pour le niveau 1, 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 les niveaux 2 et 3, 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 (44°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 0,28 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 $D = 0,00$ 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 0,07 à 0,22 log (UFC/ml) pour la méthode de référence et de 0,13 à 0,16 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 0,32 à 0,42 log (UFC/ml) pour la méthode de référence et de 0,18 à 0,35 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



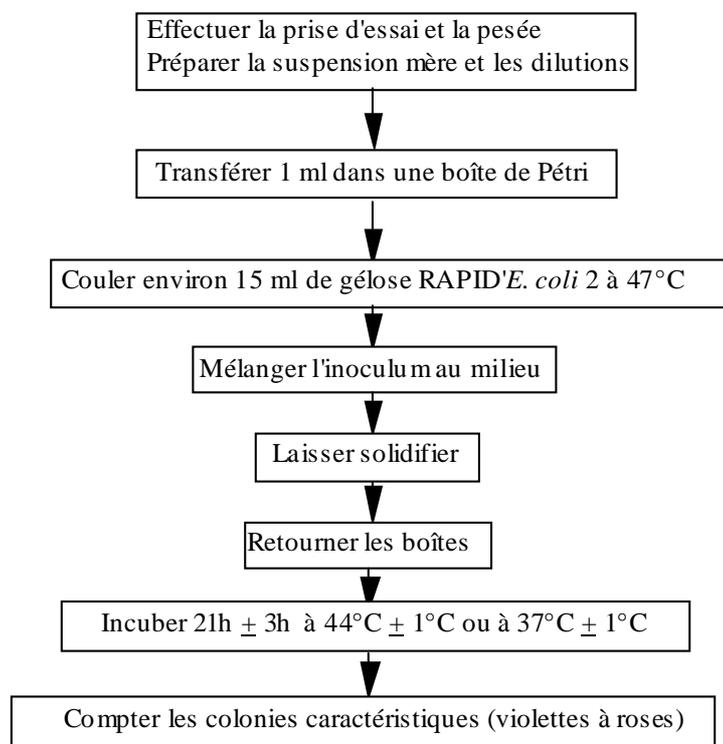
Virginie Ewe
Responsable Etudes

ANNEXES

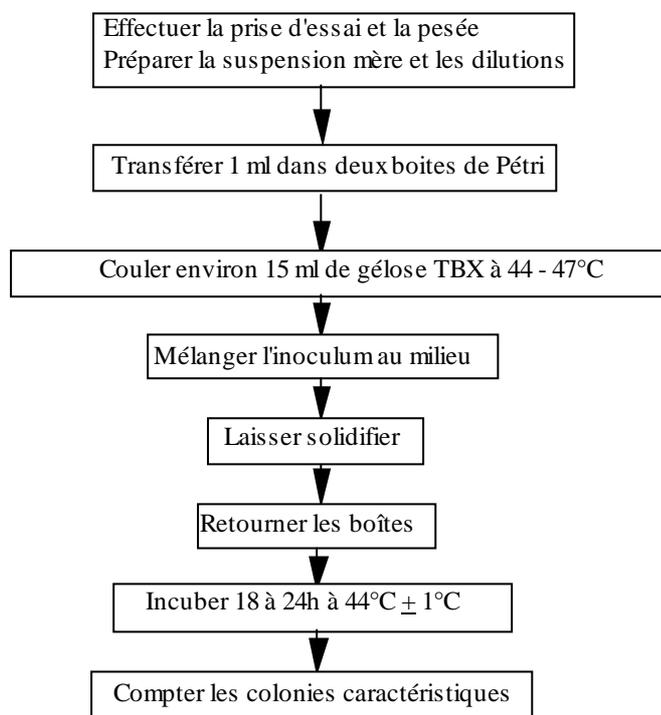
ANNEXE A :

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 :

HISTORIQUE DE LA VALIDATION

Date de 1^{ère} certification AFNOR Validation et date(s) de reconduction

La méthode RAPID'*E.coli* pour le dénombrement des *Escherichia coli* à 44°C est validée sous le numéro d'attestation BRD 07/1-07/93 :

