

SOCIETE BIOMERIEUX

Service Recherche &
Développement Industrie
Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

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

Rapport de synthèse

**Reconduction de la validation ISO 16140 de
la méthode TEMPO® pour le dénombrement
des *Escherichia coli* (TEMPO® EC)**

Ce rapport comprend 36 pages dont 5 annexes.

La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

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 TEMPO EC -
Version 0 (30 avril 2009)**

ADRIA DEVELOPPEMENT

Creac'h Gwen - F. 29196 QUIMPER Cedex - Tél. (33) 02.98.10.18.18 - Fax (33) 02.98.10.18.08

E-mail : adria.developpement@adria.tm.fr - Site web : <http://www.adria.tm.fr> - Site réservé adhérents : <http://www.clubiaa.net>

ASSOCIATION LOI DE 1901 - N° SIRET 306 964 271 00036 - N° EXISTENCE 532900006329 - N°TVA FR4530696427100036

Sommaire

1	RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE	4
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	6
1.5	Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale	6
1.5.1	Etude comparative des méthodes	6
1.5.2	Etude interlaboratoire	16
1.5.3	Conclusion	19
2	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	20
	<i>Annexe 1 - Linéarité : graphiques bidimensionnels et droites de régression</i>	26
	<i>Annexe 2 - Exactitude relative : résultats bruts</i>	28
	<i>Annexe 3 - Exactitude relative : graphiques bidimensionnels et droites de régression</i>	31
	<i>Annexe 4 - Spécificité et sélectivité : résultats</i>	34
	<i>Annexe 5 - Liste des laboratoires collaborateurs</i>	36

Avant Propos

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

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

- **Fabricant :** **Société BIOMERIEUX**
Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

- **Laboratoire expert :** **ADRIA Développement**
ZA Creac'h Gwen
29196 QUIMPER Cedex

- **Méthode à valider :** **Méthode TEMPO® EC pour le dénombrement des *Escherichia coli***

- **Référentiel de validation :** Norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives

- **Méthode de référence[♦] :** NF EN ISO 16649-2 (juillet 2001) : Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive - Partie 2 : technique de comptage des colonies à 44°C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -glucuronate

- **Etendue de la validation :** 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.

[♦] 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

La Société BIOMERIEUX a obtenu, le 4 février 2005 (n° attestation BIO 12/13-02/05), la validation de la méthode **TEMPO® EC** pour le **dénombrement des *Escherichia coli*** dans les produits d'alimentation humaine et dans les produits pour animaux de compagnie, selon la norme ISO 16140.

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

TEMPO est une solution automatisée qui permet de réaliser le dénombrement des germes indicateurs de la qualité en 24 h dans les produits alimentaires tels que les produits laitiers, les volailles, les viandes, les plats préparés, les confiseries, les surgelés et les aliments divers.

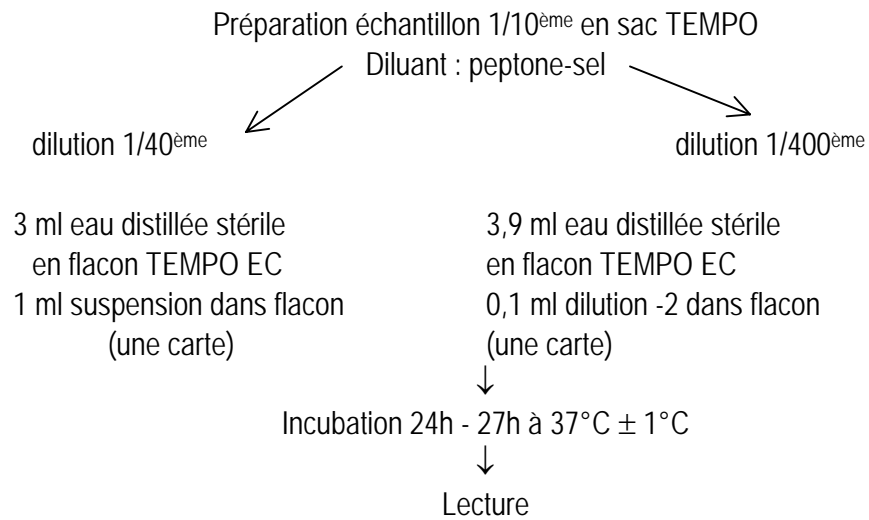
La numération des micro-organismes est basée sur la méthode NPP : Nombre le Plus Probable associée à la technologie des cartes TEMPO.

Le système TEMPO réalise l'interprétation de la croissance microbienne de chaque carte TEMPO et calcule le résultat des numérations (UFC/g).

TEMPO est composé de deux postes d'activité distincts :

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

Le protocole détaillé est présenté ci-après :

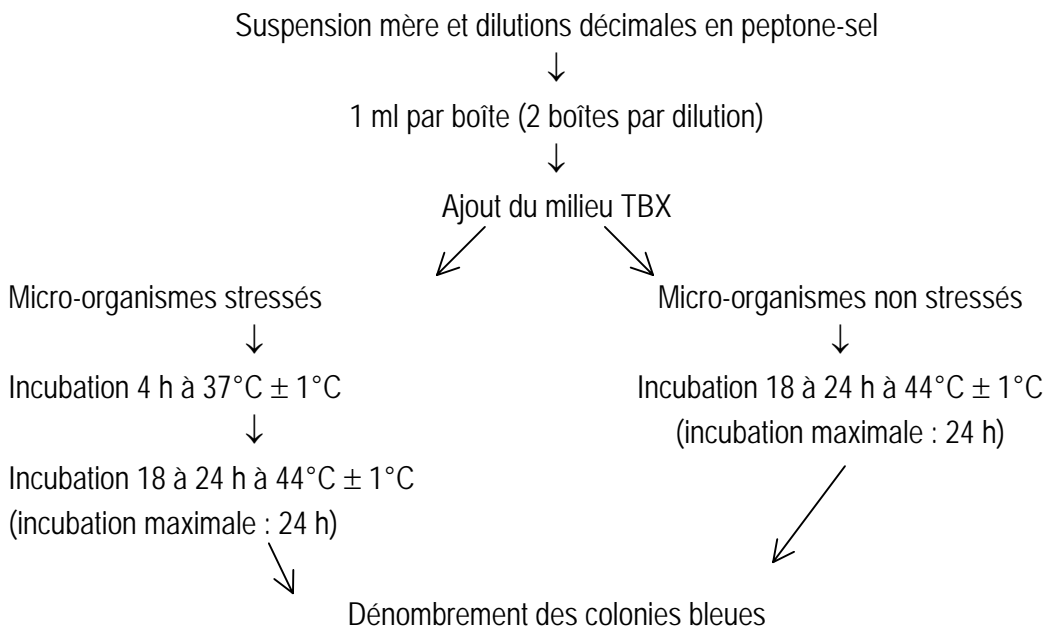


La dilution au 1/40ème permet une numération dans la gamme 10 à 49 000 ufc/g.

La dilution au 1/400ème permet une numération dans la gamme 100 à 490 000 ufc/g.

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

La méthode de référence utilisée est la méthode NF ISO 16649-2 (juillet 2001) présentée ci-après :



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

La notice de la méthode TEMPO EC présente le protocole pour obtenir des performances analogues à celles obtenues selon les protocoles AOAC® 966.23 et 966.24. Elle intègre également le protocole obligatoire pour l'analyse des échantillons de poudre de lait (matière première ou lait en poudre) avec un diluant spécifique.

