



**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 : BIO 12/13 – 02/05**

<b>Date de validation :</b>	<b>04.02.2005</b>
<b>Date d'extension :</b>	<b>24.05.2007</b>
<b>Date de reconduction :</b>	<b>26.01.2009</b>
<b>Fin de validité :</b>	<b>04.02.2013</b>

**La Société**  
(siège social, distributeur  
et site de production)

**BIOMERIEUX**  
**69280 MARCY L'ETOILE**  
**FRANCE**

est autorisée à faire référence à la marque **AFNOR VALIDATION** pour la méthode alternative **quantitative** d'analyse ci-dessous :

**TEMPO® EC**

**Méthode validée pour le dénombrement d'*Escherichia coli* dans les produits alimentaires**

Référence du protocole : **12597** version H

**DOMAINE D'APPLICATION**

Tous produits d'alimentation humaine et alimentation pour animaux de compagnie,  
à l'exclusion du lait cru, des boissons et des produits d'alimentation du bétail.

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune.

**METHODE DE REFERENCE**

**Norme NF ISO 16649-2** (Juillet 2001) : Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive – Partie 2 : technique de comptage des colonies à 44°C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronate (indice de classement V08-031-2).

**Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "JBESLIN", written over a horizontal line.

**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](mailto:certification@afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

## PRINCIPE DE LA METHODE

TEMPO EC est un test automatisé sur le système TEMPO, permettant de dénombrer *Escherichia coli* en 24h dans les produits alimentaires. TEMPO EC est composé d'un flacon de milieu de culture et d'une carte, spécifiques à la numération d'*E.coli*.

Le système TEMPO est composé de deux postes d'activité distincts :

- Un poste de préparation pour l'ensemencement, avec distribution d'un échantillon alimentaire dilué dans un flacon de milieu de culture, puis remplissage et scellage des cartes TEMPO au moyen du TEMPO Filler.
- Un poste de lecture pour effectuer la lecture et l'interprétation des cartes TEMPO par l'intermédiaire du TEMPO Reader.

Au cours de l'incubation, les *E. coli* présents dans la carte dégradent le substrat du milieu de culture et permettent l'apparition d'un signal fluorescent détecté par le TEMPO Reader. En fonction du nombre et de la taille des puits positifs, le système TEMPO déduit le nombre d' *E. coli* présents au départ dans l'échantillon selon un calcul basé sur la technique NPP (Nombre le Plus Probable).

## HISTORIQUE DE VALIDATION

### NOTE 1

En mai 2007, un protocole spécifique a été développé pour les poudres de lait, incluant le diluant secondaire tampon MOPS à la place de l'eau distillée (Cf. notice du fabricant pour les modalités précises)

Cette modification a entraîné la réalisation d'essais complémentaires par tierce partie sur les matrices "poudre de lait". Les résultats de ces essais figurent au chapitre exactitude relative.

### NOTE 2

En janvier 2009, la validation de la méthode TEMPO®EC a été reconduite. Depuis la précédente validation, la méthode n'a pas été modifiée et la méthode prise en référence est inchangée. Aucun essai complémentaire n'a été réalisé.

## 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 2004 en inoculant artificiellement 5 produits alimentaires avec une souche d' *Escherichia coli* d'origine alimentaire, isolée d'une saucisse de Toulouse (cf tableau ci-dessous).

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**, aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants : 10 à 50, 50 à 100, 100 à 500, 500 à 1 000, 1 000 à 10 000 UFC/g.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice / souche	Droite de régression
Produits carnés	Steak haché / <i>E.coli</i>	$y = 0,51 + 0,89x$ N=10 R = 0,96
Aliments pour animaux de compagnie	Croquettes pour chat / <i>E.coli</i>	$y = 0,40 + 1,17x$ N=10 R = 0,97
Fruits et végétaux	Carottes rapées / <i>E.coli</i>	$y = - 0,03 + 1,07x$ N=10 R = 0,96
Produits laitiers	Crème pâtissière / <i>E.coli</i>	$y = 0,47 + 0,91x$ N=10 R = 0,99
Produits de la mer	Filet de poisson cru congelé / <i>E.coli</i>	$y = - 0,05 + 1,14x$ N=10 R = 1,00

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

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

### Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2004. L'interprétation statistique a porté sur 50 résultats dont 25 échantillons naturellement contaminés, et 25 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, aliments pour animaux de compagnie, fruits et végétaux, produits laitiers et produits de la mer.

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **2 méthodes**.