- juillet 1993 : validation initiale avec le milieu RAPID'*E.coli*
- novembre 1997 : reconduction et extension suite à la modification de formulation du milieu, nommé RAPID'*E.coli* 2
- décembre 2002 : reconduction en comparaison à la norme NF ISO 16649-2 :2001
- décembre 2004 : reconduction selon le référentiel NF EN ISO 16140

Méthode de référence par rapport à laquelle la méthode alternative a été comparée

Les méthodes de référence utilisées étaient les suivantes :

- validation initiale et première reconduction : norme NF V08-017 (Juin 1980), annexe à la méthode NF ISO 4832 (Juillet 1991), utilisant le milieu VRBL, ensemencé en profondeur et incubé à 44,5°C
- deuxième et troisième reconduction : norme NF EN ISO 16649-2 : "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 (Juillet 2001)", utilisant le milieu TBX, ensemencé en profondeur et incubé à 44°C.

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

Spécificité

Lors de l'étude initiale de certification en 1993, 20 souches de *E.coli* et 13 souches n'appartenant pas au genre *E.coli* avaient été testées et avaient donné les résultats attendus.

Linéarité

Lors de l'étude initiale de certification en 1993, quatre souches de *E.coli* avaient été utilisées pour réaliser les contaminations artificielles sur différentes matrices alimentaires (rondelles de poireaux, lait stérilisé, viande hachée de porc), à 5 niveaux de contamination.

Les essais avaient permis de conclure à la linéarité de la méthode.

Justesse

Etude de reconduction 1997

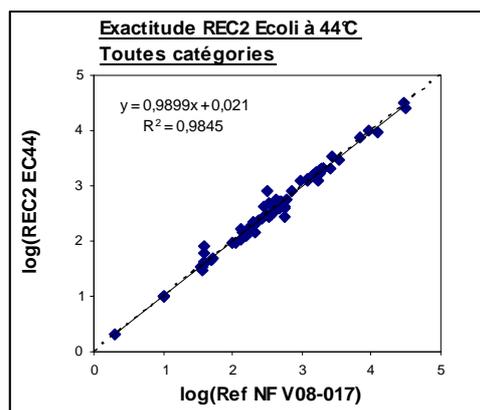
Les résultats de cette étude étaient interprétés selon la norme expérimentale XP V03-110 (1993) : "Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence"

La méthode de référence était la norme NF V 08-017 (Juin 1980) : Directives générales pour le dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli*, annexe à la méthode NF ISO 4832 (Juillet 1991).

L'étude portait sur 80 produits contenant des *Escherichia coli*, répartis sur les 4 catégories suivantes : 20 produits laitiers, 19 produits carnés, 21 produits de la mer, 20 produits végétaux.

Suite au changement de formulation du milieu RAPID'*E.coli*, les produits avaient été analysés en parallèle par les trois méthodes : RAPID'*E.coli*, RAPID'*E.coli* 2, NF V08-017.

Un graphique bidimensionnel avec les valeurs moyennes de chaque échantillon pour l'ensemble des produits est présenté ci-dessous :



Les différentes analyses statistiques réalisées permettaient de conclure en l'équivalence de la méthode RAPID'*E.coli* 2 et de la méthode de référence NF V 08 -017, quel que soit le test statistique réalisé.

En revanche la méthode RAPID'*E.coli* ne semblait pas si bien corrélée, ni à la méthode de référence, ni à la méthode RAPID'*E.coli* 2. Les écarts étaient liés essentiellement au décalage de l'ordonnée à l'origine.