1.5 Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale

1.5.1 Etude comparative des méthodes

1.5.1.1 Etude de linéarité

□ **Matrices utilisées et protocoles de contamination**

Cinq catégories de produits ont été analysées (une matrice par catégorie), cinq niveaux de contamination ont été testés et deux répétitions ont été réalisées par échantillon. La souche utilisée est *Escherichia coli* 1, souche isolée d'une matrice alimentaire.

Les matrices suivantes ont été utilisées :

- steak haché,
- croquettes pour chat,
- carottes râpées,
- crème pâtissière,
- filet de poisson cru congelé.

□ **Résultats**

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie et les droites de régression sont donnés en annexe 1

□ **Interprétations statistiques selon la norme ISO 16140**

Tableau 1 - Récapitulatif de l'étude de linéarité

Matrice	Tests statistiques						
	R	Régression utilisée	Rob F.	Valeur critique	Non linéarité P %	Coeff de corrélation	Droite de régression
Steak haché	3,33	OLS 1	7,021	5,41	3	0,962	log Alt = 0,894 log Ref + 0,512
Croquette pour chat	2,75	OLS 1	6,430	5,5	4	0,966	log Alt = 1,170 log Ref - 0,396
Végétaux	3,00	OLS 1	3,825	5,5	9	0,965	log Alt = 1,073 log Ref - 0,030
Crème pâtissière	0,69	GMFR	7,583	5,5	3	0,987	log Alt = 0,910 log Réf + 0,473
Poisson	1,56	GMFR	0,000	5,5	100	0,995	log Alt = 1,138 log Ref - 0,049

Interprétation statistique :

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

□ **Conclusion**

Les valeurs de P sont supérieures à 5% pour les matrices suivantes : carottes râpées et filet de poisson cru congelé.

Le test de non-linéarité apparaît non significatif, permettant de conclure ainsi à la linéarité de la méthode TEMPO pour ces produits.

Le test de non-linéarité apparaît significatif, au risque de 5% et non significatif au risque de 1%, pour les matrices : steak haché, croquettes pour chat et crème pâtissière.

Il est reconnu que le test de non-linéarité « lack of fit » utilisé perd de sa robustesse lorsque le coefficient de corrélation r est élevé ($> 0,90$). Or, le coefficient r est supérieur à 0,96 pour les matrices suivantes : steak haché, croquettes pour chat et crème pâtissière.

La méthode TEMPO[®] EC montre **une linéarité relative satisfaisante**.

1.5.1.2 Exactitude relative

Cinq catégories de produits ont été testées, avec une répartition des produits sur trois types différents.

Dix résultats exploitables par catégorie ont été obtenus. Les analyses ont été réalisées en double, à la fois, par la méthode TEMPO® EC et la méthode NF ISO 16649-2. Des produits naturellement contaminés et artificiellement ont été analysés pour cette étude.

Pour les contaminations artificielles, des stress ont été appliqués aux souches avant inoculation. L'intensité du stress a été déterminée par différence de dénombrements entre milieux TSYEA et TBX.

□ **Nombre et nature des échantillons**

Au total, 75 échantillons ont été analysés et 50 résultats ont été exploités.

Tableau 2 - Nombre d'échantillons analysés et exploités par catégorie

Catégorie	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons exploités
Produits carnés	11	10
Aliments pour animaux de compagnie	10	10
Fruits et végétaux	26	10
Produits laitiers	11	10
Produits de la mer	17	10

Des inoculations ont été réalisées, les souches utilisées, les stress appliqués sont donnés tableau 3.

**Tableau 3 - Souches utilisées, modes de stress appliqués
et évaluation du stress**

N° éch.	Souche	Origine	Stress appliqué	Δ log (TSYE/TBX)
240 241 242 243 264	<i>Contamination par contact avec des laits crus naturellement contaminés</i>		Congélation	/
244 245	<i>E. coli</i> 108	Bouchée à la reine	Traitement thermique 56°C - 15 min	0,44
250 251 252	<i>E. coli</i> 144	Paella	Traitement thermique 56°C - 15 min	0,77
253 254 255	<i>E. coli</i> 19	Carottes râpées	Congélation - 20°C 1 mois	1,45
271	<i>E. coli</i> 108	Bouchée à la reine	Traitement thermique 56°C - 15 min	1,09
272	<i>E. coli</i> 123	Foie de veau	Traitement thermique 56°C - 15 min	0,39
273	<i>E. coli</i> 21	Poitrine de porc demi-sel	Traitement thermique 56°C - 15 min	0,47
274	<i>E. coli</i> 13	Steak haché	Traitement thermique 56°C - 15 min	0,78
275	<i>E. coli</i> 13	Steak haché	Congélation - 20°C 2 mois	3,5
276	<i>E. coli</i> 21	Poitrine de porc demi-sel	Congélation - 20°C 2 mois	1,49
277	<i>E. coli</i> 123	Foie de veau	Congélation - 20°C 2 mois	1,84
278	<i>E. coli</i> Ad 228	Poisson	Stress osmotique (solution 35 ‰ NaCl)	0,36
279 280	<i>E. coli</i> 93	Cabillaud aux petits légumes	Stress osmotique (solution 35 ‰ NaCl)	> 3,15
293 294	<i>E. coli</i> 19	Dés de pommes déshydratés	Dessiccation	(1) (2)

(1) La contamination a été réalisée par contact avec une suspension bactérienne à 10⁵/ml ; le produit a ensuite été laissé à température ambiante pendant 24 h.

(2) Même protocole, mais analyse directement après contact.

□ **Résultats**

Les résultats bruts sont donnés en annexe 2.

Catégorie	Tests statistiques			
	Régression	Equation de la droite	Pente à 1 P %	Ordonnée à 0 P %
Produits carnés	OLS1	$\log \text{TEMPO EC} = 1,17 \log \text{ISO} - 0,18$	16	60
Aliments pour animaux de compagnie	OLS1	$\log \text{TEMPO EC} = 1,00 \log \text{ISO} + 0,60$	99	20
Fruits et végétaux	OLS2	$\log \text{TEMPO EC} = 0,77 \log \text{ISO} + 0,31$	3	23
Produits laitiers	GMFR	$\log \text{TEMPO EC} = 0,93 \log \text{ISO} + 0,46$	75	38
Produits de la mer	OLS1	$\log \text{TEMPO EC} = 0,81 \log \text{ISO} + 0,65$	10	4
Tous produits	OLS1	$\log \text{TEMPO EC} = 0,99 \log \text{ISO} + 0,35$	95	6

Interprétation statistique :

$P > 5\%$: pas significatif

$1\% < P < 5\%$: significatif

$0,1\% < P < 1\%$: très significatif

$P < 0,1\%$: hyper significatif

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	1,85 à 4,83
Aliments pour animaux de compagnie	1,70 à 4,96
Fruits et végétaux	1,00 à 4,18
Produits laitiers	1,30 à 4,57
Produits de la mer	1,30 à 3,30

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie et les droites de régression sont donnés en annexe 3.

