



**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 – 01/02 – 09/89 A

| | |
|-------------------------|------------|
| Date de validation : | 29.09.1989 |
| Dates de reconduction*: | 06.09.1993 |
| | 09.06.1998 |
| | 16.05.2002 |
| | 16.06.2006 |
| | 01.04.2010 |
| Fin de validité : | 09.06.2014 |

**le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la 4ème reconduction en 2006*

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

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™ COLIFORMES

Application à la numération des coliformes totaux par lecture du nombre total de colonies

Référence du protocole : 34-8705-6227-8

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine à l'exception des coquillages crus.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF ISO 4832 (Juillet 2006) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes - Méthode par comptage des colonies.

Le Directeur Général Délégué
Jacques **BESLIN**

AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00
certification@afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test Petrifilm Coliformes est un milieu prêt à l'emploi pour le dénombrement des coliformes. Le Test Petrifilm Coliformes contient les éléments constitutifs du milieu VRBL (bile, cristal violet, rouge neutre) ainsi qu'un indicateur au tétrazolium permettant le dénombrement des coliformes.

Après 24h ± 2h d'incubation à 30°C ± 1°C (cas de l'utilisation validée par la présente attestation), les coliformes gazogènes apparaissent sous forme de colonies rouges associées à des bulles de gaz et les coliformes non gazogènes apparaissent sous forme de colonies rouges non associées à des bulles de gaz.

Important : Le test Petrifilm Coliformes peut être utilisé à 30°C et à 37°C. L'attention de l'utilisateur est attirée sur le fait que les résultats obtenus à 30°C n'ont pas obligatoirement la même signification que ceux obtenus à 37°C. La marque AFNOR Validation est accordée à la méthode pour une utilisation à 30°C et à 37°C, mais l'étude de validation a été réalisée uniquement à 30°C.

NOTE

Les résultats des études de praticabilité, de spécificité et d'exactitude (obtenus en 1997) ont été interprétés selon le nouveau référentiel de validation NF EN ISO 16140. L'étude de linéarité a été effectuée en 2006 selon ce référentiel.

Lors de l'étude de **reconduction de 2010**, les résultats de l'étude interlaboratoire obtenus en 2006 ont été réinterprétés selon les modalités décrites dans le projet d'amendement 1 de la norme EN ISO 16140 (prA1 2009). Les nouveaux résultats sont disponibles dans la présente attestation. La méthode alternative n'a pas été modifiée depuis la dernière validation, et la méthode de référence reste inchangée.

LINEARITE et EXACTITUDE relative

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

Etude de linéarité :

Des essais ont été effectués en 2006 sur les 5 combinaisons produit alimentaire/souche et dans 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, 50 000 UFC/g.

Les résultats obtenus sont les suivants :

| Catégorie d'aliments | Couple matrice/souche | Droite de régression |
|----------------------------|--|-----------------------|
| Produits carnés | Boeuf haché / <i>Enterobacter cloacae</i> | $Y = 1,060 X - 0,260$ |
| Produits laitiers | Lait / <i>Enterobacter sakazakii</i> | $Y = 1,023 X - 0,012$ |
| Ovoproduits et pâtisseries | Coule d'œuf / <i>Klebsiella pneumoniae</i> | $Y = 0,939 X + 0,194$ |
| Produits végétaux | Petits pois / <i>Escherichia coli</i> | $Y = 1,056 X - 0,187$ |
| Produits de la mer | Poisson cru / <i>Escherichia coli</i> | $Y = 0,973 X + 0,065$ |

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

Etude d'exactitude :

Les essais effectués en 1997 ont été exploités selon la norme EN ISO 16140. L'exploitation statistique a porté sur 147 résultats interprétables provenant tous d'échantillons naturellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, ovoproduits et pâtisseries, produits végétaux, produits de la mer.

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 | 1,00 à 7,70 |
| Produits laitiers | 1,00 à 7,56 |
| Ovoproduits et pâtisseries | 1,30 à 6,57 |
| Produits végétaux | 1,00 à 6,15 |
| Produits de la mer | 1,30 à 5,76 |

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

$$\text{Equation de la droite : } X = 0,987 Y + 0,209$$

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 0,188.

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de 0,232.

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) est le suivant :

$p = 0,10$ si l'on prend la médiane ou $D = 0,17$ si on prend la moyenne des biais individuels.

Conclusion pour la linéarité et l'exactitude relative :

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.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE) - (études 1997 et 2006)

- 30 souches pures de coliformes ont été testées : ces 30 souches se sont développées en donnant des colonies caractéristiques à la fois sur le Test Petrifilm Coliformes et sur gélose VRBL.
- 20 souches non coliformes ont également été testées. Les discordances suivantes ont été notées :
 - 5 souches appartenant aux espèces *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Edwardsiella tarda* montrent une croissance faible sur le Test Petrifilm Coliformes et aucune croissance sur gélose VRBL.
 - 2 souches appartenant aux espèces *Providencia rettgeri* et *Providencia stuartii* montrent une croissance sur gélose VRBL, et des microcolonies non dénombrables sur le Test Petrifilm Coliformes.

Conclusion

Vis à vis des coliformes, la spécificité du Petrifilm coliformes est équivalente à celle du VRBL. La sélectivité est satisfaisante, mais peut cependant présenter de légères discordances.

PRATICABILITE

- Le délai d'obtention des résultats est le même que pour la méthode de référence en milieu solide, à savoir 24 heures.
- Le Petrifilm Coliformes est une méthode facile à mettre en œuvre et plus pratique que la méthode de référence car le milieu est prêt à l'emploi, le gain de place à l'incubation est important et la gestion des déchets facilitée.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de *E. coli* aux 4 niveaux suivants :

- niveau 0
- 10 – 100 UFC/ml
- 100 – 1 000 UFC/ml
- 1 000 – 10 000 UFC/ml

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

Les résultats, calculés conformément au projet d'amendement 1 de la norme EN ISO 16140 : 2003 (version prA1 :2009), sont les suivants :

| Niveau de contamination | Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables* | Méthode de référence | | Méthode alternative | | Biais |
|-------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------|
| | | Ecart type de Répétabilité S_r | Ecart type de Reproductibilité S_R | Ecart type de Répétabilité S_r | Ecart type de Reproductibilité S_R | |
| Niveau 1 | 12 | 0,0545 | 0,0887 | 0,0611 | 0,0651 | 0,0342 |
| Niveau 2 | 12 | 0,0301 | 0,0860 | 0,0266 | 0,0631 | -0,0662 |
| Niveau 3 | 12 | 0,0665 | 0,1086 | 0,0699 | 0,1105 | -0,0938 |

**Un laboratoire n'a pas respecté les délais d'analyse. Un autre laboratoire n'a pas respecté le protocole d'analyse. Leurs résultats n'ont pas été exploités.*

Note : Limite de répétabilité $r = 2,8 S_r$, avec S_r écart-type de répétabilité
 Limite de reproductibilité $R = 2,8 S_R$, avec S_R écart-type de reproductibilité

Conclusion

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

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