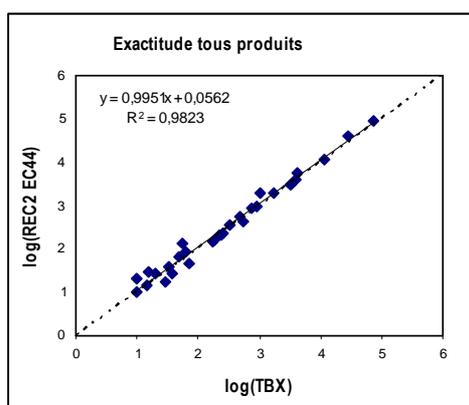
Etude de reconduction 2002

La méthode de référence ayant changé, des essais ont été réalisés par rapport à la norme était la norme NF EN ISO 16649-2 : "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 (Juillet 2001)", utilisant le milieu TBX, ensemencé en profondeur et incubé à 44°C.

Les résultats de cette étude ont été interprétés selon la norme NF V03-110 (1998) : "Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence"

Des essais ont été réalisés sur 50 produits naturellement contaminés en *Escherichia coli*, répartis sur les 4 catégories suivantes : 18 produits laitiers, 12 produits carnés, 10 produits de la mer, 10 produits végétaux.

Un graphique bidimensionnel avec les valeurs moyennes de chaque échantillon pour l'ensemble des produits est présenté ci-dessous :



Fidélité

L'étude inter-laboratoires réalisée en 2001 a mis en œuvre la méthode alternative et la méthode de référence NF EN ISO 16649-2.

Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité, interprétées selon la norme ISO 5725-2, obtenues pour la méthode RAPID'*E.coli* 2 étaient satisfaisantes :

- 0.16 à 0.20 log UFC/ml pour la répétabilité,
- 0.22 à 0.35 log UFC/ml pour la reproductibilité.

Pour la méthode de référence, les valeurs variaient de :

- 0.09 à 0.41 log UFC/ml pour la répétabilité,
- 0.39 à 0.63 log UFC/ml pour la reproductibilité.

ANNEXE C :

EXACTITUDE RELATIVE
-
RESULTATS

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

| Code | Cat | Produit | Méthode de référence (TBX) | | Méthode alternative (REC2 à 44°C) | |
|------|-----|----------------------|----------------------------|------------|-----------------------------------|------------|
| | | | Résultat 1 | Résultat 2 | Résultat 1 | Résultat 2 |
| 1 | PC | abats | 232 | 232 | 300 | 273 |
| 2 | PC | bœuf haché | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 3 | PC | merguez | 118 | 205 | 118 | 145 |
| 4 | PC | saucisse de veau | 150 | 177 | 218 | 191 |
| 6 | PC | saucisse aux herbes | 382 | 364 | 364 | 527 |
| 11 | PC | gigot d'agneau | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 12 | PC | blanquette de dinde | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 13 | PC | merguez | 15 | 10 | 10 | 30 |
| 14 | PC | escalope de dinde | 127 | 141 | 145 | 145 |
| 26 | PC | steak de dinde | 10 | 5 | <10 | 10 |
| 27 | PC | filet de poulet | 10 | 35 | 20 | 27 |
| 28 | PC | filet de dinde | 5 | 5 | <10 | <10 |
| 29 | PC | rognons de bœuf | 70 | 105 | 136 | 155 |
| 31 | PC | saucisse | 30 | 15 | 40 | 30 |
| 32 | PC | escalope de dinde | 832 | 932 | 1 091 | 1 418 |
| 33 | PC | steak haché | 55 | 45 | 40 | 20 |
| 34 | PC | chipolata | 964 | 1 214 | 1 327 | 1 273 |
| 35 | PC | escalope de veau | 195 | 450 | 309 | 464 |
| 38 | PC | escalope de dinde | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 39 | PC | steak de dinde | 15 | 10 | 30 | 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 | 8 | 5 |
| 10 | PL | reblochon | 868 | 950 | 1 273 | 1 909 |
| 24 | PL | reblochon | 40 | 45 | 30 | 10 |
| 25 | PL | roquefort | 209 | 300 | 791 | 891 |
| 36 | PL | fromage au lait cru | 19 500 | 18 000 | 16 000 | 18 000 |
| 37 | PL | tomme | 332 | 359 | 191 | 309 |
| 59 | PL | fromage lait cru | 2 773 | 3 182 | 2 455 | 2 545 |
| 77 | PL | brie | 1 423 | 1 395 | 1 473 | 1 536 |
| 78 | PL | reblochon | 6 227 | 8 227 | 4 909 | 8 455 |
| 90 | PL | fromage lait cru(CA) | 1 545 | 1 455 | 1 818 | 2 273 |