□ **Interprétation statistiques selon la norme ISO16140**

Tableau 4- Récapitulatif de l'exactitude relative

Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P %		Coef. corrélation	Droite de régression
									Pente à 1	Ordonnée à 0		
Produits carnés	10	3,5	OLS 1	- 0,184	0,539	1,169	1,537	2,306	16	60	0,962	log Alt = 1,169 log Ref -0,184
Produits laitiers	10	1,25	GMFR	0,463	0,933	0,936	0,333	2,306	75	38	0,829	log Alt =0,936 log Ref + 0,463
Fruits et végétaux	10	0,25	OLS 2	0,314	1,293	0,755	2,640	2,306	3	23	0,950	log Ref = 0,775 log Alt + 0,314
Produits de la mer	10	2,80	OLS 1	0,654	2,447	0,805	1,835	2,306	10	4	0,930	log Alt = 0,805 log Ref +0,654
Aliments pour animaux de compagnie	10	6,00	OLS 1	0,603	1,387	1,002	0,010	2,306	99	20	0,910	log Alt =1,002 log Ref + 0,603
Tous produits	50	2,00	OLS 1	0,355	1,916	0,996	0,062	2,01	95	6	0,903	log Alt =0,995 log Ref + 0,355

Tableau 5 - Calcul du biais et de la limite de répétabilité

Catégorie	Biais D	Répétabilité méthode alternative	Répétabilité méthode de référence
Produits carnés	0,283	0,411	0,117
Produits laitiers	0,130	0,294	0,235
Fruits et végétaux	0,290	0,073	0,294
Produits de la mer	0,105	0,411	0,147
Aliments pour animaux de compagnie	0,620	0,528	0,088
Tous produits	0,263	0,352	0,176

□ **Conclusion**

La pente n'est pas significativement différente de 1.

- au risque de 1% pour toutes les catégories de produits testées ($P > 1\%$),
- au risque de 5% pour toutes les catégories testées, à l'exception des fruits et végétaux ($P = 3\%$).

L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0,

- au risque de 1% pour toutes les catégories de produits testés ($P > 1\%$),
- au risque de 5% pour toutes les catégories testées, à l'exception des produits de la mer ($P = 4\%$).

Les biais entre les deux méthodes varient de 0,130 à,620. Les limites de répétabilité de la méthode alternative sont généralement plus élevées que celles de la méthode de référence.

La méthode TEMPO® EC présente **une exactitude relative satisfaisante** vis à vis de la méthode de référence ISO 16649-2, et permet **un meilleur recouvrement des cellules stressées**.

1.5.1.3 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

□ **Protocole**

La limite de détection a été réalisée à l'aide d'une culture de *E. coli* 1.

Plusieurs niveaux d'inoculation ont été testés, à raison de six réplicats par niveau. Les dénombrements des suspensions ont été effectués en inoculant 30 fois 1 ml de chaque suspension en milieu PCA.

Six mesures indépendantes de diluant peptone-sel ont également été réalisées afin de déterminer le bruit de fond.

□ **Résultats**

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

Tableau 6 - Récapitulatif

Niveau	Nombre d'échantillons "positifs"	Ecart-type So	Biais X0 (médiane des Xoi)
0	0/6	/	/
0,1	3/6	0,005	0,255
0,5	6/6	0,294	0,53
1	6/6	1,074	1,65

Tableau 7

	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 S_0 + X_{00}$	0,26
LOD	$3,3 S_0 + X_0$	0,27
LOQ	$10 S_0 + X_0$	0,31

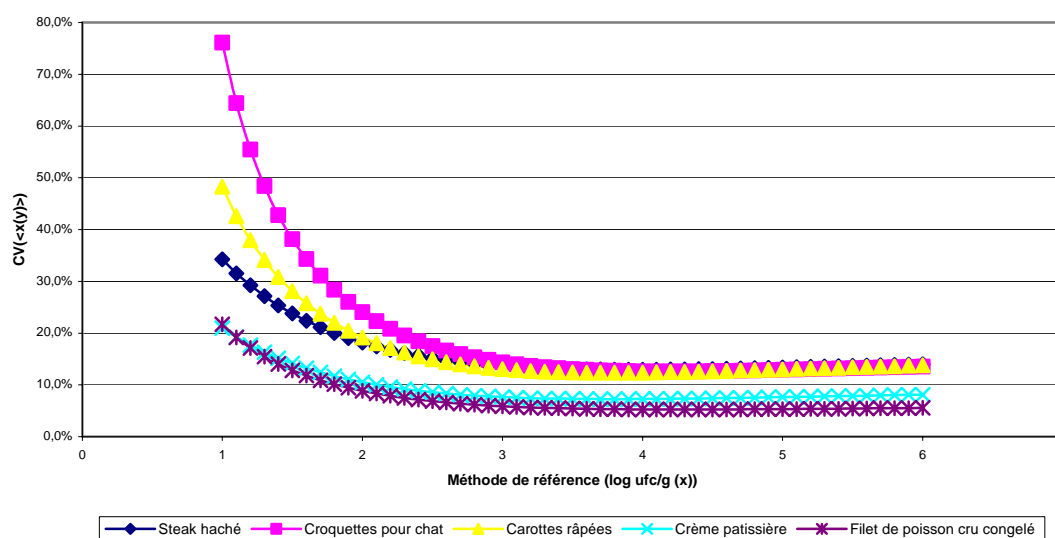
Les valeurs de limite de détection et de limite de quantification obtenues sont satisfaisantes.

1.5.1.4 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 1 - Profils de précision obtenus pour les différentes matrices



1.5.1.5 Spécificité – Sélectivité

□ **Protocole**

Après décongélation et culture en bouillon BHI, 30 souches cibles et 20 souches non cibles ont été testées en double par la méthode alternative et en simple par la méthode de référence.

Un dénombrement des suspensions a été également réalisé sur gélose PCA.

□ **Résultats**

Les résultats bruts sont donnés en annexe 4.

Toutes les souches *E. coli* se développant par formation de colonies bleues sur gélose TBX (β -glucuronidase positive) sont détectées par la méthode TEMPO® EC.

Pour la plupart des souches testées, le dénombrement est supérieur par la méthode TEMPO® EC que par la méthode ISO 16649-2 ; le dénombrement TEMPO est davantage en accord avec le résultat obtenu sur gélose PCA. Aucune souche non-cible n'a été détectée par la méthode TEMPO® EC. Les résultats sont en accord avec ceux de la méthode de référence.

□ **Conclusion**

La méthode TEMPO® EC est spécifique et sélective.

1.5.1.6 *Praticabilité*

Tableau 8 - Temps réel de manipulation et flexibilité par rapport au nombre d'échantillons à analyser (en minutes)

Etape	Méthode ISO 16649-2		Méthode TEMPO® EC	
	1 échantillon	20 échantillons	1 échantillon	20 échantillons
Prélèvement	4	45	4	45
Ajout diluant Broyage	2	15	2	15
Préparation des boîtes ⁽¹⁾	0,3	13	/	/
Dilutions Ensemencements	4	64	2	20
Lecture	2,5	90	0,45	2
Temps total	12,8	227	8,45	82
Temps pour 1 échantillon	12,8	11,4	8,45	4,1

Les temps indiqués ne tiennent pas compte de la préparation des milieux qui vient s'ajouter uniquement pour la méthode de référence. La méthode TEMPO utilise le milieu TEMPO EC qui est prêt à l'emploi.

L'utilisation de la méthode TEMPO EC réduit considérablement les temps de manipulation, en particulier au niveau du poste de lecture. Il faut 3 fois moins de temps pour réaliser la méthode TEMPO EC que la méthode ISO 16649-2 lors de l'analyse d'une grande série (20 échantillons).

Il faut également souligner le gain de temps au niveau de la gestion des déchets.

⁽¹⁾ 3 dilutions x 2 boîtes
ADRIA Développement
Synthèse Reconduction
TEMPO EC (Version 0)

Le volume des consommables par la méthode TEMPO EC est négligeable par rapport au volume des consommables nécessaires pour la méthode ISO 16649-2.

