

**LABORATOIRES 3M SANTE**

Boulevard de l'Oise

95029 CERGY PONTOISE Cedex

**Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse**  
*Application à la microbiologie alimentaire*

**Rapport de synthèse**

**Reconduction de la validation ISO 16140  
de la méthode 3M™ Petrifilm™ pour  
la numération de la flore totale  
dans les produits alimentaires**

Ce rapport comprend 31 pages dont 2 annexes.

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence du laboratoire pour les seuls essais couverts par l'accréditation qui sont identifiés par le symbole♦.

**Synthèse Reconduction Flore Totale**  
**Version 0 (6 juillet 2009)**

**ADRIA DEVELOPPEMENT**

# Sommaire

<b>1</b>	<b>RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE</b>	<b>4</b>
1.1	Date de la première validation et date de reconduction	4
1.2	Protocole et principe de la méthode alternative	4
1.3	Méthode de référence à laquelle la méthode alternative a été comparée	5
1.4	Notice à jour, ainsi que toutes les précédentes notices ayant été en vigueur depuis la précédente validation ou reconduction	5
1.5	Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale	6
1.5.1	<i>Etude comparative des méthodes</i>	6
1.5.2	<i>Etude interlaboratoire</i>	22
1.5.3	<i>Conclusion</i>	25
1.6	Bilan des modifications intervenues dans la méthode alternative, ayant donné lieu ou non à une extension de validation	26
<b>2</b>	<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>27</b>
□	<i>Annexe 1- Résultats de l'exactitude relative</i>	28
□	<i>Annexe 2 - Liste des laboratoires collaborateurs</i>	31

## Avant Propos

L'ensemble des renseignements permettant de valider la garantie des analyses est tenu à la disposition de la Société 3M.

Les résultats sont synthétisés au sein de tableaux et interprétés selon la norme NF EN ISO 16140.

<b>Fabricant :</b>	<b>Laboratoires 3M Santé</b> Boulevard de l'Oise 95029 CERGY PONTOISE Cedex
<b>Laboratoire expert :</b>	<b>ADRIA Développement</b> ZA Creac'h Gwen 29196 QUIMPER Cedex
<b>Méthode à valider :</b>	<b>Reconduction de la validation du test 3M™ Petrifilm™ Flore Totale pour le dénombrement de la flore aérobie mésophile</b>
<b>Référentiel de validation :</b>	Norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : Microbiologie des aliments – Protocole pour la validation des méthodes alternatives
<b>Méthode de référence* :</b>	Norme NF ISO 4833 (février 2003) : Directives générales - Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes - Méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C
<b>Etendue de la validation :</b>	<b>Tous produits d'alimentation humaine pour une incubation 72h</b> <b><u>Tous produits d'alimentation humaine à l'exception des produits laitiers et des mollusques crus pour une incubation à 48 heures</u></b>

---

\* Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

# 1 RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE

---

## 1.1 Date de la première validation et date de reconduction

Le Test 3M™ Petrifilm™ Flore totale a été validé le 29 septembre 1989 (n° attestation 3M-01/1-09/89) pour le lait cru. Des extensions ont été obtenues pour :

- le beurre le 24/09/92 (n° attestation 3M01/1-09/92),
- les végétaux et préparations de végétaux crus prêts à l'emploi le 24/09/92 (n° attestation 3M01/1-09B/92),
- le lait pasteurisé le 24/11/92 (n° attestation 3M01/1-11/92),
- les produits carnés le 28/01/93 (n° attestation 3M01/1-01/93).

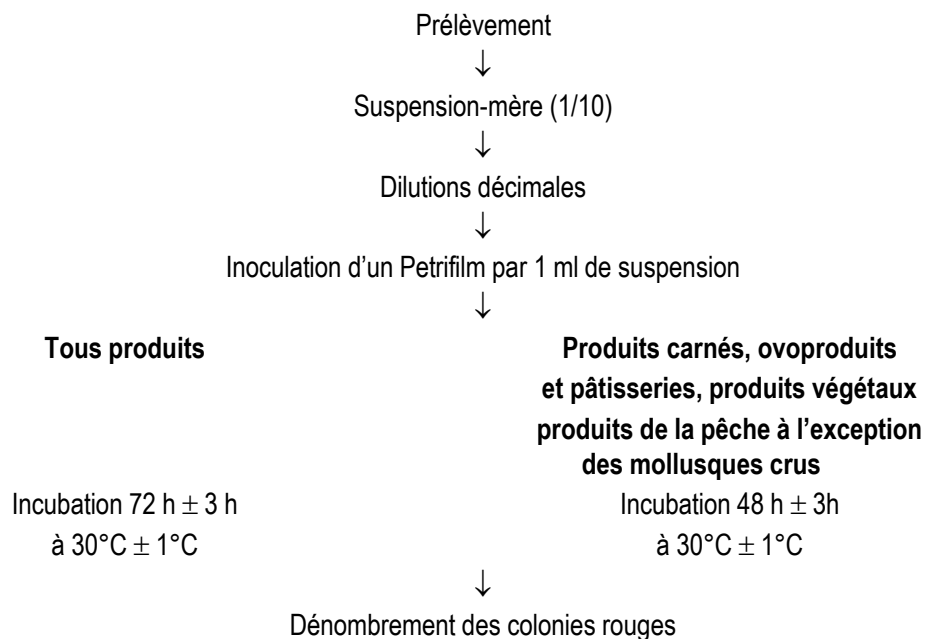
La reconduction a été obtenue pour tous produits d'alimentation humaine le 06/09/93 (n° attestation 3M01/1-09/89), le 10/09/97 et le 13/12/2001.

La reconduction de la validation ISO 16140 du test 3M™ Petrifilm™ Flore Totale a été obtenue le 14 juin 2005 (n° attestation 3M – 01/1 – 09/89). L'incubation des tests 3M™ Petrifilm™ Flore Totale est alors de 72h. Une extension a été réalisée avec une incubation des tests 3M™ Petrifilm™ Flore Totale pendant 48 heures. Cette dernière a été validée le 20 septembre 2007.

**La validation expire le 10 septembre 2009.**

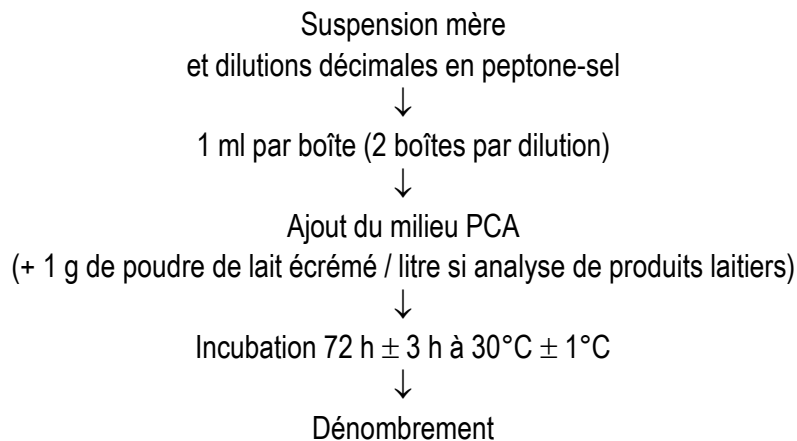
## 1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

Le Petrifilm Flore Totale permet le dénombrement de la flore aérobie mésophile. Le test est constitué d'une base gélifiante déshydratée soluble à froid contenant les éléments constitutifs du PCA, ainsi qu'un indicateur, le TTC (2,3,5 chlorure de triphényltétrazolium) facilitant la lecture. Le protocole est présenté ci-après :



### 1.3 Méthode de référence à laquelle la méthode alternative a été comparée

La méthode de référence utilisée est la méthode NF ISO 4833 (février 2003) présentée ci-après :



### 1.4 Notice à jour, ainsi que toutes les précédentes notices ayant été en vigueur depuis la précédente validation ou reconduction

Aucun changement dans la notice depuis la dernière validation.

## 1.5 Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale

### 1.5.1 Etude comparative des méthodes

#### 1.5.1.1 Etude de linéarité

Lors de l'étude de reconduction, les lectures des Petrifilms Flore Totale ont été effectuées après 48h et 72h d'incubation. Les données obtenues avec 48h d'incubation ont été interprétées.

#### □ **Protocole**

Cinq couples (catégorie / souche) ont été analysés à cinq niveaux de contamination, de façon à couvrir la gamme de contamination habituellement rencontrée. Deux répétitions ont été réalisées par échantillon. Les produits ont été analysés à la fois par la méthode alternative et la méthode de référence.

Les matrices suivantes ont été testées :

- pâté de porc, inoculé par *Enterobacter agglomerans* 72, isolée de bœuf bourguignon,
- haricots verts, inoculés par *Xanthomonas maltophilia* 11.2, isolée de plante,
- **lait, inoculé par *Staphylococcus aureus* 501, isolé de lait cru (uniquement incubation 72 h)**
- plat cuisiné à base de poisson, inoculé par *Listeria seeligeri* BR1, isolée de truite,
- coule d'œuf, inoculée par *Serratia liquefaciens* 26, isolée d'ovoproduits.

#### □ **Résultats**

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie sont donnés figure 1 et les droites de régression figure 2.

Un récapitulatif des données statistiques est donné dans le tableau 1.

