



**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 – 01/09 – 04/03 B

**Date de validation : 02.04.2003
Date de reconduction : 27.09.2007*
03.02.2011
Fin de validité : 02.04.2015**

** Le protocole EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2007 pour l'étude préliminaire et l'étude interlaboratoire de reconduction*

La Société **3M Health Care**
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 :

SYSTEME 3M™ PETRIFILM™ STAPH EXPRESS (STX)

Référence du protocole : 34-8704-4956-7

DOMAINE D'APPLICATION : Tous produits d'alimentation humaine et aliments pour animaux de compagnie

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : Aucune

METHODE DE REFERENCE : **NF EN ISO 6888-2 (1999) et son amendement A1 (2003)** – Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) - Partie 2 : technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène - Amendement 1 : inclusion des données de fidélité

**Directrice Générale
Florence MÉAUX**



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

www.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le système 3M™ Petrifilm™ Staph Express (STX) est composé d'un milieu de culture prêt à l'emploi ainsi que d'un disque pour test Petrifilm™ Staph Express (STX).

Le milieu de culture, prêt à l'emploi, contient un agent gélifiant soluble dans l'eau froide. C'est un milieu chromogène, dérivé du milieu Baird-Parker, sélectif et différentiel pour les *Staphylococcus* à coagulase positive.

Le disque pour test Petrifilm™ Staph Express (STX) contient un système de détection au bleu d'O-toluidine qui facilite l'observation des réactions de désoxyribonucléase (DNase).

La marque NF VALIDATION est accordée pour une incubation à 37°C pendant 24 h ± 2 h pour le système Petrifilm™ Staph Express (STX) avec une incubation à 37°C pendant 3 h pour le disque.

Note (Historique de validation)

La méthode 3M™ Petrifilm™ Staph Express (STX) est validée sous le numéro d'attestation 3M 01/09 – 04/03 A depuis avril 2003, pour l'alimentation humaine, par comparaison à la méthode de référence EN ISO 6888-1 (1999). La validation de la méthode a été reconduite en septembre 2007 selon cette norme de référence et son amendement de 2004. La méthode a en parallèle été validée par rapport à la norme de référence NF EN ISO 6888-2 : 1999 (technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène), et son amendement de 2003, objet de la présente attestation n° 3M 01/09 – 04/03 B.

La validation de la méthode Petrifilm STX a été reconduite en février 2011. La méthode alternative et la méthode de référence restent inchangées. Les données de l'étude interlaboratoire de 2007 ont été réinterprétées selon la norme EN ISO 16140/PrA1 (2009), et sont 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 :

- 100 à 500 UFC/g
- 500 à 1 000 UFC/g
- 1 000 à 5 000 UFC/g
- 5 000 à 10 000 UFC/g
- 10 000 à 100 000 UFC/g

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Viande hachée / <i>Staphylococcus aureus</i>	$Y = 0,9958 X - 0,0945$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Staphylococcus aureus</i>	$Y = 1,0306 X - 0,1781$
Produits de la mer	Filet de poisson cru / <i>Staphylococcus aureus</i>	$Y = 0,9885 X + 0,0529$
Produits végétaux	Carottes râpées / <i>Staphylococcus aureus</i>	$Y = 1,0418 X - 0,1828$
Alimentation animale	Pâté pour chien / <i>Staphylococcus aureus</i>	$Y = 1,0789 X - 0,3991$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative en UFC/g})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence en UFC/g})$

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2007. L'exploitation statistique a porté sur 95 résultats interprétables provenant de 81 échantillons naturellement contaminés et 14 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

- Produits carnés
- Produits laitiers
- Produits de la mer
- Pâtisseries et ovoproduits
- Produits de la mer
- Alimentation animale

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 (logN)
Produits carnés	1,00 – 4,36
Produits laitiers	1,48 – 4,85
Produits de la mer	1,00 – 3,96
Produits végétaux	1,00 – 5,56
Pâtisseries - ovoproduits	2,10 – 4,70
Alimentation animale	1,00 – 5,63

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,979 X - 0,083$$

Y = log(N méthode alternative en UFC/g)

X = log(N méthode de référence en UFC/g)

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 UFC/g) obtenue pour la méthode alternative est de **0,23**.

La limite de répétabilité (en log UFC/g) obtenue pour la méthode de référence est de **0,22**.

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

p = - 0,13 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 œuvre de la méthode alternative seulement

En 2003, la spécificité a été réalisée sur 22 souches de *Staphylococcus aureus* et 11 souches autres que *Staphylococcus aureus*. En 2007, la spécificité a été complétée avec des souches de *S.aureus* et des souches autres que *S.aureus*.

Au final (en tenant compte des résultats de 2003 et de 2007) :

- 35 souches de *Staphylococcus* à coagulase positive ont été détectées sur 35 testées:
 - 22 *Staphylococcus aureus* en 2003 et 6 *Staphylococcus aureus* en 2007,
 - 1 *Staphylococcus hyicus* en 2003 et 4 *Staphylococcus hyicus* en 2007
 - 1 *Staphylococcus intermedius* en 2003 et 1 *Staphylococcus intermedius* en 2007
- L'étude de 26 souches **non cibles** (15 souches de *Staphylococcus* autres que *Staphylococcus* à coagulase positive et 11 souches non *Staphylococcus*) 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 1 jour avec la méthode alternative contre 1 à 2 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 2 jours avec la méthode de référence.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Staphylococcus aureus* à coagulase positive aux 4 niveaux suivants :

- <10 UFC/mL (niveau 0)
- 100 UFC/mL
- 1 000 UFC/mL
- 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 des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Ecart type de Répétabilité S_r	Ecart type de Reproductibilité S_R	Ecart type de Répétabilité S_r	Ecart type de Reproductibilité S_R	Biais
Niveau 1	11	0,050	0,097	0,134	0,192	-0,15
Niveau 2	11	0,036	0,049	0,054	0,079	-0,10
Niveau 3	11	0,024	0,082	0,054	0,143	-0,12

* Un laboratoire a été exclu de l'exploitation des résultats car la température des échantillons après réception était supérieure à 8°C et un laboratoire n'a pas respecté le protocole de la méthode de référence pour un des deux réplicats du niveau 2.

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