L'espace d'incubation nécessaire pour la méthode TEMPO EC est particulièrement restreint par rapport à celui de la méthode ISO 16649-2. Un portoir de 20 cartes TEMPO (20 tests EC) mesure 22.5 cm x 10.5 cm ; pour la méthode ISO 16649-2 (analyse de 20 échantillons), il faut 120 boîtes, soit 20 piles de 6 boîtes de Pétri.

1.5.1.7 Traçabilité des résultats

Une traçabilité complète est assurée au niveau du TEMPO Filler et du TEMPO Reader, à savoir :

- identification de l'échantillon,
- heure de réalisation du test,
- manipulateur ayant réalisé le test,
- lots de réactifs utilisés,
- durée d'incubation écoulée ou restant avant lecture des cartes,
- heure de lecture des cartes,
- nombre de lecture réalisée pour chaque carte,
- manipulateur ayant réalisé la lecture,
- édition des résultats, associant le résultat (UFC/g) à l'échantillon, au paramètre testé et à la date d'analyse,
- transfert possible vers un LIMS (Laboratory Information Management System).

1.5.2 Etude interlaboratoire

1.5.2.1 Préparation

L'étude a été menée sur du lait pasteurisé demi écrémé. Douze laboratoires ont participé à l'étude. La liste est donnée en annexe 5.

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 9 - Synthèse des résultats obtenus par la méthode TEMPO EC (en UFC/g) et la méthode NF ISO 16649-2

Laboratoires	Niveau 0				Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3			
	Méthode de référence		Méthode TEMPO EC		Méthode de référence		Méthode TEMPO EC		Méthode de référence		Méthode TEMPO EC		Méthode de référence		Méthode TEMPO EC	
A	<10	<10	<10	<10	70	50	100	45	660	630	630	570	4300	3500	15000	6000
B	<10	<10	<10	<10	80	85	89	100	530	740	810	830	4700	3700	15000	7800
C	<10	<10	<10	<10	70	75	99	59	600	560	710	950	3400	3400	12000	11000
D	<10	<10	<10	<10	80	45	86	45	730	690	530	900	4400	4100	12000	11000
E	65	<10	<10	<10	<10	85	32	86	560	630	830	710	4800	4200	9100	6000
F	<10	<10	<10	<10	73	68	68	83	550	610	690	1100	7000	7100	6700	9000
G	<10	<10	<10	<10	35	80	68	33	650	690	930	570	4400	3000	12000	7800
H	<10	<10	<10	<10	65	45	73	21	590	470	710	570	5000	6900	11000	9100
I	<10	<10	<10	<10	45	65	71	71	700	510	830	1200	5300	4700	6100	7800
J	<10	<10	<10	<10	95	30	100	130	530	570	730	1100	7100	13000	15000	12000
K	<10	<10	<10	<10	55	70	71	33	360	490	790	810	4700	4600	7800	6000
L	<10	<10	<10	<10	45	65	89	33	430	620	930	830	1700	2300	7800	6000

□ **Interprétation statistique**

➤ **Biais**

Tableau 10 - Valeurs de t(d) obtenues par niveau

Niveau	Biais D	t(d)	t critique	Conclusion
0	/	/	/	/
1	0,02	1,011	2,229 pour n = 11	Biais D non significatif
2	0,14	3,921	2,201 pour n = 12	Biais D significatif
3	0,31	4,222	2,201 pour n = 12	Biais D significatif

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

➤ **Répétabilité**

**Tableau 11 - Valeurs obtenues pour la limite de répétabilité
et valeurs pour le Test F**

Niveau	Limite de répétabilité		F calculé	F critique	P %
	Méthode de référence	Méthode alternative			
1 (n = 11)	0,47	0,82	3,06	2,82	3,8 %
2 (n = 12)	0,15	0,32	4,84	2,69	0,5 %
3 (n = 12)	0,22	0,32	2,15	2,69	10,0 %

➤ **Reproductibilité**

**Tableau 12 - Valeurs obtenues pour la limite de reproductibilité
et valeurs pour le Test F**

Niveau	Limite de reproductibilité		F calculé	F critique	P %
	Méthode de référence	Méthode alternative			
1 (n = 11)	0,37	0,72	3,91	2,97	2,1 %
2 (n = 12)	0,18	0,29	2,57	2,82	6,6 %
3 (n = 12)	0,39	0,41	1,11	2,82	43,5 %

Tableau 13 - Rapports répétabilité / Reproductibilité

Niveau	Répétabilité / reproductibilité Limite de répétabilité	
	Méthode de référence	Méthode alternative
Niveau 1	0,776	0,877
Niveau 2	1,244	0,907
Niveau 3	1,777	1,274

➤ Dispersion entre laboratoires

Tableau 14 - Dispersion entre les laboratoires

	Méthode de référence F calculé	Méthode alternative F calculé	F critique (0, 0,5 ; n-1 ; n)
Niveau 3	4,88	1,87	2,86
Niveau 2	2,10	1,55	2,72
Niveau 1	5,32	2,25	2,72

□ **Discussion**

Il apparaît que les dénombrements obtenus par la méthode TEMPO EC sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par la méthode de référence. Cette observation avait d'ores et déjà été formulée dans le cadre de l'étude préliminaire, plus particulièrement lors de l'étude de spécificité et de sélectivité : les dénombrements des cultures pures obtenus par méthode TEMPO EC étaient davantage en accord avec les dénombrements obtenus sur gélose non sélective que ceux obtenus sur gélose TBX. Aucun résultat faux positif n'est annoté par la méthode TEMPO sur le niveau 0 exempt d'*E. coli*. **La méthode TEMPO EC permet un meilleur recouvrement des cellules *E. coli*.**

Toutefois, **les écarts de dénombrement observés entre la méthode de référence et la méthode TEMPO EC sont rarement supérieurs à 0,5 log UFC/g.** Ces observations permettent d'appréhender les biais observés entre la méthode de référence et la méthode TEMPO EC lors du calcul d'exactitude relative pour les niveaux 2 et 3.

La limite de répétabilité de la méthode TEMPO EC ne diffère pas de celle de la méthode de référence pour le niveau 3. Elle n'apparaît pas

significativement différente au risque de 3,8 % pour le niveau 1. Elle diffère pour le niveau 2 mais reste satisfaisante avec une valeur de 0,32.

La limite de reproductibilité de la méthode TEMPO EC ne diffère pas de celle de la méthode de référence pour les niveaux 2 et 3. Elle n'apparaît pas significativement différente au risque de 2,1 % pour le niveau 1.

Il est à noter que la méthode de référence et la méthode TEMPO EC, qui sont comparées dans le cadre de cette validation, sont **basées sur des principes différents**. Ces derniers sont respectivement le dénombrement des colonies sur boîtes et le principe du Nombre le Plus Probable (NPP). **Ainsi, pour chaque grand puits positif supplémentaire dans une carte TEMPO utilisée à la dilution 1/40ème, 14 à 15 UFC/g sont incrémentés aux résultats**. Au contraire, la méthode de référence s'appuie sur des moyennes pondérées permettant de lisser les écarts présents sur les faibles nombres. Les niveaux d'inoculation utilisés ont permis un dénombrement à partir d'un faible nombre de dilutions successives (~2).

Ces observations permettent d'appréhender les différences entre les limites de répétabilité et de reproductibilité observées entre les deux méthodes. Toutefois, ces limites montrent des valeurs satisfaisantes pour la méthode TEMPO EC.

La valeur du rapport « répétabilité/reproductibilité », souhaitée selon la norme ISO 16140, est systématiquement observée pour tous les niveaux testés par la méthode TEMPO EC.