**Tableau 1 - Récapitulatif des données statistiques  
de l'étude de linéarité**

Incubation 48 h							
Matrice	R	Régression utilisée	Rob. F	Valeur critique	P %	Coefficient de corrélation	Equation de la droite de régression
Pâté de porc	1,25	GMFR	22,266	5,41	0	0,987	Log Alt = 1,203 log Réf. - 0,695
Pavé de saumon	3,33	GMFR	2,414	5,41	18	0,996	Log Alt = 1,050 log Réf. - 0,201
Haricots verts	1,67	GMFR	1,926	5,41	24	0,999	Log Alt = 1,031 log Réf. - 0,147
Coule d'œuf	0,80	GMFR	35,201	5,41	0	0,996	Log Alt = 1,041 log Réf. - 0,135

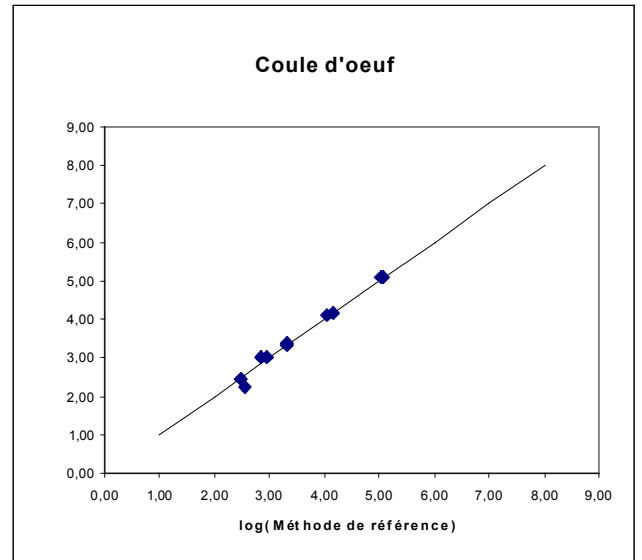
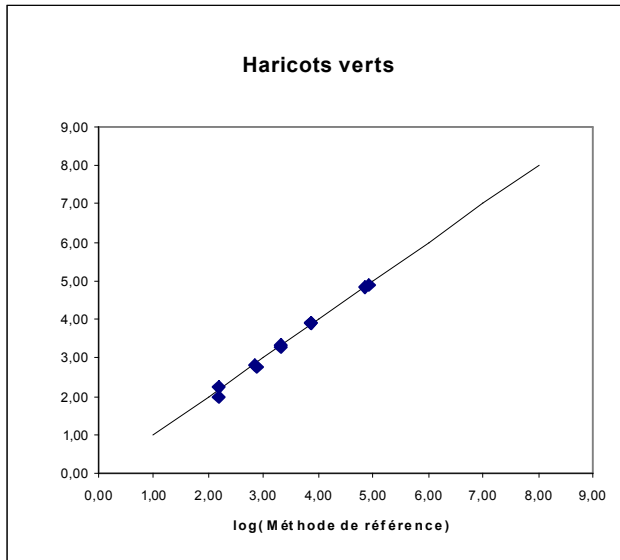
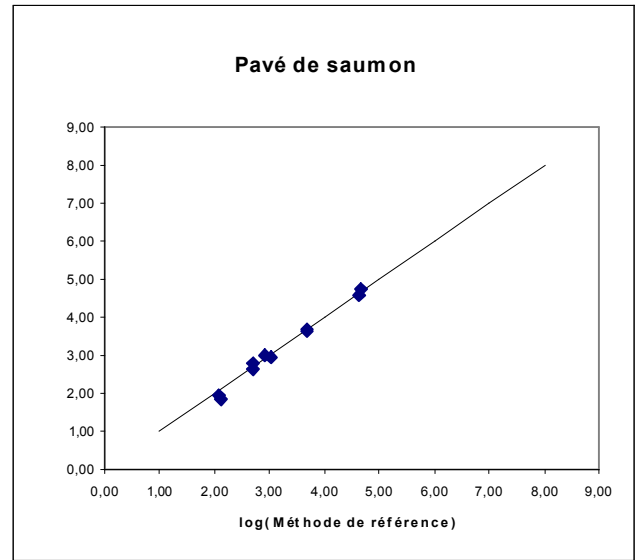
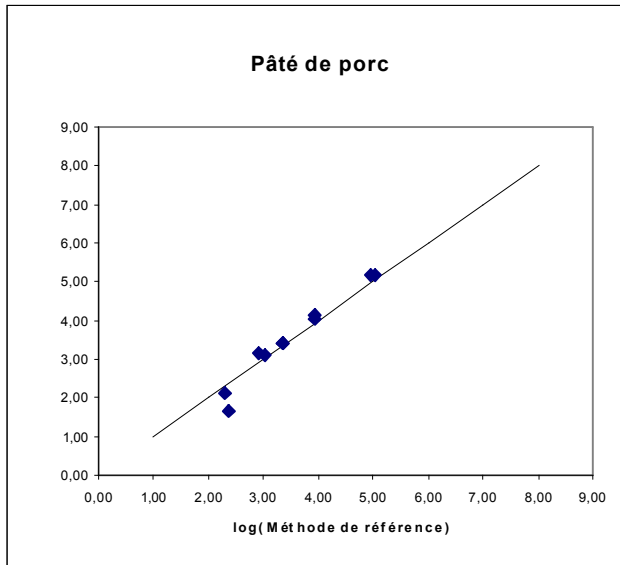
Incubation 72 h							
Matrice	R	Régression utilisée	Rob. F	Valeur critique	P %	Coefficient de corrélation	Equation de la droite de régression
Pâté de porc	1,25	GMFR	22,98	5,41	0	0,987	Log Alt = - 0,67 + 1,20 log Réf
Lait	0,75	GMFR	7,895	5,41	2	0,999	Log Alt=-0,09 + 1,03 log Réf
Pavé de saumon	3,33	OLS1	2,454	5,41	18	0,998	Log Alt = - 0,21 + 1,05 log Réf.
Haricots verts	1,67	GMFR	2,125	5,41	24	0,999	Log Alt = - 0,15 + 1,03 log Réf.
Coule d'œuf	1,20	GMFR	0,000	5,41	100	1,000	Log Alt = 0,02 + 1,00 log Réf.

***Interprétation statistique :***

P > 5 %	:	pas significatif	1 % < P < 5 %	:	significatif
0,1 % < P < 1 %	:	très significatif	P < 0,1 %	:	hyper significatif

