



**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 01/5 -03/97 B

Date de validation :	18.03.1997
Date de 1 ^{ère} reconduction:	13.12.2001
Date de 2 ^{ème} reconduction*	19.09.2005
Date de 3 ^{ème} reconduction :	28.11.2008
Fin de validité :	18.03.2013

** Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la 2^{ème} reconduction*

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™ RAPIDE COLIFORMES
Numération des coliformes totaux en 24 heures

Référence du protocole : 34-8702-8710-8

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Dilution insuffisante.

METHODE DE REFERENCE

NF ISO 4832 (2006) – Directives générales pour le dénombrement des coliformes - Méthode par comptage des colonies (VRBL).

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

PRINCIPE DE LA METHODE

Le Test 3M™ PETRIFILM™ RAPIDE COLIFORMES consiste en un milieu pour les coliformes contenant un indicateur de pH qui permet de détecter la production d'acide, et un indicateur rouge de tétrazolium qui facilite la lecture.

Au cours du métabolisme, les coliformes produisent de l'acide ou du gaz à partir du lactose. Tandis que les colonies grossissent et produisent de l'acide, l'indicateur de pH vire du rouge orangé au jaune. La zone d'acidification peut apparaître avant les colonies. Le gaz est piégé autour des colonies de coliformes et permet ainsi la détection des coliformes gazogènes. La numération à 24 heures de tous les coliformes se fait en comptant toutes les colonies rouges avec ou sans gaz.

HISTORIQUE DE VALIDATION

NOTE 1

La mise en œuvre du protocole EN ISO 16140 a été réalisée lors de la reconduction de 2006. Certains résultats obtenus lors des études précédentes ont été conservés en vue de leur réexploitation, ce sont les suivants :

- Exactitude relative : résultats obtenus en 1997 par le laboratoire expert et résultats obtenus en 1996 par un laboratoire extérieur (pris en compte dans le cadre de la Validation AFNOR)
- Praticabilité : données de 1997
- Sélectivité : données de 1997
- Etude interlaboratoire : réexploitation des résultats obtenus en 1997 sur la matrice lait.

La validation a porté sur les 2 protocoles suivants :

- Produits de charcuterie et produits de la mer (incubation à 30°C)
- Autres produits (incubation à 35°C)

NOTE 2

En novembre 2008, la validation du Test 3M™ PETRIFILM™ RAPIDE COLIFORMES a été reconduite. Aucune modification n'ayant été apportée à la méthode depuis la précédente validation, aucun test complémentaire n'a été effectué.

LINEARITE et EXACTITUDE relative

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

Etude de linéarité (étude 1996/97 et 2005) :

Des essais ont été effectués en 1996 sur 3 catégories d'aliments (produits laitiers, produits végétaux, plats cuisinés) contaminés artificiellement par trois souches (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*) aux quatre niveaux de contamination suivants : 0, 100 à 1000, 1000 à 10 000, 10 000 à 100 000 UFC/g.

Les échantillons ont été analysés en double par la méthode alternative et en simple par la méthode de référence, aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants : 100, 500, 1000, 5000, 10 000 UFC/g

L'interprétation des résultats précédemment obtenus figure ci-après :

Catégorie d'aliment	Droite de régression
Produits laitiers	$Y = 0,96 X + 0,19$
Plats cuisinés	$Y = 0,98 X + 0,11$
Végétaux	$Y = 0,95 X + 0,19$

L'étude a été complétée en 2005 par des essais sur les 3 combinaisons produit alimentaire/souche et dans les catégories d'aliments figurant dans le tableau ci-dessous. Les catégories charcuterie et poissons ont été testées à part afin de tenir compte du protocole particulier applicable (incubation à 30°C)

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**, aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants : 100, 500, 1000, 5000, 10 000 UFC/g.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Charcuterie	Jambon blanc / <i>Enterobacter cloacae</i>	$Y = 1,03 X - 0,24$
Produits carnés	Viande hachée / <i>Citrobacter freundii</i>	$Y = 1,05 X - 0,16$
Produits de la mer	Poisson / <i>Escherichia coli</i>	$Y = 0,98 X + 0,12$

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

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

Etude d'exactitude (étude 1996/97 et 2005):

Des essais ont été effectués en 1996 et 2005. L'exploitation statistique a porté sur 108 résultats interprétables provenant d'échantillons naturellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments figurant dans le tableau suivant :

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	2,30 à 5,56
produits laitiers	1,30 à 8,15
produits de la mer	1,88 à 5,32
produits végétaux	2,40 à 7,94
ovoproduits	2,78 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 :

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,96 X + 0,18$$

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

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

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

Les limites de répétabilité (en log) obtenues pour la méthode alternative et la méthode de référence sont les suivantes :

Méthode alternative	Méthode de référence
$r = 0,210$	$r = 0,235$

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

$$D = -0,025$$

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) – étude 1997

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 20 souches de coliformes ont été détectées sur 20 testées.
- sur 17 souches non coliformes, 8 souches se sont développées sur Petrifilm. Elles appartiennent aux espèces suivantes : *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Salmonella spp* (4 souches). De même, 5 souches se sont développées sur milieu VRBL par la méthode NF EN ISO 4832 ; elles appartiennent aux espèces suivantes : *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*.

PRATICABILITE (étude 1997)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats** : l'obtention des résultats **positifs** et **négatifs** se fait en 24 heures avec la méthode alternative comme avec la méthode de référence.
- **Autres critères** : gain d'espace, gain de temps de préparation des milieux, gestion facilitée des déchets

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 1997 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Enterobacter cloacae* aux 4 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau 10 à 100 log UFC/g
- niveau 100 à 1000 log UFC/g
- niveau 1000 à 10 000 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 log UFC/g	Nombre de laboratoires avec des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
10 à 100	11	0,117	0,217	0,264	0,220	-0,04
100 à 1000	11	0,235	0,300	0,205	0,221	-0,02
1000 à 10 000	11	0,294	0,332	0,235	0,230	0,01

* Un laboratoire a reçu les échantillons à une température supérieure à 8°C et ses résultats n'ont pas été exploités

Conclusion

L'étude interlaboratoire montre que les résultats obtenus par la méthode alternative sont comparables à ceux obtenus par 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