



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

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

**N° attestation : 3M – 01/01 – 09/89**

<b>Date de validation :</b>	<b>29.09.1989</b>
<b>Dates de reconduction :</b>	06.09.1993
	10.09.1997
	13.12.2001
	14.06.2005*
	<b>03.07.2009</b>
<b>Date d'extension :</b>	27.09.2007
<b>Fin de validité :</b>	<b>10.09.2013</b>

*\*Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la 4<sup>ème</sup> reconduction en 2005*

**La Société**      **3M Health Care**  
(siège social)    Microbiology products  
2501 Hudson Road  
Building 275 5W 05  
MN 55144 – IWO – St Paul – USA

**Distributeur**    **Laboratoires 3M Santé**  
Département Microbiologie  
Boulevard de l'Oise  
95029 Cergy-Pontoise Cedex  
France

**Site de production**    **3M Health Care**  
P.O. Box 227 – South Dakota, 57006 – Brookings – USA

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

**TEST 3M™ PETRIFILM™ FLORE TOTALE**

Référence du protocole : **34-8703-7875-8**

**DOMAINE D'APPLICATION**

1. Tous produits d'alimentation humaine (lecture à 72 heures).
2. Tous produits d'alimentation humaine hors produits laitiers et mollusques crus (lecture à 48 heures)

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Certaines souches (certaines bactéries lactiques ou certains microcoques) peuvent ne pas être détectées sur le test Petrifilm pour la numération de la Flore Totale Aérobie.

**METHODE(S) DE REFERENCE**

**NF EN ISO 4833 (2003)** : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes - Technique de comptage des colonies à 30° C.

  
**Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN**

## PRINCIPE DE LA METHODE

Le Test 3M™ Petrifilm Flore Totale est constitué d'une base gélifiante déshydratée soluble à froid, fixée entre un support en polyéthylène et une feuille en polypropylène.

Le gel contient les éléments constitutifs du PCA ainsi qu'un indicateur, le TTC (2,3,5 chlorure de triphényltetrazolium) qui facilite la lecture.

### Note (Historique de validation)

1/ **Etude de reconduction de 2005** : Depuis la précédente reconduction de validation (2001), la méthode de référence a évolué, impliquant l'utilisation de milieu PCA supplémenté en lait pour l'analyse des produits laitiers. En outre, le protocole de validation EN ISO 16140 a été mis en œuvre.

- L'étude comparative des méthodes été réalisée à nouveau selon le protocole EN ISO 16140 (étude de linéarité refaite et données d'exactitude provenant de plusieurs sources réexploitées).
- Les résultats antérieurs ont été conservés pour l'étude de spécificité et de praticabilité.
- Concernant l'étude interlaboratoire, les résultats antérieurs de 2001 ont été conservés et réexploités selon la norme EN ISO 16140.

2/ **L'étude d'extension présentée en septembre 2007**, dont les résultats sont intégrés dans la présente attestation, avait pour objet de réduire le temps d'incubation des tests 3M™ Petrifilm Flore Totale à 48 heures.

3/ **En juillet 2009**, le droit d'usage de la marque AFNOR Validation a été reconduit pour le kit 3M™ Petrifilm™ Flore Totale sans réalisation d'essais complémentaires, la méthode n'ayant pas été modifiée depuis la dernière reconduction, et la méthode de référence et le protocole de validation EN ISO 16140 restant inchangés.

## LINEARITE et EXACTITUDE relative

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

#### Etude de linéarité :

Pour la lecture à 72 heures, des essais ont été effectués en 2005 sur les 5 combinaisons produit alimentaire/souche et pour les catégories d'aliments figurant dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**, aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants :

- 10, 50, 100, 500, 1 000 UFC/g pour la catégorie « produits laitiers »,
- 100, 500, 1 000, 5 000, 10 000 UFC/g pour les autres catégories.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Pâté de porc / <i>Enterobacter agglomerans</i>	$Y = 1,20 X - 0,67$
Produits laitiers	Lait / <i>Staphylococcus aureus</i>	$Y = 1,03 X - 0,09$
Produits végétaux	Haricots verts / <i>Xanthomonas maltophilia</i>	$Y = 1,03 X - 0,15$
Produits de la pêche	Pavé de saumon / <i>Listeria seeligeri</i>	$X = 1,05 Y - 0,21$
Divers	Coule d'œuf / <i>Serratia liquefaciens</i>	$Y = 1,00 X + 0,02$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence})$

Lors de l'étude de reconduction de 2005, les lectures des tests 3M™ Petrifilm™ Flore Totale ont été effectuées après 48 heures et 72 heures d'incubation. Pour l'étude d'extension, les données obtenues après 48 heures d'incubation ont été interprétées.

Les essais ont été effectués sur les 4 combinaisons produit alimentaire/souche et pour les catégories d'aliments figurant dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**, aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants :

- 100, 500, 1 000, 5 000, 10 000 UFC/g

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Pâté de porc / <i>Enterobacter agglomerans</i>	$Y = 1,20 X - 0,70$
Produits de la pêche	Pavé de saumon / <i>Listeria seeligeri</i>	$Y = 1,05 X - 0,20$
Produits végétaux	Haricots verts / <i>Xanthomonas maltophilia</i>	$Y = 1,03 X - 0,15$
Divers	Coule d'œuf / <i>Serratia liquefaciens</i>	$Y = 1,04 X - 0,14$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence})$

### Etude d'exactitude :

Pour la lecture à 72 heures , des essais ont été effectués en 1992, donnant des résultats exploitables provenant de 73 produits végétaux et 59 produits carnés.