Enfin, la dispersion des résultats entre laboratoires est meilleure par la méthode TEMPO EC que par la méthode de référence pour l'ensemble des niveaux testés.

1.5.3 Conclusion

- ✓ L'intérêt majeur de la méthode TEMPO EC réside dans le **gain de temps important au niveau de l'analyse et de la lecture**, dans le **gain de place à l'incubation des cartes TEMPO EC** et la **gestion facilitée des déchets** et dans la **simplicité de mise en œuvre** (les laboratoires collaborateurs ont été formés en moins d'une journée).
- ✓ La **méthode TEMPO EC** est **spécifique et sélective**. Lors de l'étude de spécificité et sélectivité, les dénombrements des suspensions de cultures pures sont apparus supérieurs par la méthode TEMPO EC que par la

méthode de référence ISO 16649-2, étant ainsi davantage en accord avec les dénombrements obtenus sur gélose non sélective.

- ✓ Les **valeurs de limite de détection et de limite de quantification** obtenues apparaissent **satisfaisantes**.
- ✓ La linéarité de la méthode TEMPO EC sur l'ensemble des catégories testées ne peut être réfutée.
- ✓ Les **résultats de l'étude de sensibilité** sont **satisfaisants**.
- ✓ La méthode TEMPO EC présente une **exactitude relative acceptable** vis-à-vis de la méthode de référence ISO 16649-2.
- ✓ La méthode TEMPO EC permet un **meilleur recouvrement des cellules *E. coli*** que la méthode de référence. Toutefois, les écarts de dénombrement observés entre la méthode de référence et la méthode TEMPO EC sont **rarement supérieurs à 0,5 log UFC/g**.
- ✓ Les limites de répétabilité et de reproductibilité de la méthode TEMPO EC sont équivalentes à celles de la méthode de référence pour certains niveaux considérés au cours de ces essais. **Ces limites restent satisfaisantes, offrant systématiquement un rapport « répétabilité / reproductibilité » inférieur ou égal à 2.**
- ✓ Enfin, la dispersion des résultats entre laboratoires est meilleure par la méthode TEMPO EC que par la méthode de référence pour tous les niveaux testés.

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les références et résumés des 8 communications affichées et **4 articles** répertoriés sont présentés ci-après. L'ensemble des études **confirment la fiabilité et les performances de la méthode**.

L'étude menée par Baylis et al (2006) confirme que la méthode TEMPO EC montre une **meilleure aptitude que la méthode ISO 16649-2 à recouvrir les cellules stressées**.

Auteurs	Titre	Résumé et conclusion	Colloque, date
DEVULDER G, MOU M., DOLEANS F. <i>BioMérieux, France</i>	Evaluation of the TEMPO® System versus the ISO Reference Methods for the Enumeration of Total Viable Count, Escherichia coli and Coliforms in a Variety of Dairy Products.	Les performances des méthodes TEMPO TVC, TC et EC ont été comparées à celles des méthodes de référence correspondantes (ISO 4833, ISO 4832 et ISO 16649-2) avec respectivement l'analyse de 161, 358 et 345 échantillons. La concordance entre les méthodes TEMPO et les méthodes de référence est de 95,6 %.	IDF 2006, Shanghai - China
SOHIER D, RANNOU M., GORSE F. <i>ADRIA Développement, France bioMérieux</i>	TEMPO® System: AFNOR validation according to the ISO 16140 standard	Validation ISO 16140 des méthodes TEMPO EC, TEMPO TVC et TEMPO EC selon les règles techniques de l'AFNOR.	Food Micro 2006 - Italy
JECHOREK RP., REMES AC, KAUFER AM <i>Laboratoire R.Tech, USA</i>	An independent comparison of the bioMérieux TEMPO® EC method to the Petrifilm™ <i>E. coli</i> -Coliform Plate Method (AOAC Official Method 991.14) for the enumeration of <i>E. coli</i> in food products	224 échantillons répartis en 6 catégories (volailles, produits carnés, végétaux, produits laitiers, produits de la mer) ont été analysés par la méthode Petrifilm™ <i>E.coli</i> -Coliform Plate Method (AOAC Official Method 991.14) et la méthode TEMPO® EC. Les méthodes montrent des résultats d'exactitude comparables.	IAFP 2006, Calgary - Canada
HUGHES D., VO C., BEGUM S. <i>DH Micro Consulting, Microtech, Australia</i>	Comparison of the TEMPO® EC with the traditional MPN method for enumeration of <i>E. coli</i>	18 types d'aliments ont été analysés par la méthode TEMPO® EC et la méthode AOAC 966.24 basée sur le principe NPP. Les échantillons ont été inoculés artificiellement à des taux différents : - pas d'inoculation, - entre 10 et 100 UFC/g, - entre 100 et 1 000 UFC/g, - entre 1 000 et 10 000 UFC/g. Les deux méthodes montrent des performances équivalentes.	IAFP 2006, Calgary - Canada

Auteurs	Titre	Résumé et conclusion	Colloque, date
<p>SOHIER D., RANNOU M., GORSE F. <i>ADRIA Développement, France</i> <i>bioMérieux</i></p>	<p>Performance assessment of the TEMPO® system: an automated method for <i>Escherichia coli</i> enumeration in foods</p>	<p>Validation ISO 16140 de la méthode TEMPO® EC selon les règles techniques de l'AFNOR</p>	<p>Food Safety Congress 2005, Budapest</p>
<p>BAYLIS CL, GREEN RA, BETTS RP <i>CCFRA, UK</i></p>	<p>Comparison of results between two international standard methods - ISO 16649 and the TEMPO® EC test for quantification of <i>Escherichia coli</i> from chilled and frozen foods</p>	<p>57 échantillons de produits frais et congelés (produits carnés crus, volailles crues, végétaux, produits carnés cuits, yaourts, lait, glace) ont été analysés par les méthodes TEMPO® EC, ISO 16649-2 et ISO 16649-1. Ces échantillons étaient :</p> <ul style="list-style-type: none"> - non inoculés, - inoculés artificiellement à 3 niveaux différents. <p>La méthode ISO 16649-1 permet le meilleur recouvrement des cellules <i>E. coli</i> stressées. Les résultats de TEMPO® EC montrent des résultats proches des résultats de la méthode ISO 16649-1, les plus bas taux de recouvrement étant observés avec la méthode ISO 16649-2.</p>	<p>2006</p>
<p>HOEHL A., DOMIG K, ZITZ U, BAUMGARTNER S.,KNEIFEL W. , Austria</p>	<p>Applicability of the TEMPO® automated system to the microbiological analysis of dairy products</p>	<p>Les performances des méthodes TEMPO® EC et TEMPO® TC ont été comparées à celles des méthodes IDF correspondantes pour l'analyse des produits laitiers. Les résultats entre les méthodes TEMPO® EC et TC apparaissent comparables à celles des méthodes IDF.</p>	<p>IDF 2006, Shanghai, China</p>