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

| Code | Cat | Produit | Méthode de référence (TBX) | | Méthode alternative (REC2 à 44°C) | |
|------|-----|------------------------|----------------------------|------------|-----------------------------------|------------|
| | | | Résultat 1 | Résultat 2 | Résultat 1 | Résultat 2 |
| 15 | PV | taboulé | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 16 | PV | concombre | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 21 | PV | salade de tomates | <10 | 5 | <10 | 20 |
| 30 | PV | épinards | 6 045 | 6 545 | 6 818 | 6 636 |
| 45 | PV | concombre | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 47 | PV | betterave rouge | 1 014 | 918 | 1 073 | 1 118 |
| 48 | PV | pomme de terre | 4 182 | 4 000 | 4 364 | 5 818 |
| 49 | PV | carottes rapées nature | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 50 | PV | macédoine | 65 | 65 | 45 | 91 |
| 56 | PV | compote de fruits | 655 | 605 | 564 | 691 |
| 58 | PV | chou rouge | 15 | 10 | 20 | 20 |
| 66 | PV | chou rouge (CA) | 305 | 155 | 282 | 309 |
| 67 | PV | chou rouge | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 68 | PV | chou rouge | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 69 | PV | pommes de terre | 136 | 118 | 40 | 109 |
| 71 | PV | tomates au thon | 140 | 245 | 200 | 227 |
| 89 | PV | carottes rapées nature | 1 591 | 2 091 | 1 727 | 1 636 |
| 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 | 191 | 155 |
| 43 | PP | filet de cabillaud | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 52 | PP | filet de rouget | 21 500 | 21 000 | 25 000 | 18 000 |
| 53 | PP | darne de saumon | 29 000 | 22 000 | 22 000 | 28 000 |
| 54 | PP | poisson | 290 000 | 225 000 | 250 000 | 200 000 |
| 55 | PP | saumon fumé | 240 000 | 195 000 | 180 000 | 180 000 |
| 61 | PP | crevettes CA | 2 318 | 1 955 | 1 818 | 2 091 |
| 62 | PP | moules | ND | ND | ND | ND |
| 63 | PP | crevettes | ND | ND | ND | ND |
| 73 | PP | calamars (CA) | 1 009 | 1 018 | 982 | 1 036 |
| 74 | PP | calamars (CA) | 2 273 | 2 773 | 2 727 | 2 091 |
| 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 | 164 | 273 |
| 92 | PP | saumon fumé (CA) | 1 864 | 1 909 | 2 636 | 1 636 |
| 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 | 30 | 30 |
| 23 | PAT | crème chocolat | <10 | 5 | <10 | <10 |
| 40 | PAT | crème à la banane | 70 | 40 | 70 | 50 |
| 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 | 70 | 50 |
| 60 | PAT | gateau abricot | 286 | 241 | 364 | 327 |
| 70 | PAT | éclair au café | 138 | 133 | 155 | 155 |
| 72 | PAT | gateau aux pêches | 4 000 | 3 864 | 1 664 | 1 791 |
| 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 | 291 | 227 |
| 94 | PAT | tarte pommes | 1 773 | 2 000 | 2 364 | 2 182 |
| 95 | PAT | versillais | 23 182 | 21 818 | 28 182 | 23 636 |
| 96 | PAT | gateau choco | 12 136 | 11 000 | 11 182 | 10 909 |

ANNEXE D :

