



**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 – 01/2 – 09/89 C

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 4<sup>ème</sup> 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 thermotolérants avec lecture du nombre total de colonies

Référence du protocole : 34-8705-6227-8

**DOMAINE D'APPLICATION**

Tous produits d'alimentation humaine.

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune.

**METHODE DE REFERENCE**

**NF V08-060** (avril 2009) : Microbiologie des aliments - Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 °C.

**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](mailto:certification@afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://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 colonies.

Après 24h ± 2h d'incubation à 44°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.

## 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>	$Y = 0,930 X + 0,463$
Produits laitiers	Lait / <i>Enterobacter sakazakii</i>	$Y = 1,081 X - 0,202$
Ovoproduits et pâtisseries	Coule d'œuf / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	$Y = 0,922 X + 0,267$
Produits végétaux	Petits pois / <i>Escherichia coli</i>	$Y = 0,950 X + 0,025$
Produits de la mer	Poisson cru / <i>Escherichia coli</i>	$Y = 0,987 X + 0,069$

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 et complétés en 2006. L'exploitation statistique a porté sur 60 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 2,99
Produits laitiers	1,48 à 7,30
Ovoproduits et pâtisseries	1,48 à 3,74
Produits végétaux	1,30 à 4,08
Produits de la mer	1,00 à 3,74

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

$$\text{Equation de la droite : } X = 0,994 Y - 0,061$$

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 **0,360**.

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de **0,440**.

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

$p = -0,01$  si l'on prend la médiane ou  $D = 0,14$  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**

L'étude a été réalisée selon la norme V08-017 avec une incubation du VRBL à  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

- Sur 24 souches de coliformes thermotolérants (définis comme se développant sur VRBL à  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) testées, 24 souches se sont développées.
- Sur 36 souches non coliformes ou coliformes non thermotolérants testées, 6 souches se développent sur Petrifilm : *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* (2 souches), *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enteritidis*. *Salmonella enteritidis* se développe également sur milieu VRBL à  $44,5^{\circ}\text{C}$ .

#### **Etude 2006**

L'étude a été réalisée selon la norme V08-060 avec une incubation du VRBL à  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

- Sept souches cibles ont été testées en double par la méthode de référence et le Petrifilm Coliformes. Les sept souches donnent des colonies caractéristiques sur le Petrifilm Coliformes et sur VRBL.
- Six souches qui s'étaient développées sur le Petrifilm Coliformes et pas sur gélose VRBL incubée à  $44,5^{\circ}\text{C}$  ont été retestées avec une incubation du VRBL à  $44^{\circ}\text{C}$ . Elles se sont développées à la fois sur Petrifilm Coliformes et sur le milieu VRBL (incubé à  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

#### **Conclusion**

L'inclusivité /exclusivité est similaire entre la méthode Petrifilm Coliformes et la méthode NF V08-060.

## PRATICABILITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 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 oeuvre et plus pratique que la méthode de référence car le milieu est prêt à l'emploi, offre un gain de place à l'incubation et permet une gestion facilitée des déchets.

## 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	0,0558	0,1659	0,0575	0,0766	0,0612
Niveau 2	12	0,0773	0,1075	0,0587	0,0635	-0,0780
Niveau 3	12	0,0977	0,1174	0,0907	0,1109	-0,1248

\* 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](http://www.afnor-validation.org)