Figure 1 - Linéarité : graphiques bidimensionnels

48 h



72 h

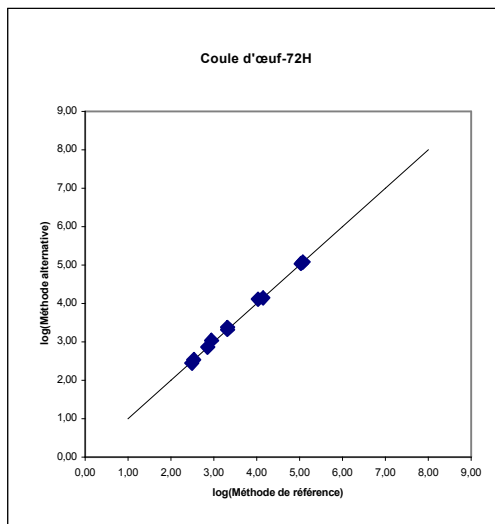
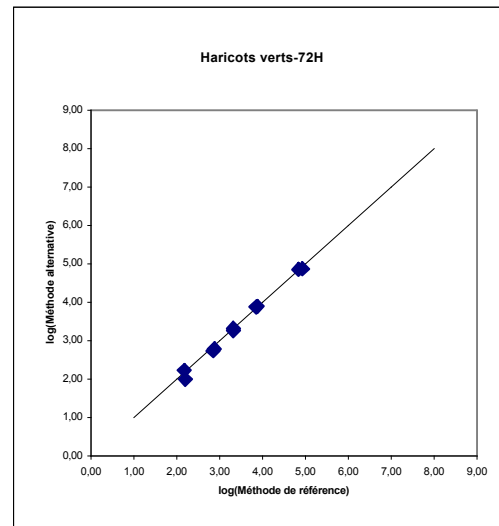
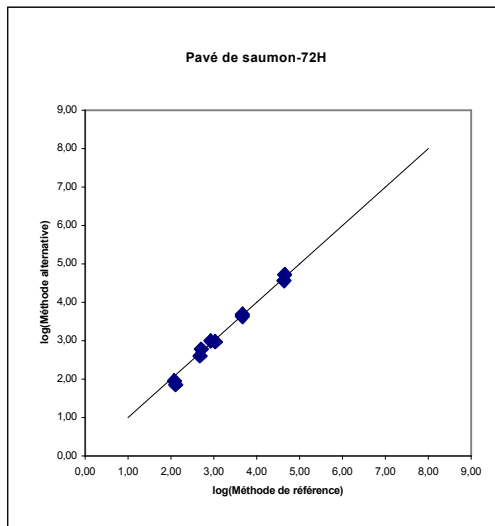
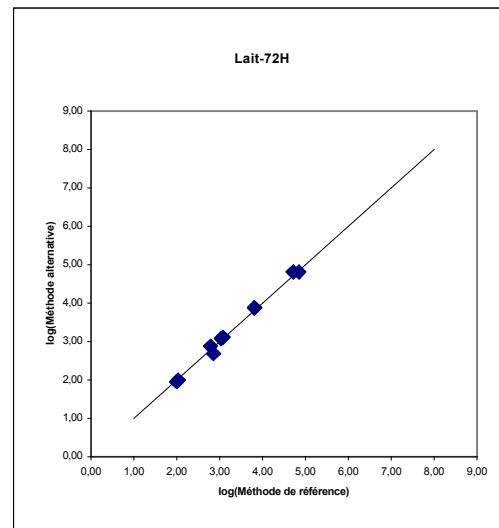
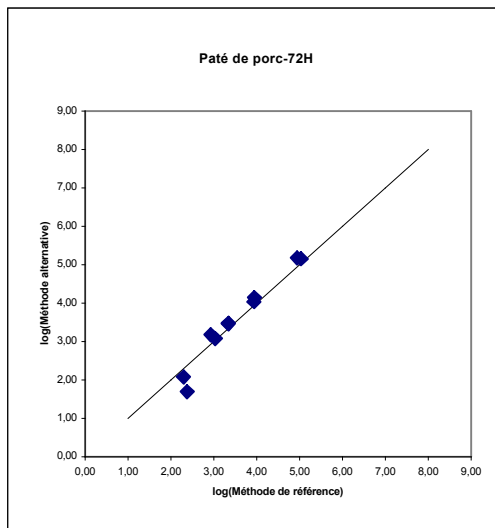
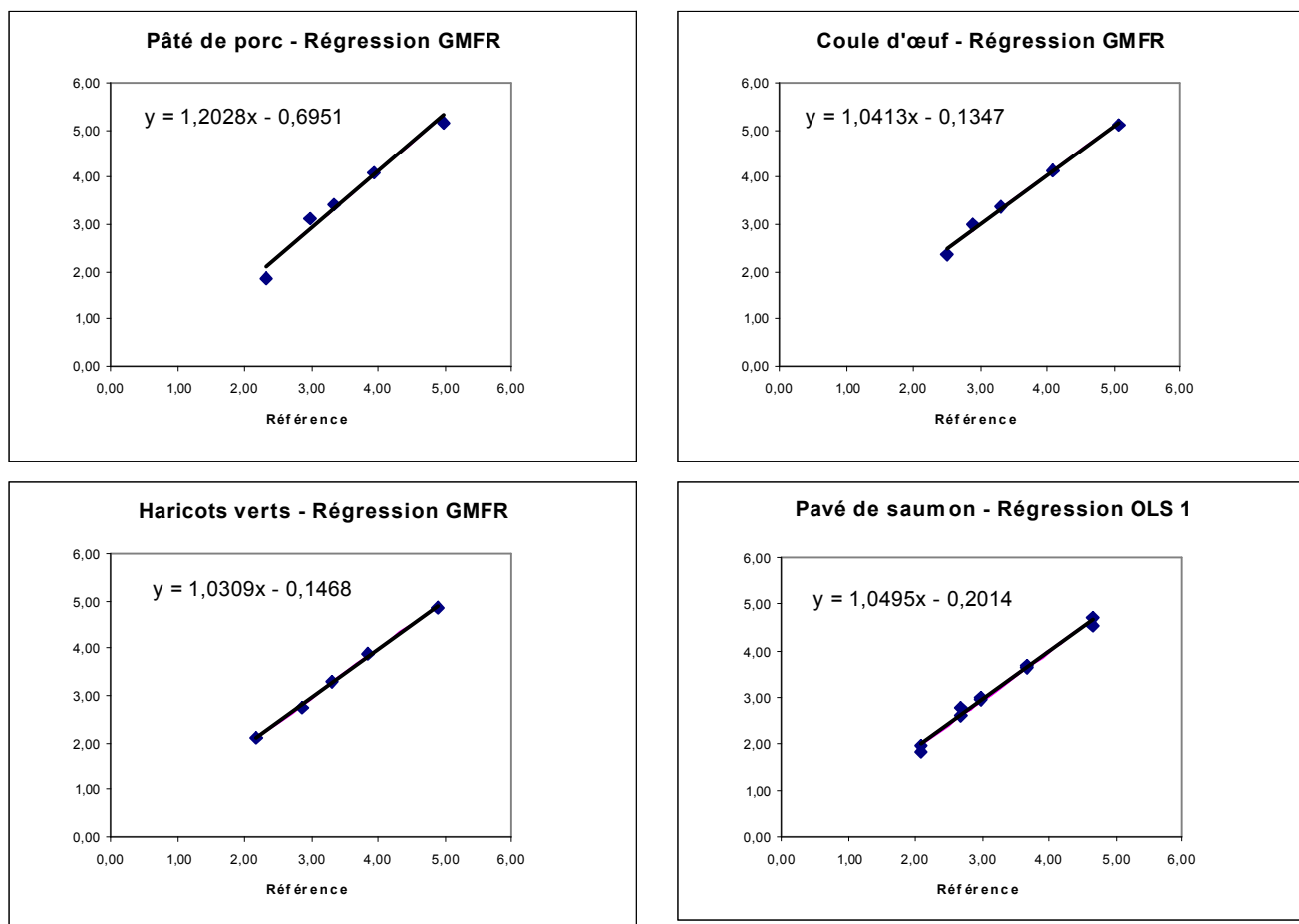
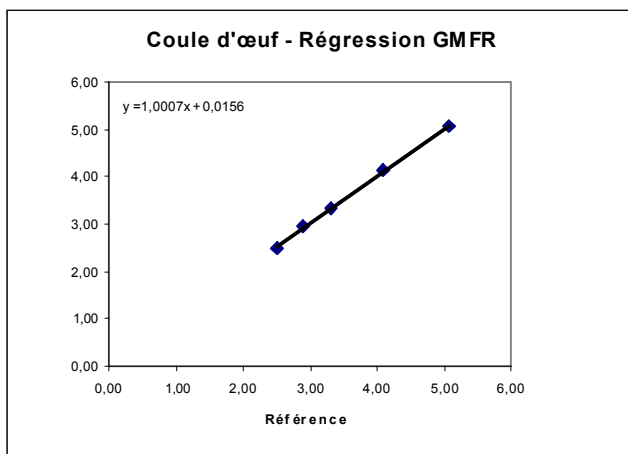
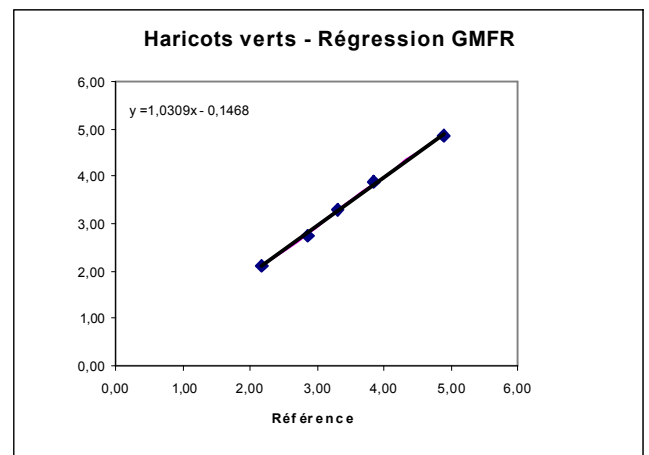
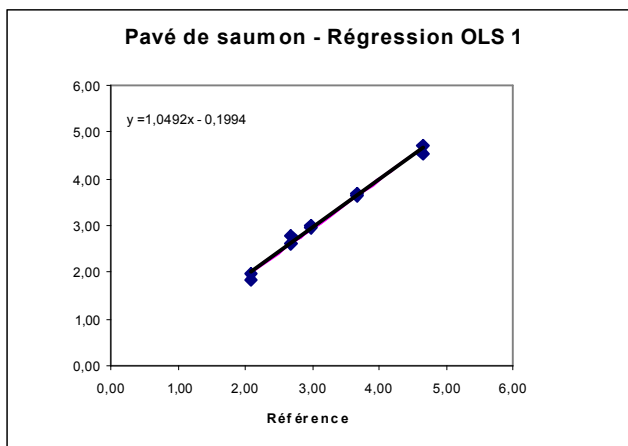
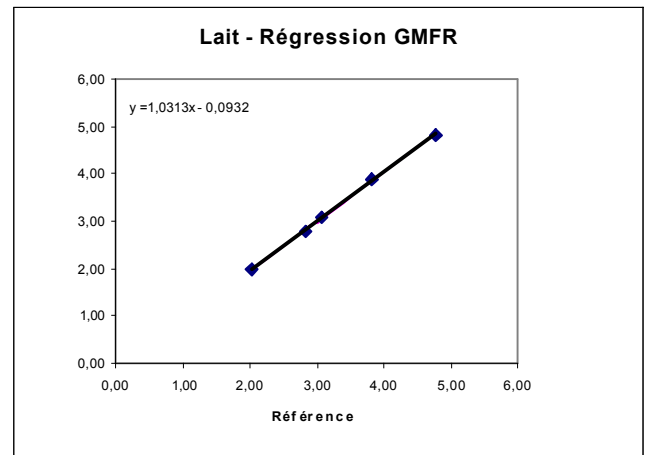
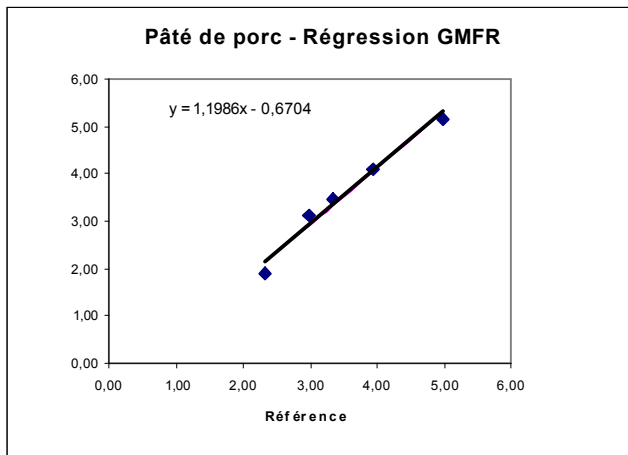


Figure 2 - Linéarité : droites de régression

48 h



72 h



□ **Conclusion**

### Incubation 48 h

La valeur de P est supérieure à 5 % pour les matrices poisson cuisiné et haricots verts, le test de non-linéarité apparaissant ainsi non significatif.

La valeur de P est inférieure à 5% pour la matrice Pâté de porc et coule d'œuf. Cependant, les coefficients de corrélation des droites de régression montrent une valeur de 0,987 et 0.996, valeurs élevées et satisfaisantes pouvant mettre en défaut la robustesse du test de non linéarité.

### Incubation 72 h

La valeur de P est supérieure à 5 % pour les matrices poisson cuisiné, haricots verts et coule d'œuf, le test de non-linéarité apparaissant ainsi non significatif.

La valeur de P est inférieure à 5% pour la matrice Pâté de porc et lait. Cependant, les coefficients de corrélation des droites de régression montrent une valeur de 0,987 et 0.999, valeurs élevées et satisfaisantes pouvant mettre en défaut la robustesse du test de non linéarité.

#### 1.5.1.2 Exactitude relative

Les résultats bruts sont donnés en annexe 1.

□ **Protocole d'incubation 72 h**

Lors de l'étude de validation menée en 1992 par l'ADRIA Normandie, 73 produits végétaux et 59 produits carnés exploitables ont été analysés.

Une étude a été également réalisée par l'ADRIA en 1998 permettant d'obtenir 21 résultats exploitables pour les produits carnés, 16 pour les produits de la mer, 13 pour les ovoproduits et pâtisserie, et 11 pour les végétaux.

Des analyses réalisées en 2005 à ADRIA Développement ont permis d'obtenir 3 résultats supplémentaires pour les produits de la mer et les ovoproduits.

L'étude comparative menée sur la catégorie produits laitiers a été effectuée en exploitant les résultats de Piton et Grappin obtenus en 1991, protocole réalisé sur la norme FIL 100 B équivalent à celui de la norme ISO 4833 pour les produits laitiers.

□ **Résultats**

Un récapitulatif des calculs statistiques est donné dans le tableau 2.