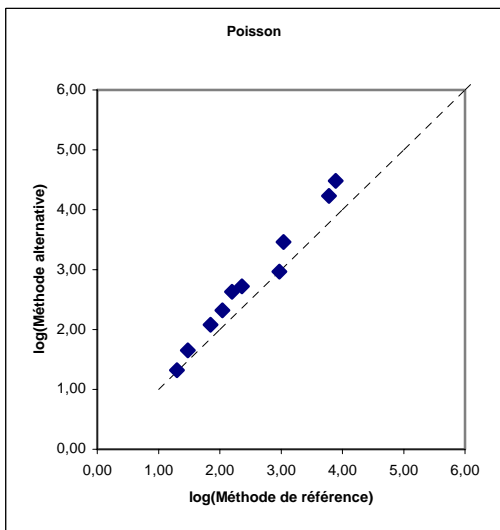
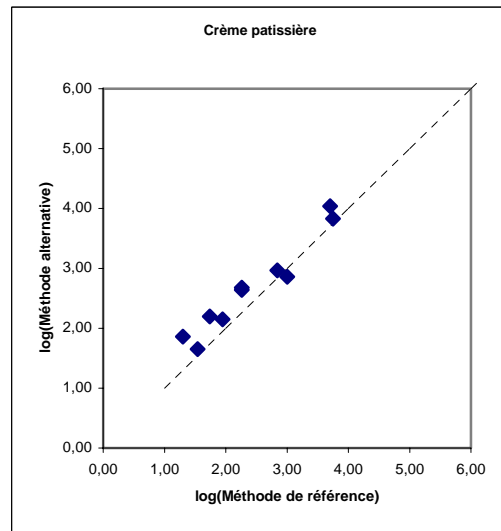
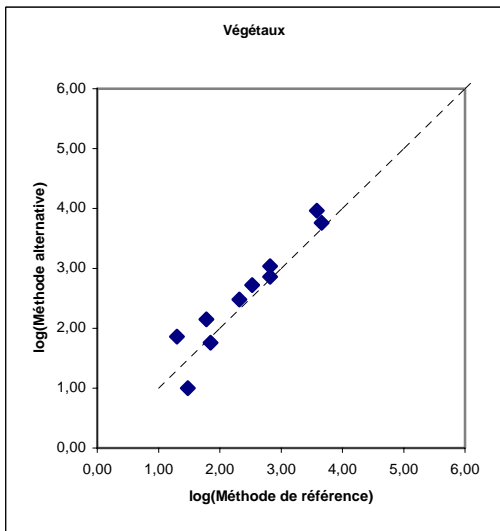
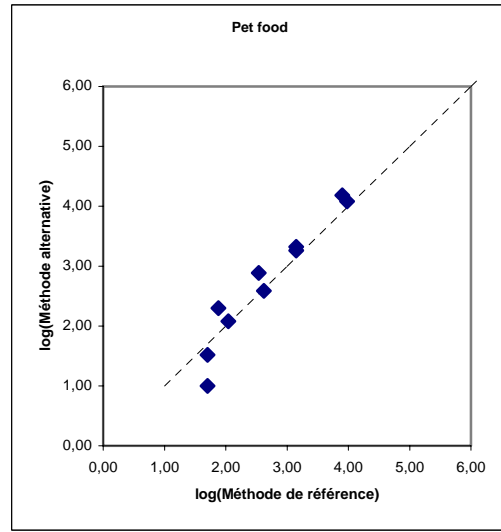
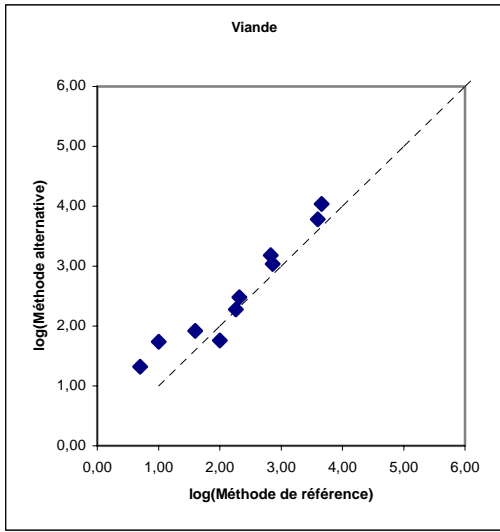
Auteurs	Titre	Résumé et conclusion	Colloque, date
DEVULDER G. DESCHOMETS R., COTTE-PATTAT JP <i>BioMérieux, France</i>	Evaluation of the TEMPO® system versus the FDA/BAM reference method and an alternative plating method for the enumeration of total viable count, <i>Escherichia coli</i> and coliforms in foods	Une évaluation des méthodes TEMPO® TVC, EC et TC a été réalisée par rapport aux méthodes de référence FDA/BAM en effectuant respectivement l'analyse de 404, 234 et 740 échantillons. Les concordances entre les résultats des méthodes TEMPO® TVC, EC et TC avec les résultats des méthodes de référence sont respectivement : - de 95 % avec un biais non significatif de - 0,06 log UFC/g - de 95 % avec un biais non significatif de + 0,07 log UFC/g - de 96,1 % avec un biais non significatif de - 0,27 log UFC/g	IAFP 2006 Calgary - Canada

Auteurs	Titre	Résumé et conclusion	Journal
PAULSEN P., SCHOPE E., SMULDERS FJM <i>Institute of Meat Hygiene,</i> Austria	Enumeration of total aerobic bacteria and <i>Escherichia coli</i> in minced meat and on carcass surface samples with an automated most-probable-number method compared with colony count protocols	Les résultats de la méthode TEMPO® EC et des dénombrements sur géloses TBX et COLI ID ont été comparés par l'analyse de 80 viandes crues et carcasses. Les droites de régression obtenues apparaissent satisfaisantes : - $\log(\text{TEMPO EC}) = 0,98 \log \text{UFC(TBX)} + 0,18$ $r = 0,96$ - $\log(\text{TEMPO EC}) = 0,99 \log \text{UFC (COLI ID)} - 0,02$ $r = 0,99$	Journal of Food Protection, vol 69, n° 10, 2006, pages 2500-2503
KUNICKA A. <i>Institute of Fermentation Technology and Microbiology,</i> Poland	Evaluation of the TEMPO® system: an automated method for food microbiological quality control	Les performances de la méthode TEMPO® EC ont été comparées à celles de la méthode ISO 16649-2. Trois matrices (fromage, viande crue, végétaux) ont été artificiellement contaminées à des taux compris entre 5 et $2 \cdot 10^7$ UFC/g. Aucune discordance $> 0,5 \log \text{UFC/g}$ n'a été observée. La linéarité est satisfaisante avec un coefficient de corrélation $> 0,95$.	Journal of Biotechnology, 131S, 2007, S69-S72
AOAC RI, USA	bioMérieux kit Granted PTM status	La méthode TEMPO® EC a été validée AOAC RI, avec l'étude de 20 matrices réparties dans les catégories suivantes : produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, végétaux, ovoproduits, aliments pour animaux de compagnie. Les matrices étaient naturellement ou artificiellement contaminées. Les performances de la méthode ont été comparées à celles des méthodes AOAC 966.23 et 966.24 et les résultats apparaissent comparables. Les tests d'inclusivité (30 souches cibles) et d'exclusivité (20 souches non cibles) confirment la spécificité et la sélectivité de la méthode.	AOAC International, Inside Laboratory Management, May-June 2007