SPECIFICITE

| Souche | Origine | PCA à 30°C | | REC2 à 44°C | |
|-------------------------------|----------------------|------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| | | Culture | Nombre de colonies | Couleur des colonies | Nombre de colonies |
| <i>Citrobacter diversus</i> | Aliments animaux | Positive | 146 | bleu | 118 |
| | | Positive | 132 | bleu | 120 |
| <i>Citrobacter diversus</i> | Herbes séchées | Positive | 136 | bleu | 110 |
| | | Positive | 143 | bleu | 152 |
| <i>Citrobacter diversus</i> | Levure | Positive | 164 | bleu | 160 |
| | | Positive | 112 | bleu | 123 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Produit carné | Positive | 39 | bleu clair | 40 |
| | | Positive | 55 | bleu clair | 54 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Végétaux | Positive | 38 | bleu clair | 44 |
| | | Positive | 59 | bleu clair | 59 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Poisson | Positive | 33 | bleu clair | 46 |
| | | Positive | 51 | bleu clair | 45 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Lait | Positive | 66 | bleu clair | 67 |
| | | Positive | 90 | bleu clair | 90 |
| <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 | 51 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Produit laitier | Positive | 118 | bleu | 127 |
| | | Positive | 110 | bleu | 121 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Produit laitier | Positive | 88 | bleu | 105 |
| | | Positive | 91 | bleu | 85 |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> | Aliments animaux | Positive | 135 | bleu | 140 |
| | | Positive | 113 | bleu | 121 |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> | Pâtisserie | Positive | 75 | bleu | 85 |
| | | Positive | 59 | bleu | 64 |
| <i>Erwinia spp.</i> | Collection | Positive | 23 | blanc-gris | 22 |
| | | Positive | 112 | blanc-gris | 102 |
| <i>Escherichia coli</i> O157 | Collection | Positive | 36 | bleu | 36 |
| | | Positive | 103 | bleu | 97 |
| <i>Escherichia hermanii</i> | Aliments animaux | Positive | 56 | bleu-gris | 54 |
| | | Positive | 102 | bleu-gris | 100 |
| <i>Escherichia hermanii</i> | Produit carné | Positive | 50 | bleu | 65* |
| | | Positive | 143 | bleu | 134 |
| <i>Escherichia hermanii</i> | Produit laitier | Positive | 22 | bleu | 10* |
| | | Positive | 89 | bleu | 32 |
| <i>Escherichia vulneris</i> | Produit carné | Positive | 31 | bleu | 14 |
| | | Positive | 112 | bleu | 87 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Foie de porc | Positive | 90 | | 0 |
| | | Positive | 82 | | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Reblochon | Positive | 80 | blanc-gris | 87 |
| | | Positive | 75 | blanc-gris | 73 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Persil | Positive | 75 | | 0 |
| | | Positive | 76 | | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Flétan | Positive | 84 | | 0 |
| | | Positive | 50 | | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Viande hachée | Positive | 127 | | 0 |
| | | Positive | 119 | | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Lait cru | Positive | 109 | | 0 |
| | | Positive | 134 | | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Echine de porc | Positive | 126 | | 0 |
| | | Positive | 97 | | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Rognons de porc | Positive | 150 | | 0 |
| | | Positive | 101 | | 0 |