**Tableau 2 - Récapitulatif des données statistiques de l'étude d'exactitude relative**

Incubation 48 h											
Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P %		Biais
									Ordonnée à 0	Pente à 1	
Produits carnés	22	1,25	GMFR	0,210	0,942	0,960	1,034	2,086	36	31	0,033
Produits de la pêche	16	3,50	OLS 1	-0,651	0,783	1,130	0,777	2,144	45	45	0,015
Végétaux	12	1,57	GMFR	-0,584	2,688	1,1093	2,006	2,228	2	7	-0,093
Ovoproduits et pâtisseries	16	0,62	GMFR	0,329	0,906	0,871	1,469	2,144	38	16	-0,047
Tous produits	66	1,37	GMFR	-0,242	1,624	1,030	1,032	1,997	11	31	0,005

Incubation 72 h											
Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t (a)	b	t (b)	Tcritique	P %		Biais D
									Ordonnée à 0	Pente à 1	
Produits carnés	80	0,90	GMFR	- 0,014	0,445	1,000	0,130	1,990	66	90	0,008
Produits laitiers	20	0,67	GMFR	0,121	1,299	0,986	0,733	2,100	21	47	0,043
Produits de la mer	19	3,00	OLS1	- 0,486	0,400	1,183	0,752	2,110	69	46	0,155
Végétaux	84	0,64	GMFR	- 0,115	0,594	1,013	0,511	1,989	55	61	0,042
Ovoproduits et pâtisseries	16	0,5	OLS2	- 0,395	0,877	1,128	1,11	2,145	40	28	0,010
Tous produits	219	0,90	GMFR	0,029	2,922	0,999	0,558	1,971	0	58	0,026

Avec a : ordonnée à l'origine de la droite de régression et b : pente de la droite de régression

**Interprétation statistique :**

P > 5 % : pas significatif                      1 % < P < 5 % : significatif  
 0,1 % < P < 1 % : très significatif                      P < 0,1 % : hyper significatif

**Tableau 3 - Calcul du biais et de la limite de répétabilité**

Incubation 48 h			
Catégorie	Biais D	Répétabilité méthode alternative	Répétabilité méthode de référence
Produits carnés	0,033	0,147	0,117
Produits de la pêche	0,015	0,147	0,059
Végétaux	-0,093	0,161	0,103
Ovoproduits et pâtisseries	-0,047	0,147	0,235
Tous produits	0,005	0,147	0,132

Incubation 72 h			
Catégorie	Biais D	Répétabilité méthode alternative	Répétabilité méthode de référence
Produits carnés	0,008	0,122	0,134
Produits laitiers	0,043	0,352	0,528
Produits de la mer	0,155	0,176	0,059
Végétaux	0,042	0,148	0,232
Ovoproduits et pâtisseries	0,010	0,117	0,235
Tous produits	0,026	0,122	0,134

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	de 2,0 à 7,86 log UFC/g
Produits laitiers	de 3,74 à 5,81 log UFC/g
Produits de la mer	de 3,73 à 8,12 log UFC/g
Végétaux	de 1,95 à 10,48 log UFC/g
Ovoproduits et pâtisseries	de 1,45 à 5,30 log UFC/g
Tous produits	1,45 à 10,48 log UFC/g

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie sont donnés figure 3 et les droites de régression figure 4.

□ **Conclusion**

### Incubation 48 h

Pour chacune des catégories testées, les résultats des tests statistiques valident des ordonnées à l'origine proches de 0 et des pentes proches de 1. Toutefois, certains dénombrements par le Petrifilm Flore Totale sont inférieurs aux résultats obtenus par la méthode de référence, plus particulièrement pour les échantillons suivants :

N° échantillon	Produit	Méthode alternative Petrifilm Flore Totale	Méthode de référence ISO 4833
T27	Mousse de foie	6,03 - 6,04	7,24 - 7,19
T18	Charlotte poire	2,77 - 2,69	3,95 - 3,95
T96	Saumon fumé	2,78 - 2,90	4,86 - 4,91
T33	Céleri	2,30 - 2,04	3,25 - 3,16

Le biais entre les deux méthodes est faible, avec une valeur de 0,005 Log UFC/g tous produits confondus.

La méthode alternative et la méthode de référence montrent des limites de répétabilité d'ordre similaire, respectivement 0,161 Log UFC/g et 0,117 Log UFC/g.

### Incubation 72 h

L'équation de la droite de régression est :  $\log \text{Alt} = 0,029 + 0,999 \log \text{Réf.}$

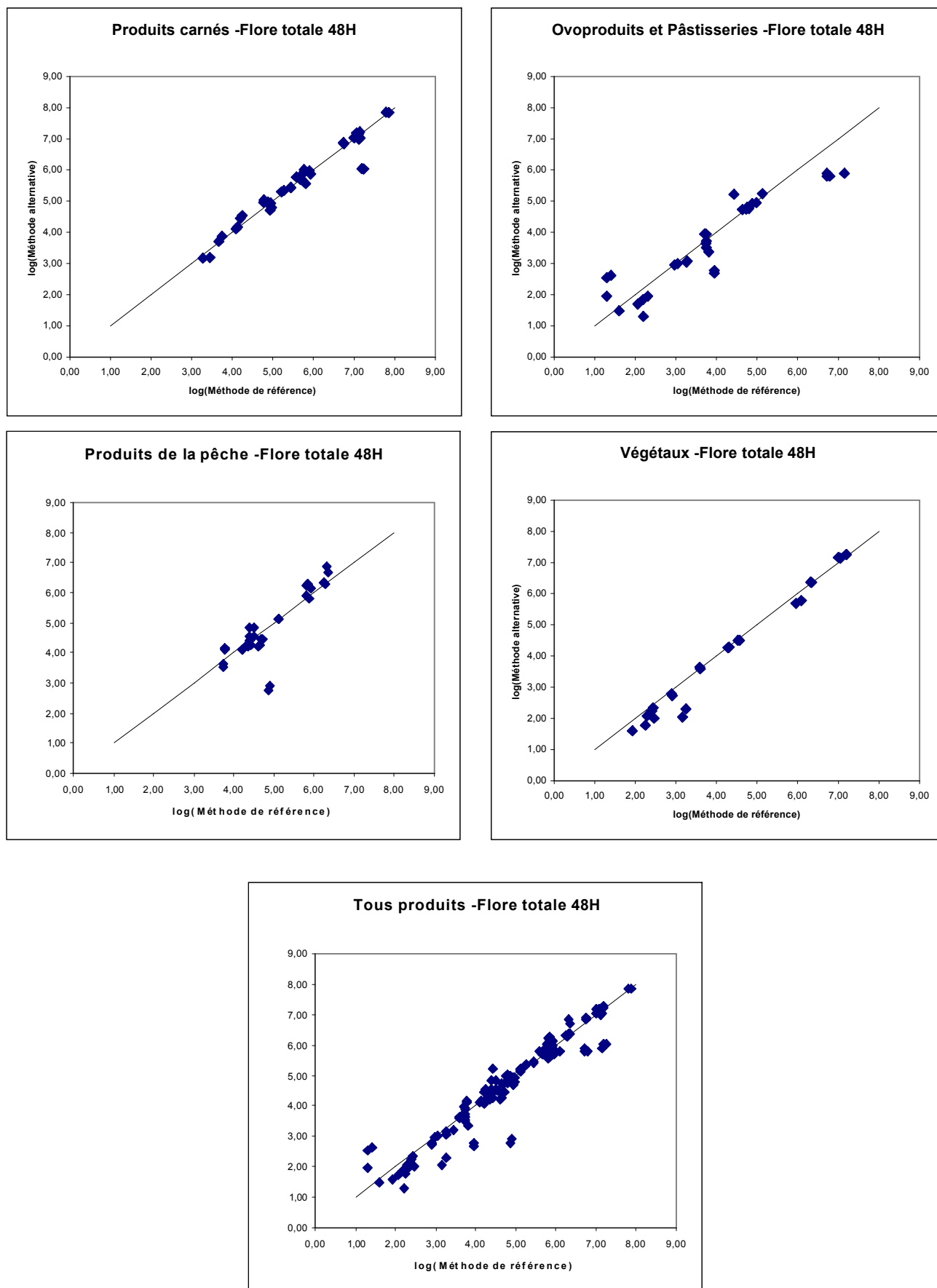
La limite de répétabilité (tous produits) est de 0,176 pour la méthode de référence et de 0,147 pour la méthode alternative.

Pour chacune des catégories testées, les résultats de tests statistiques valident des ordonnées à l'origine proches de 0 et des pentes proches de 1.

Tous produits et tous taux de contamination confondus, le biais entre les deux méthodes est de 0,026, biais légèrement en faveur de la méthode alternative. Cette observation permet d'appréhender les résultats de tests statistiques indiquant alors une ordonnée à l'origine différente de 0 avec une pente proche de 1 pour toutes catégories confondues.

