



**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 – 01/07 – 03/99

Date de validation :	23.03.1999
Dates de reconduction*:	02.04.2003 24.05.2007*
	03.02.2011
Fin de validité :	23.03.2015

**Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de l'étude de reconduction de 2007*

La Société **3M Health Care**
(siège social) Microbiology products
2501 Hudson Road
Building 275 5W 05
MN 55144 - IWO - St Paul - USA

Représentée par **3M FRANCE**
Boulevard de l'Oise
95006 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 **NF VALIDATION** pour la méthode alternative quantitative d'analyse ci-dessous :

3M™ Petrifilm™ Haute Sensibilité Coliformes
Application au dénombrement des coliformes totaux gazogènes

Référence du protocole : 34-8704-4239-8

DOMAINE D'APPLICATION : Tous produits d'alimentation humaine

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : Aucune

METHODES DE REFERENCE :

NF ISO 4831 (2006) : Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des coliformes – Technique du nombre le plus probable.

NF EN ISO 4832 (2006) : Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes – Méthode par comptage des colonies.

Directrice Générale
Florence MÉAUX



PRINCIPE DE LA METHODE

Le test 3M™ Petrifilm™ Haute Sensibilité pour la numération des coliformes (HSCC) est un système prêt à l'emploi, contenant un gel déshydraté soluble à froid, à l'intérieur duquel se trouvent les éléments constitutifs du milieu VRBL. Un indicateur coloré (sel de tétrazolium) colore en rouge toutes les colonies présentes sur le système 3M™ Petrifilm™ Haute Sensibilité. Le gaz produit par les coliformes gazogènes est piégé, ce qui permet de les dénombrer en comptant les colonies rouges entourées de bulles de gaz.

Le PHSCC permet l'inoculation de 5 ml de suspension au lieu de 1 ml seulement pour les autres systèmes 3M™ Petrifilm™ de la gamme, d'où une meilleure sensibilité.

NOTE

L'étude comparative des méthodes et l'étude interlaboratoire de reconduction de 2007 ont été réalisées selon la norme EN ISO 16140 et comparativement aux méthodes de référence ISO 4831 et EN ISO 4832 pour l'étude comparative des méthodes et EN ISO 4832 pour l'étude interlaboratoire. Les résultats de cette étude sont présentés ci-après.

Les résultats des études d'exactitude de 1998 et 1999 et d'inclusivité/exclusivité de 1999 ont été conservés, interprétés selon la norme EN ISO 16140 et complétés.

La validation de la méthode a été reconduite en février 2011. La méthode HSCC et les méthodes de référence restent inchangées. Les données de l'étude interlaboratoire de 2007 ont été réinterprétées selon la norme EN ISO 16140/PrA1 (2009), les résultats étant présentés dans cette attestation.

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 2007 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 :

50 – 100 UFC/g
 100 – 500 UFC/g
 500 – 1 000 UFC/g
 1 000 – 5 000 UFC/g
 5 000 – 10 000 UFC/g

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite régression / ISO 4831*	Droite régression / ISO 4832*
Produits carnés	Steak haché / <i>Enterobacter cloacae</i>	$X = 0,860 Y + 0,167$	$Y = 0,934 X + 0,385$
Végétaux et divers	Poivron vert / <i>Escherichia coli</i>	$X = 1,075 Y - 0,984$	$Y = 0,938 X + 0,259$
Produits de la mer	Filet de cabillaud / <i>Escherichia coli</i>	$X = 0,918 Y + 0,255$	$Y = 1,004 X + 0,186$
Produits laitiers	Lait / <i>Cronobacter sakazaki</i>	$X = 0,951 Y + 0,114$	$X = 0,939 Y - 0,072$
Ovoproduits	Coule d'œuf / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	$X = 0,978 Y - 0,087$	$X = 1,070 Y - 0,212$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

*Le choix de l'abscisse et de l'ordonnée dépend du type de régression retenu

Etude d'exactitude (en comparaison à la norme ISO 4831) :

Les résultats obtenus lors des études de 1998 et 1999 ont été interprétés selon la norme EN ISO 16140.

Des essais complémentaires ont été effectués en 2007, par l'analyse d'échantillons artificiellement contaminés pour les catégories Ovoproduits et Produits carnés.

L'exploitation statistique a porté sur 104 résultats interprétables provenant de 83 échantillons naturellement contaminés et 21 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : Produits carnés, végétaux et divers, produits laitiers, produits de la mer et ovoproduits.

Les échantillons ont été analysés **en double par la méthode alternative et la méthode de référence ISO 4831.**

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	0,56 à 5,16
Produits laitiers	0,60 à 3,63
Produits de la mer	-0,04 à 4,38
Ovoproduits	-0,04 à 4,91
Végétaux et divers	0,18 à 3,87

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,975 X + 0,291$$

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 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 **0,323**.

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence (EN ISO 4831) est de **0,895***.

**Calcul effectué sur la base des données de 2007, avec l'analyse de produits issus des catégories produits carnés et ovoproduits*

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

D = 0,255

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 œuvre de la méthode alternative seulement

L'étude de 1999 a été complétée en 2007. Au final, les résultats obtenus sont les suivants :

- 33 souches de coliformes totaux gazogènes ont été détectées sur 33 testées. La souche non reconnue est une souche d'*Enterobacter cloacae* (cette souche a été utilisée dans l'étude d'exactitude relative pour l'inoculation de produits carnés ; elle a montré des colonies gazogènes en test 3M™ Petrifilm™ Haute Sensibilité Coliformes et a produit du gaz par la méthode ISO 4831 uniquement pour un échantillon inoculé sur 3 testés).
- L'étude de 31 souches non coliformes totaux gazogènes n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- Délai d'obtention des résultats :

- L'obtention des résultats **positifs** se fait en un jour avec la méthode alternative contre deux à quatre jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en un jour avec la méthode alternative contre deux à quatre jours avec la méthode de référence, selon le cas.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Escherichia coli* aux 4 niveaux suivants :

- 0 UFC/ml
- 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 obtenus, 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 avec résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		Biais
		Ecart type de Répétabilité S_r ref.	Ecart type de Reproductibilité S_R ref.	Ecart type de Répétabilité S_r alt.	Ecart type de Reproductibilité S_R alt.	
Niveau 1	11	0,046	0,091	0,090	0,189	- 0,0571
Niveau 2	11	0,043	0,066	0,069	0,086	- 0,0290
Niveau 3	11	0,048	0,091	0,054	0,065	- 0,0124

* Un laboratoire a été exclu pour avoir incubé les boîtes et les tests 3M™ Petrifilm™ à 44°C

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