



**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 12/28 – 04/10

Date de validation : 01.04.2010
Fin de validité : 01.04.2014

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

BIOMERIEUX
Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

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

TEMPO STA
Ref. 80 002

Référence du protocole : 12595 F

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et aliments pour animaux de compagnie.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE(S) DE REFERENCE

NF EN ISO 6888-2 (1999) et son amendement A1 (2003) – Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) - Partie 2 : technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène.

**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® STA est un test automatisé sur le système TEMPO permettant le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive en 24 à 27 heures. Le test est composé d'un flacon de milieu de culture et d'une carte, spécifique à la numération des staphylocoques.

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 staphylocoques 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 du type des puits positifs, le système TEMPO déduit le nombre de staphylocoques présents 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 2009 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 : 200, 1 000, 5 000, 25 000, 125 000 UFC/g.

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

Dilutions combinées :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Steak haché	<i>Staphylococcus aureus</i> Ad 160	$Y = 1,086 X - 0,370$
Terrine pour chien	<i>Staphylococcus aureus</i> Ad 155	$Y = 1,106 X - 0,512$
Coule d'oeuf	<i>Staphylococcus aureus</i> Ad 159	$Y = 1,096 X - 0,324$
Lait pasteurisé	<i>Staphylococcus aureus</i> Ad 468	$Y = 1,096 X - 0,324$
Filet de julienne	<i>Staphylococcus aureus</i> A00M072	$Y = 1,077 X - 0,322$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

Dilutions usuelles :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Steak haché	<i>Staphylococcus aureus</i> Ad 160	$Y = 1,095 X - 0,337$
Terrine pour chien	<i>Staphylococcus aureus</i> Ad 155	$Y = 1,075 X - 0,256$
Coule d'oeuf	<i>Staphylococcus aureus</i> Ad 159	$Y = 1,105 X - 0,344$
Lait pasteurisé	<i>Staphylococcus aureus</i> Ad 468	$Y = 1,100 X - 0,318$
Filet de julienne	<i>Staphylococcus aureus</i> A00M072	$Y = 1,057 X - 0,264$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2009. L'exploitation statistique a porté sur 65 résultats interprétables provenant de 36 échantillons naturellement contaminés et 29 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, divers (plats traiteurs, pâtisseries, etc.), et aliments pour animaux de compagnie.

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)*
Produits carnés	1,49 à 4,73
Alimentation des animaux de compagnie	1,32 à 5,54
Produits laitiers	1,00 à 4,69
Divers	1,32 à 4,96
Produits de la mer	2,26 à 5,53

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 1,003X - 0,120$$

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
r = 0,352

Méthode de référence
r = 0,176

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

$$D = - 0,080 \text{ (si l'on prend la médiane)}$$

Ce biais est faible.

Conclusion pour la linéarité et l'exactitude relative :

Les études de linéarité et d'exactitude montrent que les résultats obtenus avec la méthode TEMPO STA sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence, avec toutefois des limites de répétabilité de la méthode alternative supérieures à celles de la méthode de référence

Conservation des cartes TEMPO à 4°C

Les résultats obtenus après stockage à 4°C pendant 24 h et 48 h ont été comparés à ceux obtenus immédiatement après incubation.

La conservation des cartes TEMPO STA pendant 24 à 48 h à 4°C ne modifie pas le résultat observé immédiatement après incubation.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 30 souches de staphylocoques à coagulase positive ont été détectées sur 31 testées. La souche non reconnue était une souche de *S. intermedius* CIP 81.60 uniquement dénombrée par la méthode de référence. Une deuxième souche, *S. intermedius*, a été testée (CIP 81.67) et a donné un résultat négatif par les deux méthodes. Il est à noter que les souches *S. aureus* 6 et 605 ne sont énumérées par la méthode TEMPO STA qu'à partir de la suspension tryptone-sel supplémentée en lait.
- L'étude de 24 souches n'appartenant pas au groupe des staphylocoques à coagulase positive 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 la méthode alternative contre 1 à 2 jours avec la méthode de référence.

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

- dans le **gain de temps important au niveau de l'analyse et de la lecture**, l'utilisation de la méthode TEMPO STA divisant par deux le temps d'analyse dans le cas d'une grande série (20 échantillons),
- dans le **gain de place** à l'incubation des cartes TEMPO® STA et la **gestion facilitée des déchets**,
- dans la **traçabilité complète de l'analyse**, assurée au niveau du TEMPO Filler et du TEMPO Reader.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 16 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Staphylococcus aureus* aux 4 niveaux suivants :

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

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

Les résultats obtenus, calculés conformément au projet d'amendement 1 de la norme EN ISO 16140 :2003 (version prA1 :2009), sont les suivants :

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Ecart type de Répétabilité S_r	Ecart type de Reproductibilité S_R	Ecart type de Répétabilité S_r	Ecart type de Reproductibilité S_R	Biais
Niveau 1	13*	0,1647	0,1629	0,1503	0,2068	-0,1808
Niveau 2	15*	0,0638	0,1445	0,1498	0,1561	-0,2616
Niveau 3	16	0,1266	0,1941	0,1184	0,1471	0,0050

*3 laboratoires n'ont pas analysé la dilution 1/10 pour la méthode de référence. Les résultats n'étaient pas interprétables pour les trois laboratoires au niveau 1, et pour deux laboratoires au niveau 2.

Note : Limite de répétabilité $r = 2,8 S_r$, avec S_r écart-type de répétabilité
 Limite de reproductibilité $R = 2,8 S_R$, avec S_R écart-type de reproductibilité

Conclusion

L'étude interlaboratoire montre que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables à ceux obtenus avec 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