Figure 3 - Exactitude relative : graphiques bidimensionnels

48 h



72 h

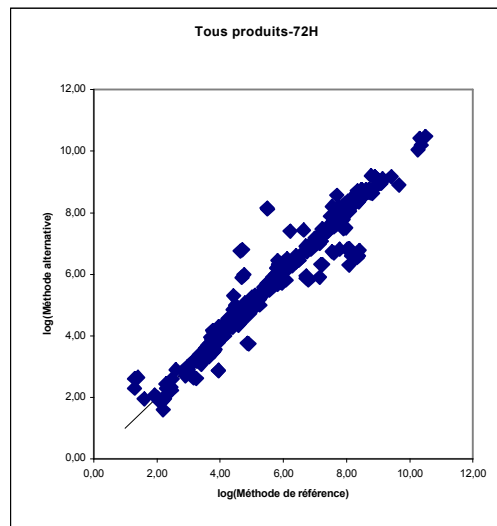
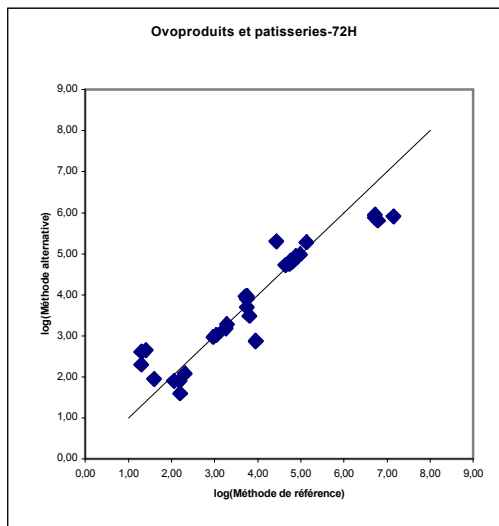
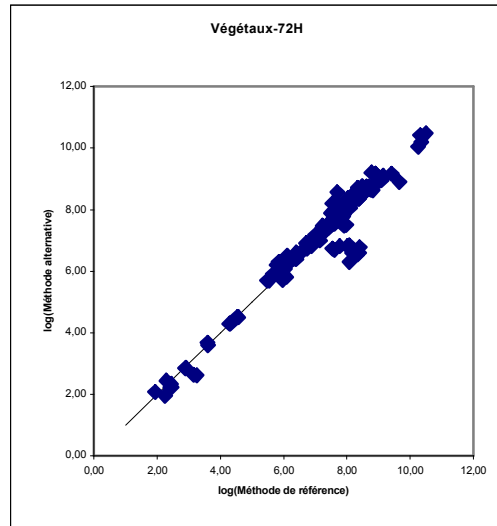
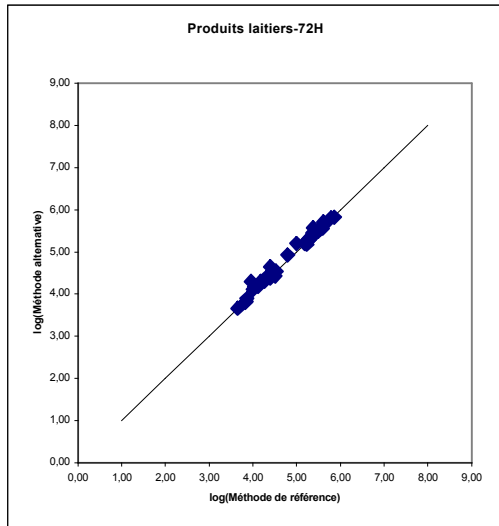
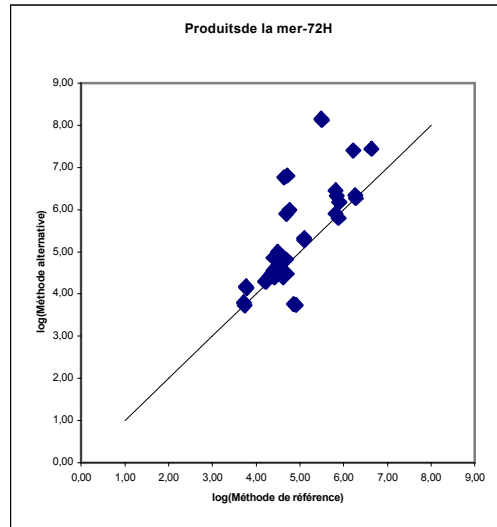
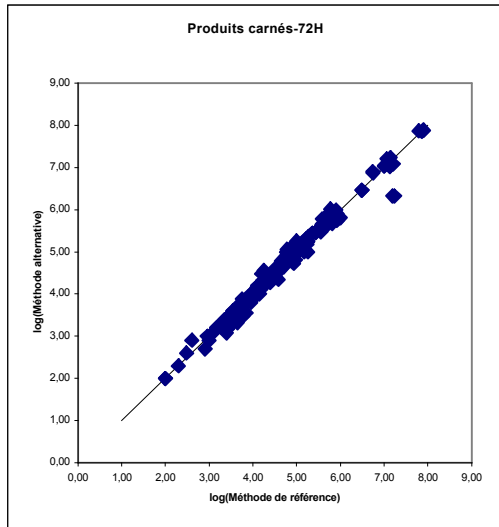
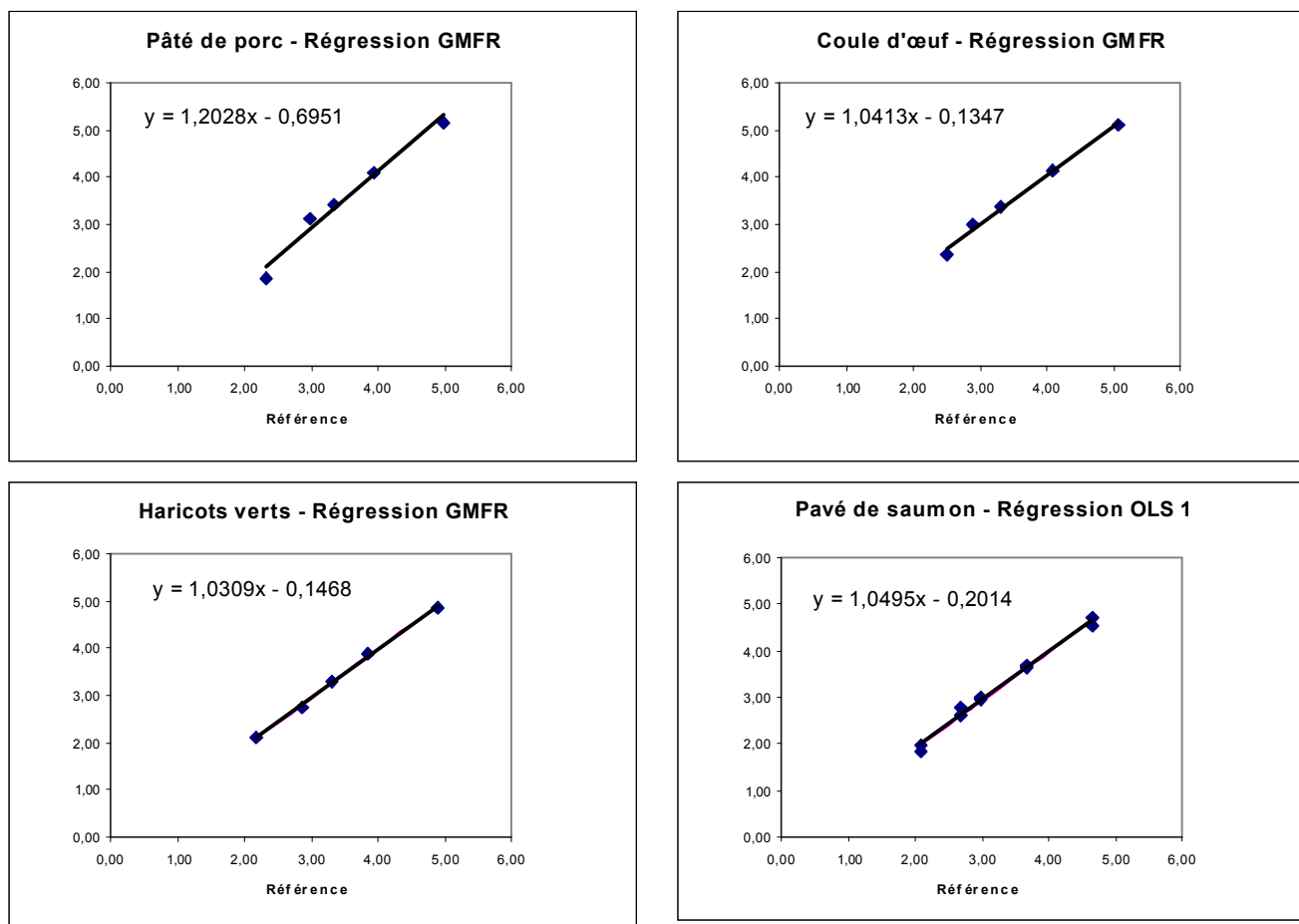
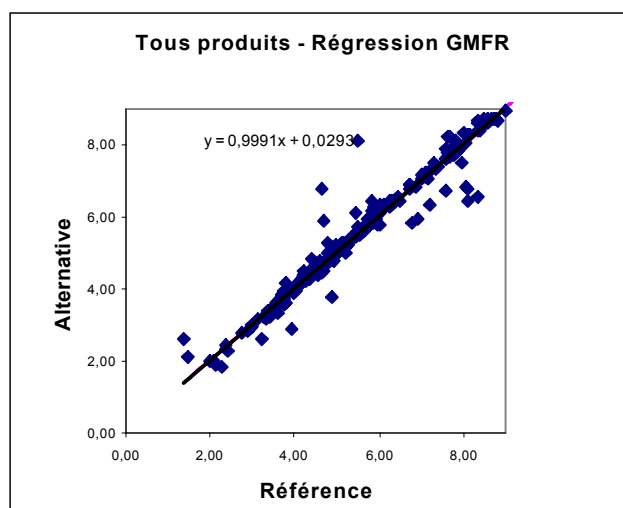
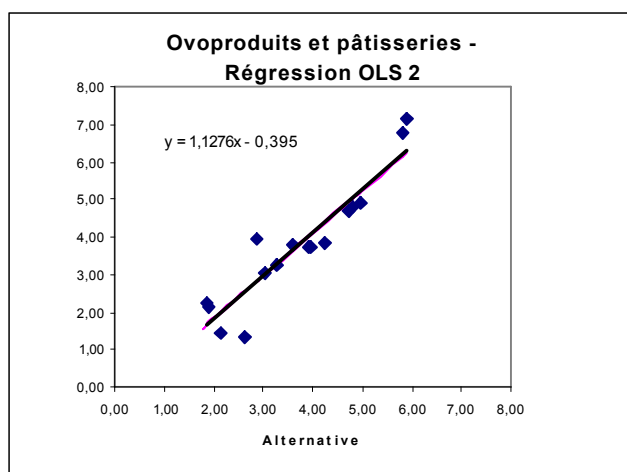
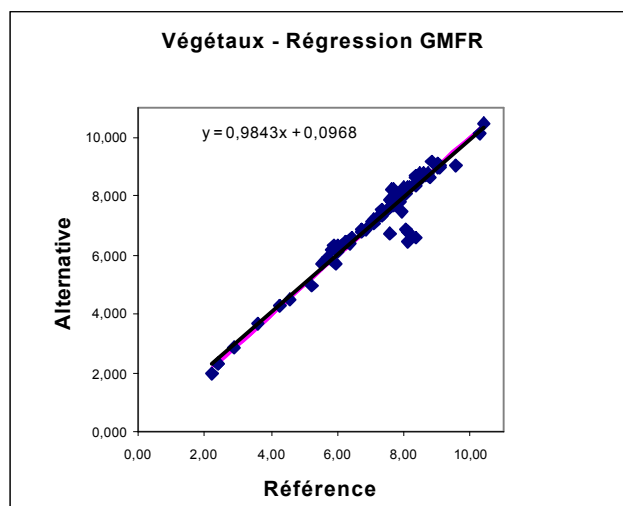
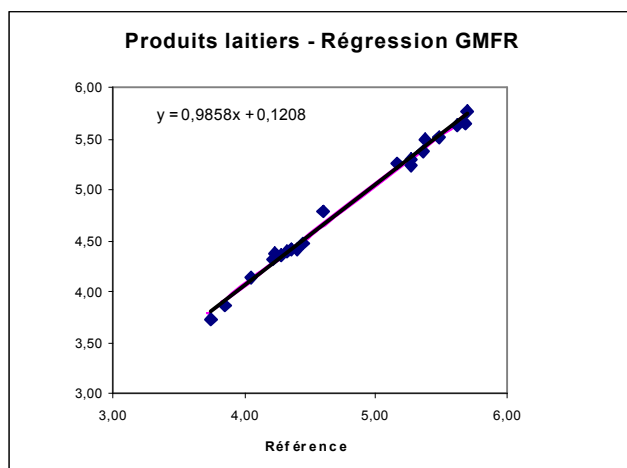
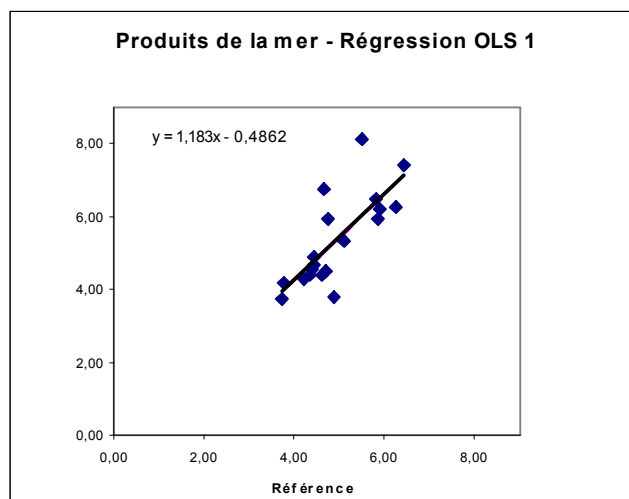
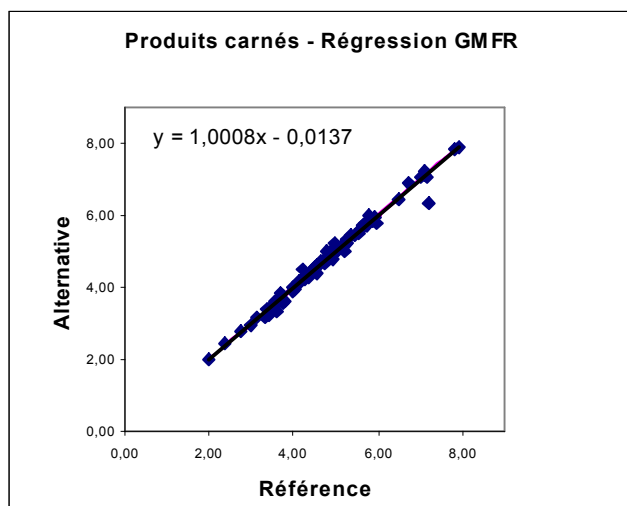


