



**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 12/17 – 12/05**

<b>Date de validation :</b>	<b>08.12.2005</b>
<b>Date de reconduction :</b>	<b>04.12.2009</b>
<b>Fin de validité :</b>	<b>08.12.2013</b>

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

**BIOMERIEUX**  
Chemin de l'Orme  
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® TC**

**Méthode validée pour le dénombrement des coliformes totaux  
dans les produits alimentaires**

Référence du protocole : 12599 version F

**DOMAINE D'APPLICATION**

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

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune.

**METHODE DE REFERENCE**

**NF ISO 4832 (2006)** - Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes - Méthode par comptage des colonies.

**Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN**

**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 TC est un test automatisé sur le système TEMPO, permettant de dénombrer les coliformes dans les produits d'alimentation humaine et aliments pour animaux de compagnie (sauf produits exclus du domaine d'application).

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.

Le milieu de culture comporte un substrat fluorescent qui émet à pH neutre un signal détecté par le TEMPO Reader. Au cours de l'incubation, les coliformes présents dans la carte assimilent les éléments nutritifs du milieu de culture, entraînant une baisse de pH et l'extinction du signal fluorescent. En fonction du nombre et de la taille des puits positifs, le système TEMPO déduit le nombre de coliformes présents au départ dans l'échantillon selon un calcul basé sur la technique NPP (Nombre le Plus Probable).

### NOTE : Etude de reconduction de 2009

Depuis la dernière validation, le protocole de la méthode TEMPO TC n'a pas été modifié. La méthode de référence et le protocole de validation sont inchangés. Aucun essai complémentaire n'a été réalisé dans le cadre de cette étude de reconduction.

## 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,  $5 \cdot 10^3$ ,  $5 \cdot 10^4$  UFC/g.

Les résultats obtenus sont les suivants, avec mise en œuvre de dilutions combinées (1/40, 1/400, 1/4000) :

Catégorie d'aliments	produit alimentaire souche	Droite de régression
Produits carnés	Steak haché / <i>Klebsiella oxytoca</i>	$Y = 0,072 + 0,98 X$
Aliments pour animaux de compagnie	Tablettes au bœuf pour chien / <i>Citrobacter freundii</i>	$Y = -0,172 + 1,053 X$
Produits végétaux	Concombre tranché / <i>Escherichia coli</i>	$Y = -0,723 + 1,219 X$
Produits laitiers	Crème pâtissière / <i>Enterobacteragglomerans</i>	$Y = -0,133 + 1,071 X$
Produits de la mer	Poisson cru / <i>Enterobacter cloacae</i>	$Y = -0,562 + 1,132 X$

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

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

### Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2005. L'exploitation statistique a porté au total sur 76 résultats interprétables provenant de 72 échantillons naturellement contaminés et 4 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

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

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 (log UFC/g)
produits carnés	1,00 à 4,63
aliments pour animaux de compagnie	1,00 à 5,43
produits végétaux	1,00 à 7,11
produits laitiers	1,52 à 5,48
produits de la mer	1,40 à 5,04

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,975 X - 0,25$$

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.

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

Méthode alternative	Méthode de référence
<b>r = 0,440</b>	<b>r = 0,176</b>

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

D = -0,19 si l'on prend la médiane ou D = -0,30 si on prend la moyenne des biais individuels.

Ce biais est acceptable.

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

Les études de linéarité et d'exactitude montrent que les résultats obtenus avec la méthode TEMPO TC sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence NF ISO 4832, avec toutefois une limite de répétabilité de la méthode alternative supérieure à celle de la méthode de référence.

## SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

- 26 souches de coliformes ont été détectées sur 30 testées. Les souches non reconnues sont :
  - 1 souche de *Enterobacter sakazakii*
  - 1 souche de *Escherichia hermanii* (phénotype lactose négatif),
  - 2 souches de *Hafnia alvei* (phénotype lactose négatif).

Sur la base de la définition du groupe des coliformes comme étant des entérobactéries de phénotype [lactose]<sup>positif</sup>, la non détection de 3 de ces souches ne met pas en défaut la méthode alternative.

- L'étude de 30 souches non coliformes a montré des réactions avec 5 souches suivantes :
  - 3 souches de *Salmonella*,
  - 1 souche de *Lactobacillus paracasei*,
  - 1 souche de *Proteus mirabilis*.

Remarque : 11 souches non cibles ont montré une croissance sur milieu VRBL (milieu de la méthode de référence), incluant les 5 souches détectées par la méthode TEMPO.

**Conclusion pour la sélectivité :** la méthode TEMPO TC montre une spécificité et une sélectivité supérieures à celles de la méthode de référence.

## PRATICABILITE

- **Délai d'obtention des résultats :**  
L'obtention des résultats (positifs et négatifs) se fait en 1 jour, avec les 2 méthodes (référence et TEMPO TC).
- **L'intérêt majeur de la méthode TEMPO TC 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 10 minutes avec la méthode de référence.
  - **dans le gain de temps de formation :**  
La durée de formation d'un opérateur au test TEMPO TC nécessite moins d'une journée.
  - **dans le gain de place à l'incubation des cartes TEMPO TC 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 2005 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche d'*E. coli* aux 4 niveaux suivants :

- niveau 0 : <10 UFC/ml
- niveau 1 : 100 à 1 000 UFC/ml
- niveau 2 : 1 000 à 10 000 UFC/ml
- niveau 3 : 10 000 à 100 000 UFC/ml

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

Les résultats obtenus sont les suivants :

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative					
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r		Reproductibilité R		Biais	
				Dilution 1/40	Dilution 1/400	Dilution 1/40	Dilution 1/400	Dilution 1/40	Dilution 1/400
Niveau 1	12	0,226	0,274	0,458	/	0,500	/	-0,05	/
Niveau 2	12	0,161	0,183	0,277	0,371	0,392	0,550	0,08	-0,16
Niveau 3	12	0,144	0,157	0,319	0,279	0,445	0,308	0,16	0,02

### Conclusion

L'étude interlaboratoire montre que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables à ceux obtenus avec la méthode de référence. Cependant, les limites de répétabilité et de reproductibilité de la méthode alternative sont supérieures à celles de 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](http://www.afnor-validation.org)