



**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, pour l'étude préliminaire
- LE REFERENTIEL EXIGENCES AFNOR - Rev 7, pour l'étude collaborative

N° attestation : 3M 01/02 – 09/89 B

Date de validation : 29.09.1989
Dates de reconduction*: 06.09.1993
 09.06.1998
 16.05.2002
 09.12.2005*
Fin de validité : 09.06.2010

** Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la 4^{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

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™ COLIFORMES

Application à la numération des coliformes totaux avec lecture du nombre de colonies gazogènes

Référence du protocole : **38-9018-1244-6**

DOMAINE D'APPLICATION: tous produits d'alimentation humaine à l'exception des coquillages crus.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

En présence d'un nombre important de coliformes non gazogènes, une dilution supérieure pourra être nécessaire afin de pouvoir dénombrer les coliformes gazogènes tout en respectant la plage de lecture recommandée.

METHODE DE REFERENCE

NF ISO 4831 (juillet 1991) : Directives générales pour le dénombrement des coliformes – Technique du nombre le plus probable (indice de classement V08-016).

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

AFAQ AFNOR Certification

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
 Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France
 Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40
certification@afaq.afnor.org - www.afnor.fr

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test Petrifilm Coliformes consiste en un milieu pour les coliformes contenant les éléments constitutifs du milieu VRBL (bile, cristal violet, rouge neutre) ainsi qu'un indicateur au tétrazolium permettant le dénombrement des coliformes.

Après 24h ± 2h d'incubation à 30°C ± 1°C (cas de l'utilisation validée par la présente attestation), les coliformes gazogènes apparaissent sous forme de colonies rouges associées à des bulles de gaz et les coliformes non gazogènes apparaissent sous forme de colonies rouges non associées à des bulles de gaz. C'est le nombre de colonie gazogènes qui est pris en compte pour la présente validation.

NOTE

Les résultats des études de praticabilité, de spécificité et d'exactitude (obtenus en 1997) ont été interprétés selon le nouveau référentiel de validation NF EN ISO 16140.

L'étude de linéarité a été effectuée en 2005 selon ce référentiel.

Enfin, les résultats des études interlaboratoires de 1997 et 2002 pour le dénombrement des coliformes gazogènes ont été repris, ils avaient été interprétés selon le référentiel Validation AFNOR (révision 7).

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 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, 500, 1 000, 5 000, 50 000 UFC/g.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Boeuf haché / <i>Enterobacter cloacae</i>	$X = 1,088 Y - 0,335$
Produits laitiers	Lait / <i>Enterobacter sakazakii</i>	$X = 0,865 Y - 0,677$
Ovoproduits et pâtisseries	Coule d'œuf / <i>Klebsiellia pneumoniae</i>	$X = 1,245 Y - 0,672$
Produits végétaux	Petits pois / <i>Escherichia coli</i>	$Y = 1,077 X - 0,432$
Produits de la mer	Poisson cru / <i>Escherichia coli</i>	$X = 1,033 Y + 0,094$

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

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

Etude d'exactitude :

Les essais effectués en 1997 ont été exploités selon la norme NF EN ISO 16140. L'exploitation statistique a porté sur 129 résultats interprétables provenant tous d'échantillons naturellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, ovoproduits et pâtisseries, produits végétaux, produits de la mer.

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

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)*
Produits carnés	0,56 à 5,97
Produits laitiers	1,00 à 5,04
Ovoproduits et pâtisseries	0,46 à 6,16
Produits végétaux	0,63 à 6,04
Produits de la mer	0,95 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 :

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,9642 X - 0,0087$$

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 **0,365** (méthode de référence non réalisée en double)

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

d = - 0,22 si l'on prend la médiane ou **D = - 0,130** 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 oeuvre de la méthode alternative seulement

Etude 1997 :

- Sur 21 souches pures de coliformes testées, 14 souches se sont développées sur le Petrifilm Coliformes en donnant des colonies caractéristiques gazogènes. Des discordances concernant le caractère gazogène ont été observées sur 7 souches (*Citrobacter freundii*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*). Néanmoins, l'expression du caractère gazogène peut manquer de reproductibilité par l'une ou l'autre méthode. Pour *Citrobacter freundii*, le caractère gazogène n'a jamais été observé sur test Petrifilm.
- Sur 16 souches non coliformes testées, aucune divergence notable n'a été observée entre le Petrifilm Coliformes et la méthode NPP concernant le caractère gazogène.

Etude complémentaire 2005 :

- Sur 12 souches de coliformes testées, 3 souches ne produisent pas de gaz sur Petrifilm ni sur BLBVB (*Citrobacter diversus*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii*).
- Sur 4 souches non coliformes testées, aucune réaction croisée n'a été observée.

Conclusion

La sélectivité du Test Petrifilm Coliformes avec lecture du caractère gazogène vis à vis des souches non coliformes est bonne.

La spécificité du Test Petrifilm est satisfaisante. Cependant, un manque de reproductibilité de la production de gaz a pu être observé sur Petrifilm et/ou en tubes pour certaines souches.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**

Le délai d'obtention des résultats est de 24 heures par le test Petrifilm coliformes.

Ce délai est de 24h par la méthode de référence en milieu solide, et de 48 heures à 96 heures par la méthode de référence en milieu liquide.

- **Autres critères :** le test Petrifilm coliformes permet :

- Une mise en œuvre facile et plus pratique que la méthode de référence car le milieu est prêt à l'emploi.
- Un gain de temps de manipulation.
- Une gestion facilitée des déchets.
- Un gain de place à l'incubation.

FIDELITE (études 1997 et 2002)

Etudes réalisées selon les exigences de la Validation AFNOR - révision 7

Les données de fidélité ont été déterminées au cours d'essais effectués en 1997 et 2002, comprenant plusieurs laboratoires. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé contaminés artificiellement avec une souche de *E. coli*, aux 4 niveaux suivants : 0 ; 10-100 ; 100-1000 ; 1000-10000 UFC/ml.

Les laboratoires ont testé 2 échantillons pour chaque niveau de contamination.

Répétabilité

La différence entre 2 résultats individuels obtenus sur une matière identique naturellement contaminée, soumise à l'essai avec le même appareillage dans l'intervalle de temps le plus court est la suivante ne dépassera pas la valeur de répétabilité *r* en moyenne plus d'une fois sur 20 lors de l'application normale et correcte de la méthode.

Reproductibilité

La différence entre les résultats individuels obtenus sur une matière identique soumise à essai dans 2 laboratoires ne dépassera pas la valeur de reproductibilité *R* en moyenne plus d'une fois sur 20 lors de l'application normale et correcte de la méthode.

Année de l'étude	Nombre de laboratoires	<i>r</i> (log)	<i>R</i> (log)
1997	12	0,12 < <i>r</i> < 0,20	0,22 < <i>R</i> < 0,29
2002	11	0,14 < <i>r</i> < 0,28	0,29 < <i>R</i> < 0,45

Conclusion

La méthode Petrifilm Coliformes est répétable et reproductible.

Il est souhaitable d'adresser à AFAQ AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition
un document de synthèse des études préliminaire et collaborative