



**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 – 01/6 – 09/97

Date de validation :	10.09.1997
Dates de reconduction*:	13.12.2001 14.06.2005* 03.07.2009
Date d'extension :	01.04.2010
Fin de validité :	10.09.2013

**Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la 2^{ème} reconduction en 2005*

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
France

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™ ENTEROBACTERIACEAE

Référence du protocole : 34-8703-7876-6

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et produits d'alimentation animale.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Dans le cadre de la marque AFNOR Validation, les dénombrements doivent être effectués à partir des Petrifilm sur lesquels on compte au maximum 100 colonies.

METHODE DE REFERENCE

NF ISO 21528-2 (2004) : Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae*. Partie 2 : 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 3M™ PETRIFILM™ ENTEROBACTERIACEAE est un milieu de culture prêt à l'emploi, qui contient, comme éléments nutritifs, du VRBG (bile, cristal violet, rouge neutre et glucose), un agent gélifiant soluble dans l'eau froide et un indicateur au tétrazolium facilitant la lecture. Les entérobactéries qui sont des bactéries fermentant le glucose, apparaissent comme des colonies rouges entourées d'une zone jaune et/ou comme des colonies rouges associées à des bulles de gaz et/ou comme des colonies rouges entourées d'une zone jaune et associées à des bulles de gaz.

L'utilisation validée par la présente attestation est de 24 heures ± 2 heures d'incubation. La marque AFNOR Validation est accordée pour une utilisation à 30°C, à 35°C et à 37°C, mais l'étude de validation a été réalisée à 37°C uniquement.

NOTE (historique de validation)

1) En 2005, une étude de **reconduction** a été réalisée selon la méthode de référence NF EN ISO 21528-2 (2004). Depuis la précédente reconduction de validation accordée en 2001, la méthode de référence a changé et le protocole de validation EN ISO 16140 a été mise en œuvre :

- L'étude comparative des méthodes a été réalisée à nouveau selon le protocole EN ISO 16140 (étude de linéarité refaite et données d'exactitude de 1997 réexploitées).
- Les résultats antérieurs ont été conservés pour l'étude de spécificité et de praticabilité.
- Concernant l'étude interlaboratoire, les résultats antérieurs de 2001 ont été conservés et réexploités selon la norme EN ISO 16140.

2) En juillet 2009, la **reconduction** de la méthode 3M™ Petrifilm™ ENTEROBACTERIACEAE a été validée sans réalisation d'essais complémentaires, la méthode n'ayant pas été modifiée depuis la dernière reconduction, et la méthode de référence et le protocole de validation (EN ISO 16140) restant inchangés.

3) En avril 2010, une étude d'**extension**, objet de la présente attestation, a permis d'étendre le champ d'application à l'analyse des « produits d'alimentation animale ». L'étude comparative a été réalisée en testant cette nouvelle catégorie. Les résultats de linéarité et d'exactitude ont été satisfaisants. En tenant compte de ces nouvelles données, les résultats « toutes catégories confondues » ont été recalculés.

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 et en 2010 sur les 6 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 :

- 10, 50, 100, 500, 1 000 UFC/g pour la catégorie « produits laitiers »,
- 100, 500, 1 000, 5 000, 50 000 UFC/g pour la catégorie « produits d'alimentation animale »
- 100, 500, 1 000, 5 000, 10 000 UFC/g pour les autres catégories.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Pâté de porc / <i>Enterobacter agglomerans</i>	$Y = 0,96 X + 0,16$
Produits laitiers	Lait / <i>Hafnia alvei</i>	$Y = 0,87 X + 0,31$
Produits végétaux	Haricots verts / <i>Citrobacter freundii</i>	$X = 1,01 Y - 0,04$
Produits de la pêche	Pavé de saumon / <i>Klebsiella oxytoca</i>	$Y = 1,04 X - 0,23$
Divers	Coule d'œuf / <i>Serratia liquefaciens</i>	$Y = 1,03 X - 0,14$
Alimentation animale	Croquettes pour chat / <i>Escherichia coli</i>	$Y = 1,092 X - 0,327$

Y = log(N méthode alternative)
X = log(N méthode de référence)

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 1997. L'exploitation statistique a porté sur 86 résultats interprétables provenant d'échantillons naturellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : Produits carnés, produits laitiers, produits végétaux, produits de la pêche, divers.

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	de 1,50 à 5,82 log UFC/g
produits laitiers	de 1,15 à 7,91 log UFC/g
produits végétaux	de 1,57 à 4,80 log UFC/g
produits de la pêche	de 1,00 à 5,39 log UFC/g
Divers	de 1,00 à 5,00 log UFC/g
Produits d'alimentation animale	de 1,65 à 6,04 log UFC/g

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,960 X + 0,387$$

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 0,264.
La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de 0,294.

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) est le suivant :
p = 0,190 si l'on prend la médiane
ou D = 0,259 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, avec un meilleur recouvrement des *Enterobacteriaceae* par la méthode alternative.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- Une étude de spécificité a été menée avec 64 souches cibles et 45 souches non cibles, en comparant les résultats obtenus par la méthode Petrifilm Entérobactéries à ceux obtenus par la méthode de référence ISO 7402. Tous les résultats étaient concordants entre les deux méthodes. Notez que deux souches de *Yersinia pseudotuberculosis* ne se sont pas développées ni sur PEB, ni sur VRBG.
- L'étude a été complétée en 1997 avec :
 - 22 souches d'*Enterobacteriaceae* ont été détectées sur 23 testées. La souche non reconnue par le Petrifilm est une souche d'*Erwinia carotovora* CIP 103762, qui n'a pas été reconnue non plus par la méthode de référence NF ISO 7402 : 1993. (Une autre souche d'*Erwinia carotovora* a été reconnue par le Petrifilm et pas par la méthode de référence NF ISO 7402 : 1993).

- Sur 13 souches n'appartenant pas aux *Enterobacteriaceae* : 2 souches d'*Aeromonas* et une souche de *Xanthomonas* se sont développées en donnant des colonies caractéristiques sur Petrifilm et sur VRBG.

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 contre 72 heures avec la méthode de référence.
- **Formation du personnel** : la durée d'entraînement de l'opérateur est de ½ journée
- **Autres critères** :
 - Flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser : le même temps est nécessaire pour grande série ou petite série.
 - Bonne intégration de la technique dans l'organisation du laboratoire.
 - Degré de qualification de l'opérateur : technicien de même niveau que pour la méthode de référence.
 - Etapes communes avec la méthode de référence : broyage et dilution.
 - Principal atout : gain de temps, gain de place à l'étape d'incubation, facilité de manipulation, gestion facilitée des déchets.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2001 avec 15 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *E. coli* aux 4 niveaux suivants : niveau 0, de 10^2 à 10^3 UFC/g, de 10^3 à 10^4 UFC/g, de 10^4 à 10^5 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	Nombre d'échantillons exploités*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
$10^2 - 10^3$	28	0,205	0,411	0,294	0,294	-0,06
$10^3 - 10^4$	28	0,117	0,393	0,325	0,353	0,04
$10^4 - 10^5$	28	0,176	0,325	0,235	0,329	0,03

* La réception tardive des échantillons par un laboratoire n'a pas permis d'exploiter ses résultats.

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