* très petites colonies

| Souche | Origine | PCA à 30°C | | REC2 à 44°C | |
|---|----------------------|------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| | | Culture | Nombre de colonies | Couleur des colonies | Nombre de colonies |
| <i>Hafnia alvei</i> | Persil | Positive | 123 | | 0 |
| | | Positive | 59 | | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Brochette de poisson | Positive | 134 | | 0 |
| | | Positive | 128 | | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Concombre | Positive | 121 | | 0 |
| | | Positive | 107 | | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Tomate | Positive | 150 | | 0 |
| | | Positive | 89 | | 0 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | Aliments animaux | Positive | 40 | bleu clair | 45 |
| | | Positive | 134 | bleu clair | 150 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | Poisson | Positive | 62 | gris | 32 |
| | | Positive | 36 | gris | 18* |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Poudre de lait | Positive | 42 | bleu | 44 |
| | | Positive | 36 | bleu | 51 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Macédoine | Positive | 55 | bleu | 43 |
| | | Positive | 38 | bleu | 36 |
| <i>Moellerella wisconsensis</i> | Andouillette | Positive | 45 | | 0 |
| | | Positive | 46 | | 0 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Produit carné | Positive | 93 | bleu-gris | 81 |
| | | Positive | 145 | bleu-gris | 123 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Foies de volaille | Positive | 115 | bleu-gris | 91* |
| | | Positive | 102 | bleu-gris | 88 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Filet de rouget | Positive | 30 | blanc | 24 |
| | | Positive | 87 | blanc | 78 |
| <i>Salmonella arizonae</i> IIIb 61:-:- | Dinde | Positive | 66 | violet | 60 |
| | | Positive | 45 | violet | 43 |
| | | Positive | 75 | violet | 53 |
| | | Positive | 64 | violet | 39 |
| <i>Salmonella arizonae</i> IIIa 48:24:223 | Elevage d'oie | Positive | 116 | bleu | 105 |
| | | Positive | 76 | bleu | 81 |
| <i>Salmonella arizonae</i> IIIb 61:i:z53 | Cuisse de poulet | Positive | 96 | violet | 100 |
| | | Positive | 97 | violet | 86 |
| | | Positive | 112 | violet | 74 |
| | | Positive | 85 | violet | 51 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | Ovoproduit | Positive | 121 | blanc-gris | 93 |
| | | Positive | 105 | blanc-gris | 103 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium | Foie de porc | Positive | 83 | blanc-gris | 82 |
| | | Positive | 103 | blanc-gris | 99 |
| <i>Serratia marcescens</i> | Lait cru | Positive | 45 | | 0 |
| | | Positive | 55 | | 0 |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | Andouillette | Positive | 63 | | 0 |
| | | Positive | 45 | | 0 |
| <i>Shigella flexneri</i> | Collection | Positive | 25 | blanc-gris | 19* |
| | | Positive | 56 | blanc-gris | 46 |
| <i>Shigella flexneri</i> | Collection | Positive | 30 | | 0 |
| | | Positive | 35 | | 0 |
| <i>Shigella sonnei</i> | Collection | Positive | 26 | violet | 35 |
| | | Positive | 33 | violet | 32 |
| | | Positive | 39 | violet | 25 |
| | | Positive | 21 | violet | 15 |
| <i>Yersinia kristensenii</i> | Collection | Positive | 27 | | 0 |
| | | Positive | 67 | | 0 |
| <i>Yersinia enteritidis</i> | Ovoproduit | Positive | 12 | | 0 |
| | | Positive | 34 | | 0 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Ovoproduit | Positive | 28 | | 0 |
| | | Positive | 45 | | 0 |

TBX à 44°C

| Couleur des colonies | Nombre de colonies |
|----------------------|--------------------|
| bleu | 56 |
| bleu | 31 |

TBX à 44°C

| Couleur des colonies | Nombre de colonies |
|----------------------|--------------------|
| bleu | 63 |
| bleu | 55 |

TBX à 44°C

| Couleur des colonies | Nombre de colonies |
|----------------------|--------------------|
| bleu | 23 |
| bleu | 11 |