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

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination en log UFC/g
Produits carnés	1,92 à 4,44
Aliments pour animaux de compagnie	1,74 à 3,92
Fruits et végétaux	1,00 à 4,18
Produits laitiers	1,39 à 4,31
Produits de la mer	1,39 à 3,22

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

$$y = 0,99 x + 0,35$$

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

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

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

Les limites de répétabilité (en log) obtenues pour la méthode alternative et la méthode de référence sont les suivantes :

Méthode alternative

$$r = 0,52$$

Méthode de référence

$$r = 0,176$$

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

$$D = 0,26$$

### Essais complémentaires réalisés en 2007 sur les poudres de lait avec le protocole spécifique:

Des essais ont été réalisés avec le nouveau protocole "poudres de lait", sur 30 échantillons contaminés par des souches stressées, avec une lecture après 24-27 heures d'incubation.

L'équation de la droite de régression entre la méthode TEMPO EC et la méthode de référence, pour cette catégorie d'échantillons "poudres de lait", est la suivante :

$$y = 1,09 x - 0,20$$

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

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

La répétabilité pour les deux méthodes et le biais entre les deux méthodes ont été déterminés selon le mode de calcul précisé ci-dessus.

Les limites de répétabilité (en log) obtenues pour la méthode alternative et la méthode de référence sont les suivantes :

Méthode alternative

$$r = 0,352$$

Méthode de référence

$$r = 0,176$$

Le biais (en log) entre les deux méthodes (méthode alternative–méthode de référence) est  $D = 0,05$ .  
Ce biais est non significatif.

**Conclusion pour la linéarité et l'exactitude relative :**

Les études de linéarité et d'exactitude montrent que les résultats obtenus avec la méthode TEMPO EC sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence NF EN ISO 16649-2, avec un meilleur recouvrement des *E. coli* par la méthode alternative.

Pour les poudres de lait, l'utilisation du tampon MOPS plutôt que l'eau distillée apparaît plus favorable pour le dénombrement d'*E. coli* avec TEMPO EC.

**SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)**

**Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement**

- Sur 30 souches d'*E. coli* testées, les 28 souches présentant des colonies caractéristiques par méthode de référence sont également détectées par TEMPO EC. Les 2 souches d'*E. coli* ( $\beta$ -glucuronidase négative) ne produisant pas de colonies caractéristiques sur TBX, ne sont pas détectées par TEMPO EC.
- Le résultat de dénombrement des souches pures par TEMPO EC est plus proche de celui obtenu sur milieu non sélectif (PCA), que de celui obtenu sur milieu sélectif TBX, ce qui confirme le meilleur recouvrement des souches d'*E. coli* en méthode TEMPO EC par rapport à la méthode de référence sur milieu TBX.
- L'étude de 20 souches non *E. coli*, réparties parmi 19 espèces bactériennes, n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

**PRATICABILITE**

**Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement**

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

L'obtention des résultats (positifs et négatifs) se fait en 1 jour, avec les 2 méthodes (référence et TEMPO EC).

- **L'intérêt majeur de la méthode TEMPO EC réside :**

- **dans le gain de temps important au niveau de l'analyse et de la lecture :**

Avec TEMPO seulement 4 minutes sont nécessaires à l'analyse d'un échantillon, issu d'une série de 20, contre 11 minutes avec la méthode de référence.

- **dans le gain de temps de formation :**

La durée de formation d'un opérateur au test TEMPO EC nécessite moins d'une journée.

- **dans le gain de place à l'incubation des cartes TEMPO EC et la gestion facilitée des déchets :**

Pour analyser 20 échantillons, un portoir de 20 cartes tempo mesure 22,5 cm x 10,5 cm ; la méthode de référence, implique la réalisation de 120 boîtes, soit 20 piles de 6 boîtes de pétri.

- **dans la traçabilité complète de l'analyse assurée du poste de préparation des échantillons jusqu'au rendu de résultats par le TEMPO Reader.**

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2004 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé contaminés artificiellement avec une souche de *E.coli* 94 isolée de lait cru, aux 4 niveaux suivants :

- 0 UFC/ml
- 10 à 100 UFC/ml
- 100 à 1 000 UFC/ml
- 1 000 à 10 000 UFC/ml

Les laboratoires ont testé, par chacune des **deux méthodes**, **deux réplicats par niveau** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants, pour une dilution au 1/40<sup>ème</sup> du TEMPO EC :

Niveau de contamination (UFC/ml)	Nombre d'échantillons exploités*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
10 à 100	22*	0,47	0,37	0,82	0,72	0,02
100 à 1 000	24	0,15	0,18	0,32	0,29	0,14
1 000 à 10 000	24	0,22	0,39	0,32	0,41	0,31

(\*) Les échantillons d'un laboratoire n'ont pas été exploités car il y a eu probablement une inversion pour un échantillon entre le niveau 0 et le niveau 1 lors de la réalisation méthode de référence.

### Conclusion

L'étude interlaboratoire montre que les résultats avec la méthode alternative sont comparables aux résultats obtenus par la méthode de référence, avec un meilleur recouvrement des *E. coli* par la méthode TEMPO® EC.

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](http://www.afnor-validation.org)