Des essais ont été effectués en 1998, donnant des résultats exploitables provenant de 21 produits carnés, 16 produits de la mer, 13 ovoproduits et pâtisseries et 11 produits végétaux.

Des essais complémentaires ont été effectués en 2005, donnant des résultats exploitables provenant de 3 produits de la mer et 3 ovoproduits.

L'étude comparative sur 20 produits laitiers repose sur l'exploitation des résultats externes obtenus par Pitton et Grappin en 1991 (J. Assoc. Anal. Chem., 74, 92-103) avec un protocole réalisé sur la norme FIL 100B, équivalent à celui de la norme ISO 4833 pour les produits laitiers.

L'exploitation statistique a porté au total sur 219 résultats interprétables provenant d'échantillons naturellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, produits végétaux, produits de la pêche, divers (ovoproduits et pâtisseries)

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

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	de 2 à 7,855 log UFC/g
Produits laitiers	de 3,74 à 5,81 log UFC/g
Produits végétaux	de 1,95 à 10,48 log UFC/g
Produits de la pêche	de 3,73 à 8,12 log UFC/g
Ovoproduits	de 1,45 à 5,30 log UFC/g

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,999 X + 0,029$$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence})$

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

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode alternative est de **0,147**.  
La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de **0,176**.

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) est le suivant :  
**p = 0,026** si l'on prend la médiane  
**ou D = 0,026** si l'on prend la moyenne des biais individuels.

**Pour la lecture à 48 heures**, des essais ont été effectués en 2007. L'exploitation statistique a porté sur 66 résultats interprétables provenant d'échantillons naturellement contaminés appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, ovoproduits et pâtisseries, produits végétaux et produits de la pêche.

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

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	3,45 à 7,86 UFC/g
Ovoproduits et pâtisseries	1,30 à 6,79 UFC/g
Produits végétaux	1,60 à 7,26 UFC/g
Produits de la pêche	2,90 à 7,42 UFC/g

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 1,030 X - 0,242$$

Y = log(N méthode alternative)  
X = log(N méthode de référence)

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

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode alternative est de 0,161  
La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de 0,117

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) est le suivant :  
p = 0,005 si l'on prend la médiane

#### **Conclusion pour la linéarité et l'exactitude relative :**

Pour la lecture à 72 heures et à 48 heures, les études de linéarité et d'exactitude montrent que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence, avec un meilleur recouvrement par la méthode alternative.

## SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE) Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

L'étude a été réalisée en 1997

20 souches choisies parmi les espèces les plus couramment rencontrées (aérobies strictes, aéroanaérobies, bactéries lactiques...) ont été inoculées en double sur Petrifilm et sur gélose PCA (en inclusion) :

- 2 souches (*Shewanella putrefaciens* et *Photobacterium phosphoreum*) se sont développées sur Petrifilm, mais pas sur PCA.
- une souche de *Micrococcus luteus* s'est développée sur PCA, mais pas sur Petrifilm
- une souche de *Lactobacillus casei rhamnosus* s'est développée en donnant un dénombrement inférieur d'une unité logarithmique sur Petrifilm par rapport au PCA.

## PRATICABILITE Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
  - L'obtention des résultats **positifs et négatifs** se fait en 72 heures avec les deux méthodes (référence et alternative)
  - L'obtention des résultats **négatifs et positifs** se fait en 48 heures avec la méthode alternative contre 72 heures avec la méthode de référence.
- **Formation du personnel :** la durée d'entraînement de l'opérateur est de ½ journée
- **Autres critères :**
  - Flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser : le même temps est nécessaire pour grande série ou petite série
  - Bonne intégration de la technique dans l'organisation du laboratoire
  - Degré de qualification de l'opérateur : technicien de même niveau que pour la méthode de référence
  - Etapes communes avec la méthode de référence : prélèvement, préparation de la suspension mère et dilutions décimales
  - Principal atout : gain de temps, gain de place à l'étape d'incubation, facilité de manipulation, gestion facilitée des déchets.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2001 avec 15 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait cru, naturellement contaminés. Le lait cru était dilué dans du lait UHT de façon à obtenir les 4 niveaux de contamination suivants :

- 3 à 4 log UFC/g
- 4 à 5 log UFC/g
- 5 à 6 log UFC/g
- 6 à 7 log UFC/g

Les laboratoires ont testé, par chacune des **deux méthodes**, **deux réplicats par niveau** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Niveau de contamination	Nombre d'échantillons exploités	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
Niveau 1	30	0,132	0,765	0,161	0,571	0,23
Niveau 2	30	0,191	0,829	0,308	0,847	0,37
Niveau 3	30	0,323	0,612	0,235	0,528	0,44
Niveau 4	30	0,264	0,710	0,220	0,477	0,27

### **Conclusion**

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

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

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire  
sur le site [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)