



**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 12/21 – 12/06

Date de validation : 15.12.2006

Fin de validité : 15.12.2010

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® EB

Méthode validée pour le dénombrement des Enterobactéries dans les produits alimentaires

Référence du protocole : **12596 version E**

DOMAINE D'APPLICATION

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

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF ISO 21528-2 (décembre 2004) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* – Partie 2 : méthode par comptage des colonies.

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

**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 - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

TEMPO EB est un test automatisé sur le système TEMPO, permettant de dénombrer les *Enterobacteriaceae* 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 entérobactéries présentes 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 d'entérobactéries présentes au départ dans l'échantillon selon un calcul basé sur la technique NPP (Nombre le Plus Probable).

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 2006 sur les 5 combinaisons matrice/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, $5 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$ UFC/g.

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

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Steack haché / <i>Enterobacter cloacae</i>	$Y = 1,114 X - 0,351$
Ovoproduits	Coule d'oeuf / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	$Y = 1,045 X - 0,091$
Produits laitiers	Lait / <i>Escherichia coli</i>	$Y = 1,102 X - 0,181$
Produits de la mer et végétaux	Terrine de poisson / <i>Citrobacter freundii</i>	$Y = 1,096 X - 0,299$
Alimentation des animaux de compagnie	Pâté pour chien / <i>Hafnia alvei</i>	$Y = 1,004 X - 0,012$

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

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

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2006. L'exploitation statistique a porté au total sur 63 résultats interprétables provenant tous d'échantillons naturellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, alimentation pour animaux de compagnie, ovoproduits, produits laitiers, produits de la mer et végétaux.

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	2,08 à 6,52
aliments pour animaux de compagnie	3,36 à 5,69
ovoproduits	1,54 à 6,08
produits laitiers	2,70 à 6,40
produits de la mer et végétaux	1,40 à 5,98

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 1,020 X - 0,037$$

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 obtenues pour la méthode alternative et la méthode de référence sont les suivantes :

Méthode alternative

r = 0,382

Méthode de référence

r = 0,205

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

D = 0,050 si on prend la moyenne des biais individuels. 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 EB sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence NF EN ISO 21528-2, avec toutefois une limite de répétabilité de la méthode alternative supérieure à celle de la méthode de référence (sauf pour la catégorie ovoproduits).

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 29 souches d'*Enterobacteriaceae* ont été détectées sur 30 testées. La souche non reconnue est une souche de *Rhanella aquatilis*, qui n'a répondu ni sur milieu VRBG (méthode de référence) et ni par la méthode TEMPO EB.
- De plus une souche *Citrobacter diversus* ne s'est pas développée sur VRBG mais a été dénombrée par la méthode TEMPO EB et une autre souche *Citrobacter diversus* a été dénombrée par les deux méthodes.
- L'étude de 21 souches non *Enterobacteriaceae* a montré des réactions positives avec deux souches de *Xanthomonas maltophilia* à la fois par la méthode alternative et la méthode de référence.

Conclusion

La méthode TEMPO EB montre une spécificité satisfaisante.

PRATICABILITE

- **Délai d'obtention des résultats** : L'obtention des résultats **positifs** et **négatifs** se fait en 24 heures avec la méthode alternative contre 72 heures avec la méthode de référence.
- **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 19 minutes avec la méthode de référence.
- **Gain de temps de formation** : la durée de formation d'un opérateur, au test TEMPO EB nécessite moins d'une journée.
- **Gain de place à l'incubation des cartes TEMPO et gestion facilité des déchets** : le volume des consommables pour la méthode TEMPO EB est négligeable par rapport au volume des consommables nécessaires pour la méthode ISO 21528-2.
- **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 2006 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche d' *Escherichia coli* aux 4 niveaux suivants :

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

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
Niveau 1	8	0,398	0,456	0,480	0,480	-0,06
Niveau 2	9	0,133	0,202	0,565	0,569	0,06
Niveau 3	9	0,166	0,226	0,160	0,397	0,08

* Quatre laboratoires ont été exclus pour le niveau 1 (1 pour non respect du protocole et 3 pour une température à réception supérieure à 8,4°C) et trois laboratoires pour les niveaux 2 et 3 (pour une température à réception supérieure à 8,4°C)

Conclusion

Les biais entre la méthode TEMPO® EB et la méthode de référence montrent des valeurs faibles comprises entre – 0,09 et + 0,08, et apparaissent non significatifs.

Les limites de répétabilité de la méthode TEMPO® EB sont comprises entre 0,588 et 0,160, celles de la méthode de référence entre 0,488 et 0,105.

Les limites de reproductibilité de la méthode TEMPO® EB sont comprises entre 0,588 et 0,397, celles de la méthode de référence entre 0,512 et 0,173.

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