Figure 4 - Exactitude relative : droites de régression

48 h



72 h



### 1.5.1.2 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

#### □ **Protocole**

La limite de détection a été réalisée à l'aide d'une culture de *Serratia liquefaciens* 26.

Quatre niveaux d'inoculation ont été testés, ainsi que le niveau 0. Les dénombrements des suspensions ont été réalisés en inoculant 10 fois 1 ml de chaque suspension en milieu PCA.

#### □ **Résultats**

Les données sont intrinsèques à la méthode. Les interprétations sont données dans les tableaux suivants :

Un récapitulatif est donné dans le tableau 4.

**Tableau 4 - Récapitulatif de la limite de détection et quantification**

Niveau visé	Nombre d'échantillons « positifs »	Ecart-type So	Biais Xo
0	0/6	/	/
0,5	1/6	0.408	0
1	3/6	0.816	0.5
5	5/6	1.033	1
10	6/6	1.169	8

**Tableau 5**

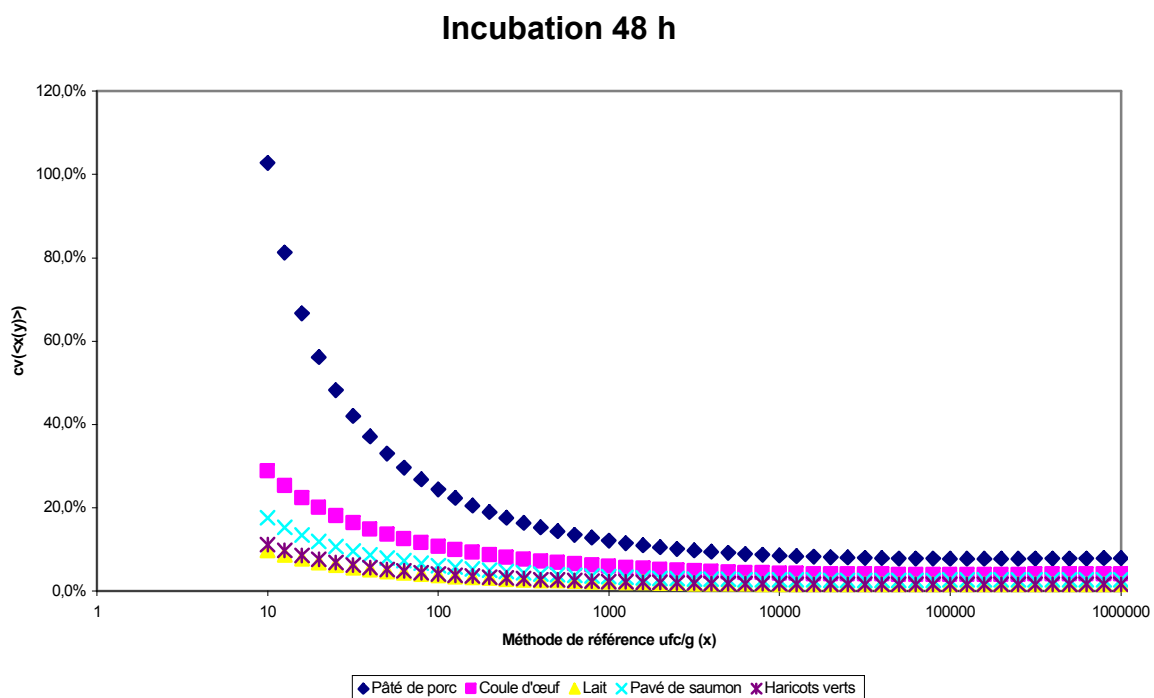
	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 So + Xo$	1,3
LOD	$3,3 So + Xo$	2,7
LOQ	$10So + Xo$	8,2

### 1.5.1.3 Sensibilité relative

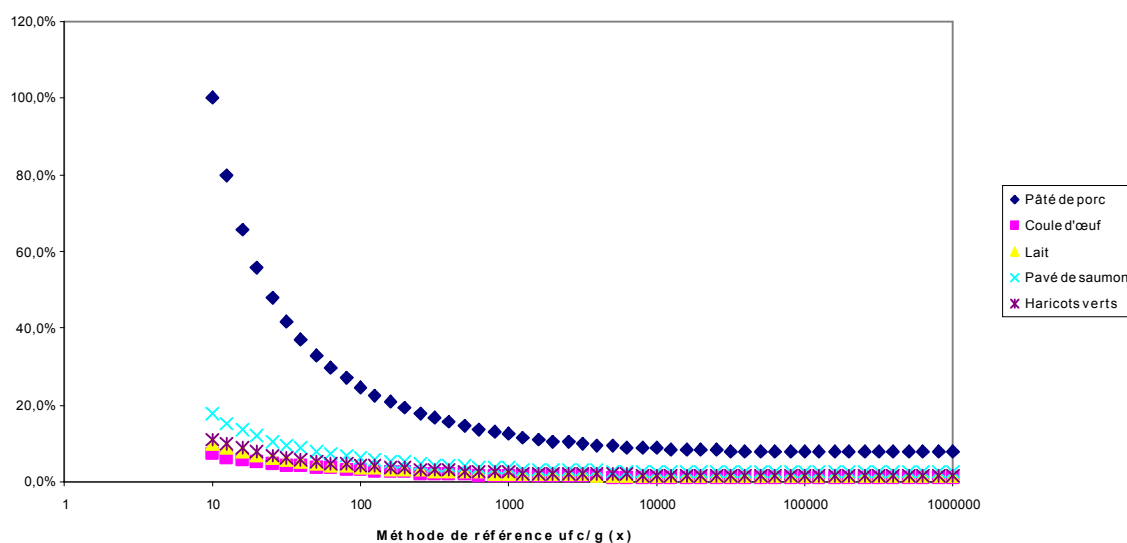
Les données sont intrinsèques à la méthode. Elles sont obtenues à partir des résultats obtenus dans l'étude de linéarité.

Les profils de précision obtenus pour les différentes matrices sont présentés figure 5.

**Figure 5 - Profils de précision obtenus pour les différentes matrices**



### Incubation 72 h



#### 1.5.1.4 *Praticabilité*

Temps réel de manipulation / flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser	Le temps de manipulation par échantillon est identique pour une grande ou une petite série d'échantillons
Délai d'obtention des résultats	Le résultat est obtenu en 72 h (indiqué sur la notice)

**Les principaux atouts de la méthode Petrifilm Flore Totale par rapport à la méthode de référence sont le gain de place à l'étape d'incubation, la facilité des manipulations, la gestion facilitée des déchets. Il s'agit de milieux prêts à l'emploi, impliquant ainsi un gain de temps de manipulation important par rapport à la méthode de référence.**

### 1.5.2 *Etude interlaboratoire*

#### 1.5.2.1 *Préparation*

Les résultats obtenus lors de l'étude collaborative réalisée en 2001, en vue de l'obtention de validation, ont été exploitées selon la norme ISO 16140. Quinze laboratoires avaient participé à cette étude (Cf. annexe 2).

#### 1.5.2.2 *Analyses*

Les laboratoires collaborateurs et le laboratoire expert ont effectués les analyses à la fois par la méthode alternative et la méthode de référence.

## 1.5.2.3 Résultats

□ **Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs**

**Tableau 6 - Synthèse des résultats obtenus par la méthode alternative et la méthode de référence (en UFC)**

Laboratoires	Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3				Niveau 4			
	Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative	
A	660	590	1 600	1 400	3 900	2 800	23 000	16 000	17 000	26 000	170 000	230 000	530 000	820 000	2 200 000	1 900 000
B	1 700	790	2 200	2 000	8 000	7 400	24 000	39 000	93 000	91 000	250 000	200 000	1 700 000	1 300 000	3 000 000	2 700 000
C	1 400	1 500	1 300	1 700	8 300	8 900	24 000	25 000	77 000	58 000	230 000	220 000	1 400 000	2 000 000	2 900 000	4 000 000
D	900	800	1 000	980	5 200	5 800	17 000	6 800	60 000	65 000	170 000	180 000	2 600 000	1 600 000	3 200 000	2 100 000
E	1 400	1 300	1 900	2 500	12 000	11 000	15 000	14 000	120 000	110 000	230 000	210 000	1 500 000	1 400 000	2 300 000	1 700 000
F	810	820	4 200	4 100	7 800	5 900	41 000	46 000	69 000	62 000	280 000	320 000	900 000	1 200 000	4 100 000	3 600 000
G	1 800	2 000	3 300	1 600	20 000	14 000	44 000	37 000	160 000	260 000	420 000	450 000	2 800 000	2 500 000	3 400 000	2 800 000
I	7 700	1 700	12 000	4 500	12 000	7 100	25 000	18 000	100 000	62 000	250 000	170 000	1 800 000	1 700 000	3 800 000	2 100 000
J	1 100	1 000	1 600	1 500	11 000	19 000	56 000	49 000	110 000	72 000	590 000	470 000	4 400 000	5 000 000	1 400 000	1 200 000
K	280	500	1 600	1 800	7 000	7 500	20 000	14 000	35 000	56 000	180 000	170 000	7 900 000	8 800 000	3 400 000	2 300 000
L	1 200	1 400	1 800	1 800	18 000	21 000	44 000	43 000	150 000	130 000	350 000	310 000	2 100 000	2 100 000	4 000 000	3 500 000
M	1 900	2 700	4 400	4 700	4 400	59 000	14 000	51 000	200 000	47 000	470 000	190 000	790 000	2 000 000	3 100 000	5 000 000
N	1 500	1 600	1 500	2 300	12 000	14 000	18 000	13 000	89 000	110 000	110 000	200 000	890 000	850 000	1 400 000	1 600 000
O	2 900	2 800	4 500	5 700	25 000	27 000	76 000	76 000	150 000	140 000	350 000	460 000	2 300 000	3 600 000	5 100 000	5 400 000