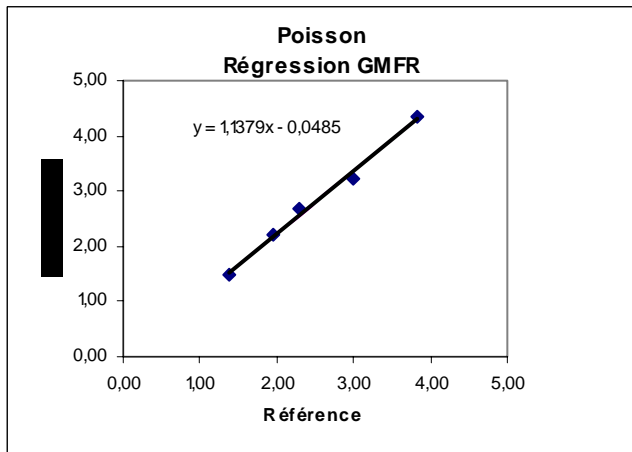
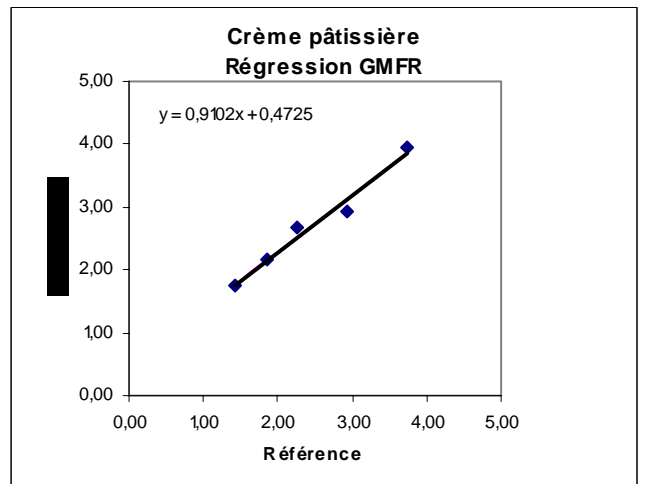
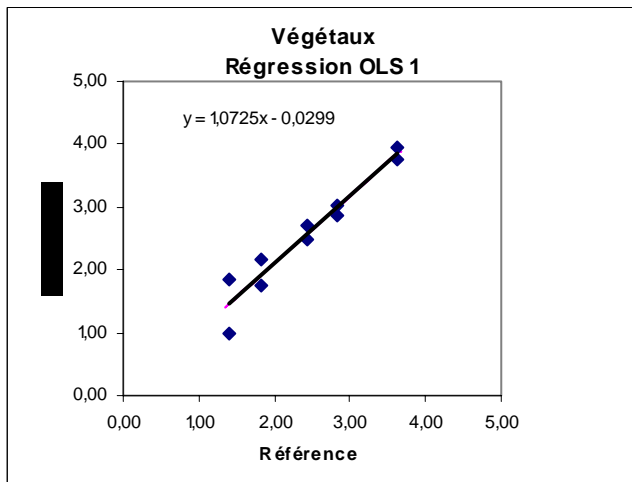
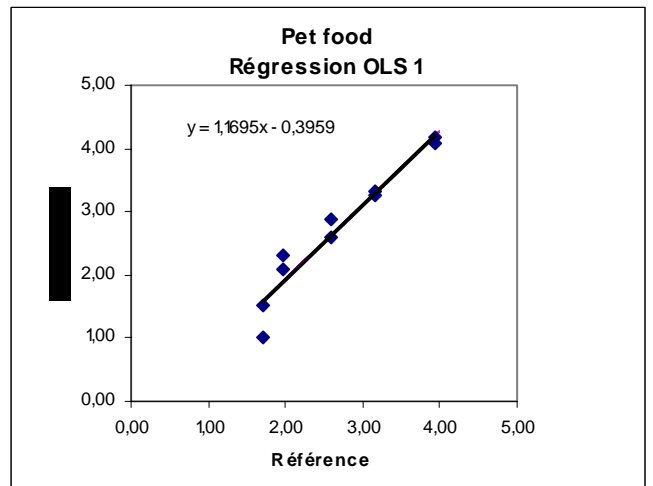
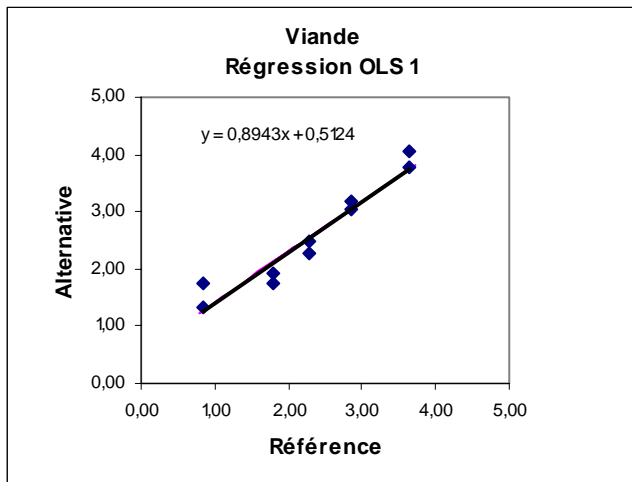
Auteurs	Titre	Résumé et conclusion	Journal
<p>TORLAK E., AKAN IM, GOKMEN M <i>Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Turkey)</i></p>	<p>Comparison of TEMPO® EC and TBX medium for the enumeration of <i>Escherichia coli</i> in cheese</p>	<p>Les performances de la méthode TEMPO® EC ont été comparées à celles de la méthode ISO 16649-2 pour le dénombrement des <i>Escherichia coli</i> dans les fromages. 22 fromages naturellement contaminés et 31 fromages artificiellement contaminés ont été analysés. Les coefficients de Pearson, respectivement obtenus, sont 0,954 et 0,978, les droites de régression étant les suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - $\log(\text{TEMPO EC}) = 0,174 + 0,899 \log(\text{ISO 16649-2})$ - $\log(\text{TEMPO EC}) = 0,174 + 0,899 \log(\text{ISO 16649-2})$ <p>Aucune différence de dénombrement supérieure à 1 log UFC/g n'a été observée.</p>	<p>Letters in Applied Microbiology, 2008 (5 pages)</p>

Annexe 1 - Linéarité : graphiques bidimensionnels et droites de régression

Graphiques bidimensionnels



Droites de régression



Interprétation statistique :

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

Annexe 2 - Exactitude relative : résultats bruts

Catégorie	N° Ech	Produit	ISO 16649-2 [♦]				TEMPO EC			
			Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	répétition 1	répétition 2	Répétition 1	Répétition 2
			ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	résultat ufc/g	résultat ufc/g	log ufc/g	log ufc/g
Produits carnés	159	Lardons cuisinés	373	359	2,57	2,56	790	530	2,90	2,72
	160	Gigolette de lapin	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	161	Foie	27273	24545	4,43	4,40	67000	50000	4,83	4,70
	162	Noix de veau	95 **	70 **	1,98	1,85	71	170	1,85	2,23
	224	Cuisse de pintade	1455	1364	3,18	3,15	1800	2600	3,26	3,41
	225	Escalope de dinde	800	700	2,90	2,85	1600	1400	3,20	3,15
	244	Poulet basquaise	1105	1095	3,04	3,04	6000	6000	3,78	3,78
	245	Chou farci	327	395	2,52	2,60	430	300	2,63	2,48
	275	Steak haché surgelé	623	600	2,79	2,78	1500	830	3,18	2,92
	276	Pilon de poulet surgelé	2000	2636	3,30	3,41	6800	5000	3,83	3,70
277	Sauté de porc surgelé	4318	5091	3,63	3,71	21000	25000	4,32	4,40	
Aliments pour animaux de compagnie	226	Haché de bœuf frais pour animaux	30 **	65 **	1,48	1,81	380	500	2,58	2,70
	227	Viande fraîche pour animaux	241	259	2,38	2,41	790	530	2,90	2,72
	228	Viande fraîche pour animaux	60 **	50 **	1,78	1,70	210	100	2,32	2,00
	250	Croquettes chaton	159	100 **	2,20	2,00	140	250	2,15	2,40
	251	Croquettes poulet légumes	5273	4909	3,72	3,69	4500	5000	3,65	3,70
	252	Croquettes au thon	841	818	2,92	2,91	4100	2300	3,61	3,36
	271	Saucisson pour chien	1155	1300	3,08	3,11	7800	4400	3,89	3,64
	272	Saucisson pour chien	241	182	2,38	2,26	1700	2600	3,23	3,41
273	Pâté pour chien	4318	4227	3,63	3,62	30000	37000	4,48	4,57	
274	Pâté pour chien	8000	8545	3,90	3,93	91000	60000	4,96	4,78	

