



**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 C**

Date de validation :	18.03.1997
Date de 1 <sup>ère</sup> reconduction :	13.12.2001
Date de 2 <sup>ème</sup> reconduction* :	04.05.2006
Date de 3 <sup>ème</sup> reconduction :	28.11.2008
Fin de validité :	18.03.2013

*\* le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la deuxième 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™ RAPIDE COLIFORMES**  
Numération des coliformes gazogènes en 24 heures

Référence du protocole : 34-8702-8710-8

**DOMAINE D'APPLICATION**

Tous produits d'alimentation humaine (sauf produits de charcuterie).

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Dilution insuffisante.

**METHODES DE REFERENCE**

- **NF EN ISO 4831** (2006) – Directives générales pour le dénombrement des coliformes – Technique du nombre le plus probable
- **NF EN ISO 4832** (2006) – Directives générales pour le dénombrement des coliformes - Méthode par comptage des colonies (VRBL)

**Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN**

**AFNOR Certification**

## 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. Pour la numération à 24 heures, les coliformes gazogènes apparaissent comme des colonies rouges entourées de bulles de 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 marque AFNOR Validation)
- 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 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

**Note :** La norme **NF EN ISO 4832** a été prise en référence pour l'étude de **linéarité**.

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 Petrifilm RCC pour le dénombrement des coliformes gazogènes est basé quant à lui sur le principe de dénombrement des colonies.

Aussi, lors de l'étude comparative des méthodes de référence et du test Petrifilm RCC pour le dénombrement des coliformes gazogènes, l'étude de linéarité a été menée en comparant les résultats du test Petrifilm RCC à ceux obtenus par la méthode **NF EN ISO 4832**, basée également sur le principe de dénombrement des colonies. L'étude de linéarité étant effectuée en analysant uniquement des produits **artificiellement contaminés** dont les taux d'inoculation sont déterminés, il apparaissait préférable de réaliser les tests de linéarité avec des méthodes basées sur des **principes équivalents**. La **limite de répétabilité** de la méthode **NF EN ISO 4831** a été déterminée au cours de l'étude **d'exactitude** pour deux catégories et au cours de l'**étude interlaboratoire**, permettant ainsi de ponctuer les conclusions de l'étude d'exactitude effectuée par l'analyse d'échantillons naturellement contaminés.

### Etude de linéarité (études 1996/1997 et 2006) :

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 analyses ont été réalisées **en double** pour le Petrifilm RCC et **en simple** par la méthode **NF EN ISO 4831**.

L'interprétation des résultats obtenus en 1996, figure ci-après :

$$\log(N \text{ méthode de référence}) = 1,00 \log(N \text{ méthode alternative}) + 0,16$$

L'étude comparative a été complétée en **2006** par rapport à la norme **NF EN ISO 4832**. Les échantillons ont été contaminés artificiellement par 2 souches (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*) aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants : 100, 500, 1000, 5000, 10 000 UFC/g.

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

Une interprétation statistique des données acquises en 1996 a été réalisée selon la norme NF EN ISO 16140 pour les 3 premières catégories du tableau ci-dessous. Pour les 2 nouvelles catégories testées, l'interprétation statistique a été réalisée aussi selon la norme EN ISO 16140.

Les droites de régression suivantes ont été obtenues par catégorie testée (avec indication de la souche pour les deux catégories testées en 2006) :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits laitiers	lait pasteurisé	$Y = 0,971 + 0,145 X$
Divers	plat cuisiné	$Y = 1,001 + 0,050 X$
Produits végétaux	pommes de terre	$Y = 0,966 + 0,098 X$
Produits de la mer	Poisson / <i>Escherichia coli</i>	$Y = 0,967 + 0,151 X$
Produits carnés	Viande hachée / <i>Citrobacter freundii</i>	$Y = 1,053 - 0,185 X$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

### Etude d'exactitude (études 1996/1997 et 2006) :

Des essais ont été effectués en 1996 et 2005. L'exploitation statistique a porté sur 65 résultats interprétables provenant d'échantillons naturellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes figurant dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons ont été analysés **en double** par la méthode Petrifilm RCC et **en simple** par la méthode **NF EN ISO 4831**.

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
produits carnés	1,36 à 5,04
produits laitiers	0,97 à 4,41
produits de la mer	1,63 à 4,63
produits végétaux	1,38 à 6,32
ovoproduits	1,63 à 5,04

**Note** : une valeur aberrante a été obtenue dans la catégorie ovoproduits pour la méthode de référence. L'interprétation a été réalisée en supprimant l'échantillon concerné.

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,811 + 0,542 X$$

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 interlaboratoire (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.

Concernant les données de 1996 pour lesquelles la méthode de référence avait été réalisée en simple, la répétabilité de cette dernière n'est pas disponible pour toutes les catégories. Les limites de répétabilité ont été déterminées en 2006 pour les catégories produits de la mer et produits carnés, et sont les suivantes :

	Méthode alternative	Méthode de référence
Produits carnés	r = 0,293	r = 0,795
Produits de la mer	r = 0,323	r = 0,998

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) est compris **entre -0,183 et 0,1 log UFC/g**.

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

Les tests statistiques valident la corrélation entre les deux méthodes pour les catégories : produits laitiers, ovoproduits, produits végétaux et divers.

Certaines discordances observées pour les catégories produits de la mer et produits carnés sont imputables aux limites de répétabilité de 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, mais 8 souches ne produisaient pas de gaz sur Petrifilm après 24 heures (ces souches appartenaient aux espèces suivantes : *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter Cloacae*, *Hafnia alvei*, *Serratia lignefactors*). Cependant, ces 8 souches ne produisent pas non plus de gaz en BLBVB et ne seraient pas détectées non plus par la méthode de référence.
- l'étude de 17 souches non coliformes a mis en évidence la présence de réactions croisées avec deux souches de *Aeromonas hydrophila*.

#### **Conclusion**

La spécificité du Test 3M™ PETRIFILM™ RAPIDE COLIFORMES avec une lecture des colonies gazogènes à 24 heures est équivalente à celle de la méthode de référence.

### **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 au lieu de 48-96 heures avec la méthode de référence pour un résultat positif.
- **Autres critères :** gain d'espace et gain de temps de préparation des milieux, gestion facilitée des déchets.

## ETUDE INTERLABORATOIRE (1997)

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, interprétés selon la norme NF EN ISO 16140, 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	1,507	1,266	0,221	0,249	-0,16
100 à 1000	11	0,983	0,830	0,264	0,262	-0,12
1000 à 10 000	9	1,111	1,09	0,235	0,235	-0,05

\* Un laboratoire a reçu les échantillons à une température supérieure à 8°C et deux laboratoires n'ont pas réalisé de dilutions suffisantes pour obtenir un résultat précis au niveau de contamination supérieur. Leurs résultats n'ont pas été exploités.

### 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)