* très petites colonies

| Souche | Origine | PCA à 30°C | | REC2 à 44°C | |
|-------------------------|---------------------|------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| | | Culture | Nombre de colonies | Couleur des colonies | Nombre de colonies |
| <i>Escherichia coli</i> | Rognons de porc | Positive | 60 | violet | 65 |
| | | Positive | 74 | violet | 85 |
| <i>Escherichia coli</i> | Chou rouge | Positive | 47 | violet | 48 |
| | | Positive | 70 | violet | 82 |
| <i>Escherichia coli</i> | Persil | Positive | 89 | violet | 87 |
| | | Positive | 88 | violet | 88 |
| <i>Escherichia coli</i> | Pâtisserie | Positive | 123 | violet | 119 |
| | | Positive | 122 | violet | 128 |
| <i>Escherichia coli</i> | Crêpinette | Positive | 56 | violet | 49 |
| | | Positive | 106 | violet | 111 |
| <i>Escherichia coli</i> | Crêpinette | Positive | 111 | violet | 108 |
| | | Positive | 145 | violet | 139 |
| <i>Escherichia coli</i> | Chair à saucisse | Positive | 134 | violet | 130 |
| | | Positive | 98 | violet | 89 |
| <i>Escherichia coli</i> | Tomate | Positive | 87 | violet | 88 |
| | | Positive | 84 | violet | 89 |
| <i>Escherichia coli</i> | Céleri rémoulade | Positive | 79 | violet | 81 |
| | | Positive | 105 | violet | 115 |
| <i>Escherichia coli</i> | Crème vanille | Positive | 65 | violet | 60 |
| | | Positive | 126 | violet | 128 |
| <i>Escherichia coli</i> | Merguez | Positive | 143 | violet | 139 |
| | | Positive | 96 | violet | 90 |
| <i>Escherichia coli</i> | Foie de porc | Positive | 54 | violet | 60 |
| | | Positive | 107 | violet | 104 |
| <i>Escherichia coli</i> | Lait cru | Positive | 67 | violet | 66 |
| | | Positive | 122 | violet | 115 |
| <i>Escherichia coli</i> | Fromage au lait cru | Positive | 132 | violet | 123 |
| | | Positive | 141 | violet | 119 |
| <i>Escherichia coli</i> | Moules | Positive | 128 | violet | 134 |
| | | Positive | 109 | violet | 100 |
| <i>Escherichia coli</i> | Chair à saucisse | Positive | 76 | violet | 79 |
| | | Positive | 56 | violet | 67 |
| <i>Escherichia coli</i> | Carottes râpées | Positive | 97 | violet | 93 |
| | | Positive | 89 | violet | 89 |
| <i>Escherichia coli</i> | Pâtisserie | Positive | 104 | violet | 117 |
| | | Positive | 76 | violet | 70 |
| <i>Escherichia coli</i> | Chou à la crème | Positive | 57 | violet | 54 |
| | | Positive | 98 | violet | 97 |
| <i>Escherichia coli</i> | Crème pâtissière | Positive | 113 | violet | 118 |
| | | Positive | 73 | violet | 70 |
| <i>Escherichia coli</i> | Taboulé | Positive | 93 | violet | 95 |
| | | Positive | 91 | violet | 99 |
| <i>Escherichia coli</i> | Crème chantilly | Positive | 71 | violet | 65 |
| | | Positive | 107 | violet | 101 |
| <i>Escherichia coli</i> | Lardons | Positive | 132 | violet | 139 |
| | | Positive | 99 | violet | 95 |
| <i>Escherichia coli</i> | Saumon fumé | Positive | 96 | violet | 98 |
| | | Positive | 141 | violet | 135 |
| <i>Escherichia coli</i> | Filet de rouget | Positive | 153 | violet | 156 |
| | | Positive | 38 | violet | 40 |
| <i>Escherichia coli</i> | Sandwich | Positive | 49 | violet | 56 |
| | | Positive | 99 | violet | 100 |
| <i>Escherichia coli</i> | Pâtisserie | Positive | 100 | violet | 100 |
| | | Positive | 116 | violet | 121 |
| <i>Escherichia coli</i> | Foie de porc | Positive | 113 | violet | 119 |
| | | Positive | 125 | violet | 121 |
| <i>Escherichia coli</i> | Rognons de porc | Positive | 88 | violet | 84 |
| | | Positive | 94 | violet | 92 |
| <i>Escherichia coli</i> | Lait cru | Positive | 111 | violet | 109 |
| | | Positive | 114 | violet | 112 |