□ **Interprétation statistique**

➤ **Biais**

**Tableau 7 - Valeurs de t(d) obtenues par niveau**

Niveau	Biais D	t(d)	t critique ddl (n-1)	Conclusion
1	0,23	4,37	2,16	Biais significatif
2	0,37	7,08	2,16	Biais significatif
3	0,44	9,41	2,16	Biais significatif
4	0,27	4,82	2,16	Biais significatif

*Niveau critique : t(d) < t critique*

➤ Répétabilité

**Tableau 8 - Valeurs obtenues pour la limite de répétabilité et valeurs pour le Test F**

Niveau	Limite de répétabilité		F ou 1/F calculé	F critique (0,05 ; n ; n)	P %
	Méthode de référence	Méthode Alternative			
1	0,132	0,161	1,494	2,48	23,1
2	0,191	0,308	2,601	2,48	4,2
3	0,323	0,235	1,891	2,48	12,3
4	0,264	0,220	1,440	2,48	25,2

➤ Reproductibilité

**Tableau 9 - Valeurs obtenues pour la limite de reproductibilité et valeurs pour le Test F**

Niveau	Limite de reproductibilité		F ou 1/F calculé	F critique (0,05 ; n -1 ; n-1)	P %
	Méthode de référence	Méthode Alternative			
1	0,765	0,571	1,798	2,58	15,1
2	0,829	0,847	1,043	2,58	52,9
3	0,612	0,528	1,344	2,58	30,1
4	0,710	0,477	2,214	2,58	8,3

**Tableau 10 - Rapports répétabilité / Reproductibilité**

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
1	5,794	3,536
2	4,346	2,747
3	1,895	2,247
4	2,686	2,166

➤ Dispersion entre laboratoires

**Tableau 11 - Dispersion entre les laboratoires**

Niveau	Méthode de référence F	Méthode alternative F ou 1/F	F critique (0,05 ; n-1 ; n)
1	66,15	24,00	2,55
2	36,77	14,09	2,55
3	6,18	9,10	2,55
4	13,43	8,39	2,55

□ **Discussion (incubation 72 h)**

Le biais entre la méthode de référence et la méthode Petrifilm Flore Totale est donné significatif pour tous les niveaux testés, biais en faveur de la méthode Petrifilm Flore Totale.

Les répétabilités sont comparables pour les deux méthodes pour les niveaux 1, 3 et 4. Au niveau 2, une valeur de P de 4,2% est obtenue par comparaison d'une répétabilité de 0,191 pour la méthode de référence à une répétabilité de 0,308 pour la méthode Petrifilm Flore Totale, répétabilité de la méthode alternative toutefois satisfaisante.

Les méthodes montrent une reproductibilité comparable pour tous les niveaux testés.

Les rapports Reproductibilité / répétabilité de la méthode Petrifilm Flore Totale sont en général meilleurs que ceux déterminés pour la méthode de référence.

Quelle que soit la méthode, les valeurs de F sont systématiquement supérieures à la valeur critique. Mais, de manière générale, la dispersion entre laboratoires est plus importante pour la méthode de référence, particulièrement pour les faibles taux.

### **1.5.3 Conclusion**

**Les conclusions de l'étude comparative des méthodes sont les suivantes :**

□ **Incubation 48 h**

Au travers des données acquises dans le cadre de cette étude, la méthode Petrifilm Flore Totale avec incubation 48 h montre une linéarité et une exactitude relative satisfaisantes pour l'analyse des produits d'alimentation humaine, à l'exception des produits laitiers et mollusques crus. Quelques discordances sont observées entre les deux méthodes. Cependant, le biais entre la méthode alternative et la méthode de référence est faible, avec une valeur de 0,005 Log UFC/g. Les limites de répétabilité de la méthode Petrifilm Flore Totale et de la méthode de référence sont similaires.

### **Incubation 72 h**

La méthode Petrifilm Flore Totale montre **une linéarité relative satisfaisante**.

La méthode Petrifilm Flore Totale montre **une exactitude relative satisfaisante**, avec un biais entre les deux méthodes comparées légèrement en faveur de la méthode alternative.

### **Praticabilité de la méthode alternative**

L'intérêt majeur de la méthode Petrifilm Flore Totale réside dans :

- **le délai d'obtention de résultats lors d'une incubation pendant 48 h des Petrifilms Flore Totale,**
- **le gain de place à l'incubation des Petrifilms, la gestion facilitée des déchets,**
- **la facilité des manipulations,**
- **la facilité à la lecture des résultats.**

*Les conclusions de l'étude interlaboratoires sont les suivantes :*

**Le biais entre la méthode de référence et la méthode Petrifilm Flore Totale apparaît en faveur de la méthode alternative**, confirmant les résultats de l'étude comparative des méthodes.

**La méthode Petrifilm Flore Totale montre une répétabilité et une reproductibilité satisfaisantes.**

**La dispersion des résultats entre laboratoires est en général meilleure par la méthode Petrifilm Flore Totale que par la méthode de référence.**

## **1.6 Bilan des modifications intervenues dans la méthode alternative, ayant donné lieu ou non à une extension de validation**

Aucune modification n'est intervenue dans la méthode depuis la dernière validation.

## 2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cinq articles ont été référencés :

<b>Références</b>	<b>Objectifs et expériences</b>	<b>Résultats</b>
<i>Gonçalves et al., 2009</i> J. Dairy Res., 76, 229-233	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dénombrements de levains pendant la fabrication de yaourts</li> <li>- Comparaison des dénombrements par :               <ul style="list-style-type: none"> <li>* ISO 9232</li> <li>* géloses MRS et M17 associées au Petrifilm Flore Totale</li> </ul> </li> </ul>	Le test Petrifilm Flore Totale associé aux dénombrements sur gélose MRS et M17 apparaît satisfaisant pour dénombrer <i>S. salivarius</i> et <i>L. bulgaricus</i> .
<i>Simmons et al., 2008</i> J. Food Protect., 71, 373-375	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effet de la température d'incubation sur le dénombrement de la flore aérobie de carcasses de mouton et bœuf</li> <li>- Des températures de 25°C, 30°C et 35°C ont été étudiées avec les tests Petrifilm et sur PCA.</li> </ul>	Les dénombrements observés et les espèces identifiées montrent que la température de 35°C ne permet pas le recouvrement des bactéries psychrotrophes.
<i>Ortalan et al., 2007</i> J. Dairy Res., 74, 387-391	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dénombrement de la flore lactique des laits sur différents milieux gélosés (MRS, KF, KFS) et le test Petrifilm</li> <li>- Suspensions de 10 espèces LAB, et 30 échantillons</li> </ul>	Corrélation satisfaisante : possibilité d'utiliser le test Petrifilm Flore totale.
<i>De Sousa et al., 2005</i> Rev. Argent. Microbiol, 37, 214-216	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 30 échantillons analysés par la méthode de dénombrement sur boîte et le test Petrifilm</li> </ul>	Relation linéaire observée entre les deux méthodes.
<i>Dawkins et al., 2005</i> J. Food. Protect., 68, 1506-1511	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Performances du test Petrifilm Flore Totale pour les analyses de produits carnés et laitiers : analyse de 329 échantillons par le test Petrifilm et la méthode de dénombrement sur PCA</li> </ul>	Le test Petrifilm montre une meilleure répétabilité, mais des problèmes de recouvrement ou de liquéfaction des gels Petrifilm sont observés pour certaines espèces.

