



**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 B

Date de validation : 29.09.1989
Dates de reconduction* : 06.09.1993
09.06.1998
16.05.2002
09.12.2005*
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 2005

La Société (siège social) **3M Health Care**
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 avec lecture du nombre de colonies gazogènes

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

En présence d'un nombre important de coliformes non gazogènes, une dilution supérieure pourra être nécessaire afin de pouvoir dénombrer les coliformes gazogènes tout en respectant la plage de lecture recommandée.

METHODE DE REFERENCE

NF ISO 4831 (Octobre 2006) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des coliformes - Technique du nombre le plus probable

**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 consiste en un milieu pour les coliformes contenant 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. C'est le nombre de colonie gazogènes qui est pris en compte pour la présente validation.

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 2005 selon ce référentiel. Enfin, les résultats des études interlaboratoires de 1997 et 2002 pour le dénombrement des coliformes gazogènes ont été repris, ils avaient été interprétés selon le référentiel Validation AFNOR (révision 7).

Une seule norme est disponible en tant que méthode de référence pour le dénombrement des coliformes gazogènes : la norme NF EN ISO 4831. Son principe est basé sur la détermination du Nombre le Plus Probable, principe générant des intervalles de confiance spécifiques et déterminés autour du résultat. Le test 3M™ Petrifilm™ Coliformes pour le dénombrement des coliformes gazogènes est basé quant à lui sur le principe de dénombrement des colonies.

Ainsi, lors de l'étude de **reconduction en 2010**, l'étude interlaboratoire qui implique l'analyse d'échantillons artificiellement contaminés, a été menée en comparant les résultats du test 3M™ Petrifilm™ Coliformes à ceux obtenus par la méthode ISO 4832, basée également sur le principe de dénombrement des colonies. Les résultats ont été réinterprétés selon les modalités décrites dans le projet d'amendement 1 de la norme EN ISO 16140 (prA1 2009). La méthode alternative n'a pas subi de modifications 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 2005 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> | X = 1,088 Y – 0,335 |
| Produits laitiers | Lait / <i>Enterobacter sakazakii</i> | X = 0,865 Y – 0,677 |
| Ovoproduits et pâtisseries | Coule d'œuf / <i>Klebsiellia pneumoniae</i> | X = 1, 245 Y – 0,672 |
| Produits végétaux | Petits pois / <i>Escherichia coli</i> | Y = 1,077 X – 0,432 |
| Produits de la mer | Poisson cru / <i>Escherichia coli</i> | X = 1,033 Y+ 0,094 |

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 NF EN ISO 16140. L'exploitation statistique a porté sur 129 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 la **méthode alternative** et **en simple** par la **méthode de référence**.

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

| Catégorie d'aliments | Domaine de contamination (log)* |
|----------------------------|---------------------------------|
| Produits carnés | 0,56 à 5,97 |
| Produits laitiers | 1,00 à 5,04 |
| Ovoproduits et pâtisseries | 0,46 à 6,16 |
| Produits végétaux | 0,63 à 6,04 |
| Produits de la mer | 0,95 à 5,66 |

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,9642 X - 0,0087$$

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

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

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 **0,365** (méthode de référence non réalisée en double)

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

$d = -0,22$ si l'on prend la médiane ou $D = -0,130$ 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)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Etude 1997 :

- Sur 21 souches pures de coliformes testées, 14 souches se sont développées sur le Petrifilm Coliformes en donnant des colonies caractéristiques gazogènes. Des discordances concernant le caractère gazogène ont été observées sur 7 souches (*Citrobacter freundii*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*). Néanmoins, l'expression du caractère gazogène peut manquer de reproductibilité par l'une ou l'autre méthode. Pour *Citrobacter freundii*, le caractère gazogène n'a jamais été observé sur test Petrifilm.
- Sur 16 souches non coliformes testées, aucune divergence notable n'a été observée entre le Petrifilm Coliformes et la méthode NPP concernant le caractère gazogène.

Etude complémentaire 2005 :

- Sur 12 souches de coliformes testées, 3 souches ne produisent pas de gaz sur Petrifilm ni sur BLBVB (*Citrobacter diversus*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii*).
- Sur 4 souches non coliformes testées, aucune réaction croisée n'a été observée.

Conclusion

La sélectivité du Test Petrifilm Coliformes avec lecture du caractère gazogène vis à vis des souches non coliformes est bonne.

La spécificité du Test Petrifilm est satisfaisante. Cependant, un manque de reproductibilité de la production de gaz a pu être observé sur Petrifilm et/ou en tubes pour certaines souches.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**

Le délai d'obtention des résultats est de 24 heures par le test Petrifilm coliformes.

Ce délai est de 24h par la méthode de référence en milieu solide, et de 48 heures à 96 heures par la méthode de référence en milieu liquide.

- **Autres critères :** le test Petrifilm coliformes permet :

- Une mise en œuvre facile et plus pratique que la méthode de référence car le milieu est prêt à l'emploi.
- Un gain de temps de manipulation.
- Une gestion facilitée des déchets.
- Un gain de place à l'incubation.

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 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