## Annexe 1 : Résultats de l'exactitude relative

### Données 1998

N° éch.	Produits	Date d'analyse	PETRIFILM FLORE TOTALE			PCA *		
			48H			72H		
			log ufc/g		moyenne	log ufc/g		moyenne
			a	b		rep1	rep2	
T1	Macédoine	14/12/1998	2,79	2,73	<b>2,76</b>	2,89	2,91	<b>2,90</b>
T2	Bouchée de volaille	14/12/1998	7,15	7,02	<b>7,08</b>	7,12	7,13	<b>7,13</b>
T3	Rôti cuit	14/12/1998	3,71	3,87	<b>3,79</b>	3,67	3,75	<b>3,71</b>
T4	Oeufs de truite	14/12/1998	6,27	6,34	<b>6,30</b>	6,28	6,26	<b>6,27</b>
T6	Saumon fumé	14/12/1998	4,56	4,41	<b>4,48</b>	4,39	4,40	<b>4,39</b>
T7	Croque monsieur	14/12/1998	6,99	7,03	<b>7,01</b>	7,12	7,15	<b>7,13</b>
T9	Bouchées St jacques	14/12/1998	5,15	5,14	<b>5,14</b>	5,10	5,10	<b>5,10</b>
T11	Coquille de saumon surgelée	14/12/1998	5,90	5,79	<b>5,85</b>	5,82	5,88	<b>5,85</b>
T12	Filet de colin pané surgelé	14/12/1998	4,23	4,27	<b>4,25</b>	4,62	4,64	<b>4,63</b>
T13	Filet de cabillaud surgelé	14/12/1998	4,09	4,11	<b>4,10</b>	4,22	4,20	<b>4,21</b>
T14	Steak de thon surgelé	15/12/1998	4,54	4,21	<b>4,38</b>	4,49	4,36	<b>4,42</b>
T15	Tacauds entiers surgelés	15/12/1998	4,15	4,11	<b>4,13</b>	3,77	3,78	<b>3,78</b>
T16	Croquettes panées surgelées	15/12/1998	6,72	6,85	<b>6,79</b>	6,35	6,32	<b>6,33</b>
T18	Charlotte poire surgelée	15/12/1998	2,77	2,69	<b>2,73</b>	3,95	3,95	<b>3,95</b>
T19	Délice café/chocolat surgelé	15/12/1998	3,00	2,95	<b>2,98</b>	3,04	2,97	<b>3,00</b>
T21	Poivrons rouges surgelés	15/12/1998	3,59	3,64	<b>3,62</b>	3,60	3,59	<b>3,59</b>
T22	Courgettes surgelées	15/12/1998	4,28	4,27	<b>4,28</b>	4,31	4,28	<b>4,30</b>
T23	Poivrons verts surgelés surgelés	15/12/1998	4,50	4,50	<b>4,50</b>	4,57	4,53	<b>4,55</b>
T24	Moules décortiquées	15/12/1998	4,26	4,23	<b>4,24</b>	4,42	4,30	<b>4,36</b>
T25	Céleri rémoulade	15/12/1998	2,00	2,08	<b>2,04</b>	2,46	2,29	<b>2,38</b>
T26	Taboulé à l'orientale	15/12/1998	2,34	2,24	<b>2,29</b>	2,44	2,41	<b>2,42</b>
T27	Mousse de foie de volaille	15/12/1998	6,03	6,04	<b>6,03</b>	7,24	7,19	<b>7,22</b>
T28	Boudin noir aux pommes	15/12/1998	7,03	7,04	<b>7,03</b>	7,00	7,00	<b>7,00</b>
T29	Saucisses orientales	15/12/1998	3,19	3,17	<b>3,18</b>	3,45	3,28	<b>3,37</b>
T31	Blanc de dinde	15/12/1998	5,56	5,74	<b>5,65</b>	5,81	5,68	<b>5,74</b>
T33	Céleri	16/12/1998	2,30	2,04	<b>2,17</b>	3,25	3,16	<b>3,20</b>
T35	Mayonnaise	16/12/1998	3,64	3,72	<b>3,68</b>	3,74	3,75	<b>3,74</b>
T37	Carottes râpées	16/12/1998	6,37	6,36	<b>6,36</b>	6,32	6,34	<b>6,33</b>
T40	Eclair au chocolat	16/12/1998	3,37	3,51	<b>3,44</b>	3,81	3,75	<b>3,78</b>
T41	Gland au chocolat	16/12/1998	5,22	5,24	<b>5,23</b>	4,43	5,13	<b>4,78</b>
T42	Chou rouge	16/12/1998	5,69	5,78	<b>5,73</b>	5,96	6,09	<b>6,03</b>
T43	Mélange de crudités	16/12/1998	7,13	7,16	<b>7,14</b>	7,05	7,00	<b>7,02</b>
T44	Salade de betterave rouge	16/12/1998	1,78	1,60	<b>1,69</b>	2,25	1,93	<b>2,09</b>
T46	Salade verte	16/12/1998	7,26	7,25	<b>7,26</b>	7,20	7,20	<b>7,20</b>
T49	Escalope de dinde	21/12/1998	4,96	5,04	<b>5,00</b>	4,77	4,78	<b>4,78</b>
T50	Cote de porc	21/12/1998	4,96	4,94	<b>4,95</b>	4,88	4,91	<b>4,89</b>
T51	Cervelle de porc	21/12/1998	5,87	5,97	<b>5,92</b>	5,93	5,90	<b>5,92</b>

\* Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

N° éch.	Produits	Date d'analyse	PETRIFILM FLORE TOTALE			PCA *		
			48H			72H		
			log ufc/g		moyenne	log ufc/g		moyenne
			a	b		rep1	rep2	
T52	Cœur de bœuf	21/12/1998	5,30	5,34	<b>5,32</b>	5,21	5,27	<b>5,24</b>
T54	Côte de veau	21/12/1998	5,84	5,71	<b>5,77</b>	5,70	5,69	<b>5,70</b>
T55	Steak haché	21/12/1998	7,22	7,18	<b>7,20</b>	7,14	7,06	<b>7,10</b>
T56	Foie de veau	21/12/1998	6,88	6,84	<b>6,86</b>	6,74	6,75	<b>6,75</b>
T57	Cœur de bœuf	21/12/1998	7,85	7,84	<b>7,85</b>	7,79	7,86	<b>7,83</b>
T58	Escalope de dinde	21/12/1998	5,44	5,43	<b>5,43</b>	5,44	5,44	<b>5,44</b>
T59	Foie de porc	21/12/1998	5,95	6,01	<b>5,98</b>	5,79	5,77	<b>5,78</b>
T60	Steak haché	21/12/1998	4,11	4,17	<b>4,14</b>	4,09	4,13	<b>4,11</b>
T61	Bifeck tranche	21/12/1998	4,71	4,79	<b>4,75</b>	4,93	4,97	<b>4,95</b>
T62	Filet de poulet	21/12/1998	4,54	4,45	<b>4,49</b>	4,25	4,20	<b>4,23</b>
T63	Bavette	21/12/1998	4,93	4,92	<b>4,92</b>	4,95	4,89	<b>4,92</b>
T64	Cote de porc filet	21/12/1998	5,77	5,70	<b>5,74</b>	5,58	5,67	<b>5,63</b>
T67	Eclair	21/12/1998	4,74	4,73	<b>4,74</b>	4,73	4,64	<b>4,68</b>
T68	Religieuse	21/12/1998	4,76	4,81	<b>4,79</b>	4,80	4,76	<b>4,78</b>
T69	Gland	21/12/1998	4,95	4,92	<b>4,94</b>	4,98	4,88	<b>4,93</b>
T70	Coule d'œuf	21/12/1998	<1	<1	<b>&lt;1</b>	<1	<1	<b>&lt;1,00</b>
T71	Mayonnaise	21/12/1998	1,95	1,30	<b>1,63</b>	2,31	2,20	<b>2,26</b>
T72	Coule d'œuf	21/12/1998	1,30	<1,00	<b>&lt;1,15</b>	<1	<1	<b>&lt;1</b>
T89	Filet de colin frais	28/12/1998	6,23	6,29	<b>6,26</b>	5,82	5,84	<b>5,83</b>
T90	Pavé de saumon frais	28/12/1998	6,14	6,13	<b>6,14</b>	5,90	5,90	<b>5,90</b>
T91	Crème pâtissière	28/12/1998	3,94	3,95	<b>3,95</b>	3,75	3,71	<b>3,73</b>
T92	Crème anglaise	28/12/1998	1,00	<1,00	<b>&lt;1,00</b>	1,78	1,93	<b>1,85</b>
T93	Coule d'œuf	28/12/1998	2,62	2,54	<b>2,58</b>	1,40	1,30	<b>1,35</b>
T94	Coule d'œuf	28/12/1998	1,48	1,95	<b>1,72</b>	1,60	1,30	<b>1,45</b>
T95	Mayonnaise	28/12/1998	1,85	1,70	<b>1,77</b>	2,19	2,06	<b>2,12</b>
T96	Saumon fumé	28/12/1998	2,78	2,90	<b>2,84</b>	4,86	4,91	<b>4,88</b>
T97	Crème aux oeufs	28/12/1998	<1,00	<1,00	<b>&lt;1,00</b>	1,30	1,18	<b>1,24</b>

## Données de 2005

N° éch	Produit	Date	Dilution	PETRIFILM FLORE TOTALE						PCA *							
				48H 30°C						Série1		Série2		ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g
				Série 1	Série 2	ufc/g série1	ufc/g série2	log ufc/g série1	log ufc/g série2	boite a	boite b	boite a	boite b	ufc/g série1	ufc/g série2	log ufc/g série1	log ufc/g série2
356	Loup de mer	04/05/2005	100	35	46	3500	4400	3,54	3,64	43	59	55	55	5500	5200	3,74	3,72
			1000	3	2					7	11	1	3				
357	Sole tropicale	04/05/2005	100	>300	>300	70000	70000	4,85	4,85	245	217	272	323	25000	31000	4,40	4,49
			1000	70	96					47	44	32	59				
358	Merlu blanc	04/05/2005	100	270	335	27000	27000	4,43	4,43	>300	>300	>300	>300	50000	48000	4,70	4,68
			1000	26	24					45	55	44	52				
379	Coule d'œuf	04/05/2005	10000	76	92	780000	780000	5,89	5,89	>300	>300	>300	>300	14000000	53000000	7,15	6,72
			100000	10	10					130	143	44	62				
380	Coule d'œuf	04/05/2005	10000	62	66	630000	630000	5,80	5,80	>300	>300	>300	>300	6100000	53000000	6,79	6,72
			100000	7	9					62	60	52	53				
381	Coule d'œufs de caille	04/05/2005	10	107	101	1200	1100	3,08	3,04	166	169	148	154	1900	1800	3,28	3,26
			100	30	22					42	49	56	47				
382	Millefeuille	04/05/2005	100	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	>300	>300	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48
			1000	>300	>300					>300	>300	>300	>300				

\* Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

## Annexe 2 - Liste des laboratoires collaborateurs

Société	Contact	Adresse	Pays
MICROSMEDT	M. JEFF DE SMEDT	Atealaan Street B-2200 HERENTALS	BELGIQUE
S/G NUTRILAB	M. P. SCHEURWATER	Burgstraat 12 4283 GG GIESSEN	PAYS -BAS
FACULTY OF VETERINARY MEDECINE	Prof. Dr. LIEVEN DE ZUTTER	Dep. of Veterinary Food Inspection Salisburylaan, 133 B-9820 MERELBECKE	BELGIQUE
HONIG MERKARTIKELEN	M. E.BRUIJNS	Waalbandijk 20 6541AK NIJMEGEN	PAYS -BAS
UNIVERSITA CATTOLICA DEL SACRO CUORE PIACENZA	Prof. COCCONCELLI	Via Emilia Parmense, 84 29100 PIACENZA	ITALIE
QUEST INT HOLLAND B.	M W. VAN DEN BROEK	Huizerstraasweg 28 1411 GP NAARDEN	PAYS -BAS
GELAGRI	Mme DAVID	ZI Monplaisir BP 138 22600 LOUDEAC	FRANCE
LIDAL	M. MAUCI	22 rue du Pr FORNET 74006 SEYNOD CEDEX	FRANCE
LDA 15	Mme VERS	100 rue de l'égalité 15000-AURILLAC	FRANCE
LDA 26	M. BEUGNIES	37 avenue de Lautagne BP 118 26000 VALENCE	FRANCE
C.N.R.CENTO STUDY LATTE	Mme Roberta LODI	Via celoria,2 20133 MILANO	FRANCE
NESTLE	Mme F. CANTERBIANI M. Jan HOOSTEN	CENTRE DE RECHERCHE Vers chez les Blanc 1000 LAUSANNE 26	FRANCE
LDA 66	Mme DEDY	Rambla de la thermodynamique 66000 PERPIGNAN	FRANCE
IPL Laboratoire SERMHA	M. Richard LEQUIEN Mme Béatrice VILETTE	BP39 Domaine du Certia 59651 VILLENEUVE D'ASCQ	FRANCE
AMORA MAILLE	Mme CUNIN	48 quai Nicolas Rolin 21000 DIJON	FRANCE