** Estimation de petits nombres

[♦] Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

Catégorie	N° Ech	Produit	ISO 16649-2 [♦]				TEMPO EC			
			Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	répétition 1	répétition 2	Répétition 1	Répétition 2
			ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	résultat ufc/g	résultat ufc/g	log ufc/g	log ufc/g
Fruits et végétaux	196	Julienne de légumes	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	197	Poêlée méridionale	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	198	Brocolis	55 **	35 **	1,78	1,60	260	280	2,41	2,45
	219	Haricots beurre	60 **	55 **	1,78	1,78	71	59	1,85	1,77
	220	Printanière de légumes	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	249	graine de blé noir	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	253	Julienne de légumes surgelée	6500	6091	3,81	3,79	15000	15000	4,18	4,18
	254	Légumes pour pot au feu surgelés	200	273	2,30	2,43	420	330	2,62	2,52
	255	Courgettes tranchées surgelées	441	327	2,64	2,52	330	530	2,52	2,72
	259	Carottes	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	260	navets	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	261	Chou vert	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	262	Figues	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	263	Poires sèches	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	267	Abricots secs	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	268	Pistaches	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	269	Figues	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	270	Poires sèches	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	281	Carottes râpées	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	282	Choux	10 **	5 **	1,00	0,70	<10	<10	<1	<1
283	Salade composée	20 **	15 **	1,30	1,18	10	10	1,00	1,00	
287	Laitue	555	568	2,75	2,76	3400	1900	3,53	3,28	
288	Mâche	1573	1132	3,20	3,04	4100	4400	3,61	3,64	
289	Champignons déshydratés	282	291	2,45	2,46	810	930	2,91	2,97	
293	Dés de pommes déshydratés	<10	<10	<1	<1	210	590	2,32	2,77	
294	Dés de pommes déshydratés	259	305	2,41	2,49	450	450	2,65	2,65	

** Estimation de petits nombres

[♦] Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

Catégorie	N° Ech	Produit	ISO 16649-2 ♦				TEMPO EC			
			Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	répétition 1	répétition 2	Répétition 1	Répétition 2
			ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	résultat ufc/g	résultat ufc/g	log ufc/g	log ufc/g
Produits laitiers	193	Bethmal	30 **	20 **	1,48	1,30	130	45	2,11	1,65
	194	Crottin de Chavignol	115	136	2,08	2,15	2900	3400	3,46	3,53
	195	Saint Nectaire	40 **	60 **	1,60	1,78	180	220	2,26	2,34
	240	Crème glacée chocolat - pistache	800	882	2,90	2,95	730	620	2,86	2,79
	241	Glace au fruits rouges	<10	<10	<1	<1	140	120	2,15	2,08
	242	Crème glacée vanille	859	1027	2,93	3,00	440	730	2,64	2,86
	243	Crème glacée	1250	1227	3,11	3,08	1400	1100	3,15	3,04
	264	Glace vanille pistache	21000	19500	4,32	4,30	37000	30000	4,57	4,48
	284	Poudre de lait (raema)	105 **	91 **	2,04	1,95	120	100	2,08	2,00
	285	Poudre de lait (raema)	105 **	75 **	2,04	1,88	57	83	1,76	1,92
286	Poudre de lait (raema)	50 **	85 **	1,70	1,93	330	440	2,52	2,64	
Produits de la mer	199	Filet de julienne	30 **	20 **	1,48	1,30	110	170	2,04	2,23
	200	Palourdes	5 **	<10	0,70	<1	>49000	PDR19 ***	>4,69	PDR19
	201	Coques	10 **	<10	1,00	<1	PDR19	PDR19	PDR19	PDR19
	221	Huîtres	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	222	Sardines	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	223	Truites saumonée	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	246	Poisson sauce rouille	65 **	70 **	1,81	1,85	89	57	1,95	1,76
	247	Poisson sauce crème	1750	1542	3,26	3,18	1700	2000	3,23	3,30
	248	Poisson crème champignons	100 **	65 **	2,00	1,85	99	130	2,00	2,11
	256	Amandes	<10	<10	<1	<1	<10	<10	<1	<1
	258	Huîtres	<10	<10	<1	<1	<100	<100	<2	<2
	278	Moules	1282	1418	3,11	3,15	1300	1000	3,11	3,00
	279	Thon	77 **	59 **	1,89	1,77	89	150	1,95	2,18
	280	Lieu	205	232	2,32	2,36	300	230	2,48	2,36
290	Kipper fumé	959	864	2,98	2,93	2000	1600	3,30	3,20	
291	Sprats fumés	605	691	2,79	2,84	930	1500	2,97	3,18	
292	Filets de Haddock fumé	918	868	2,96	2,94	830	1200	2,92	3,08	

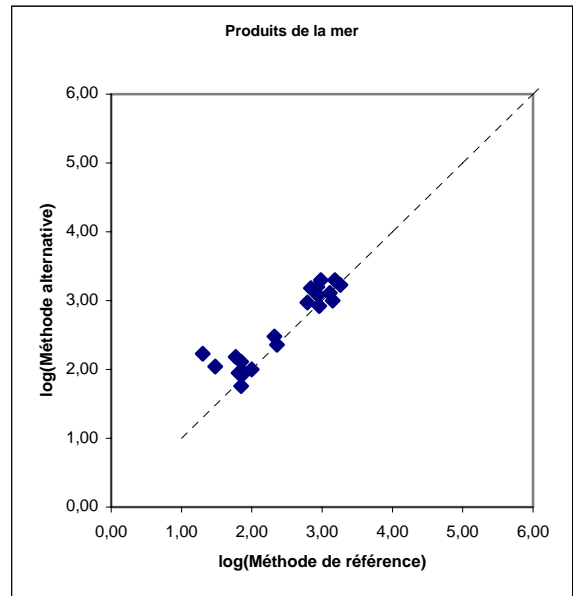
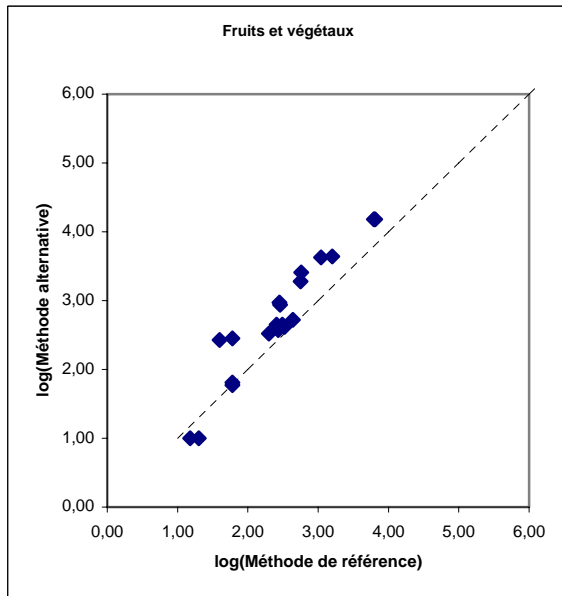
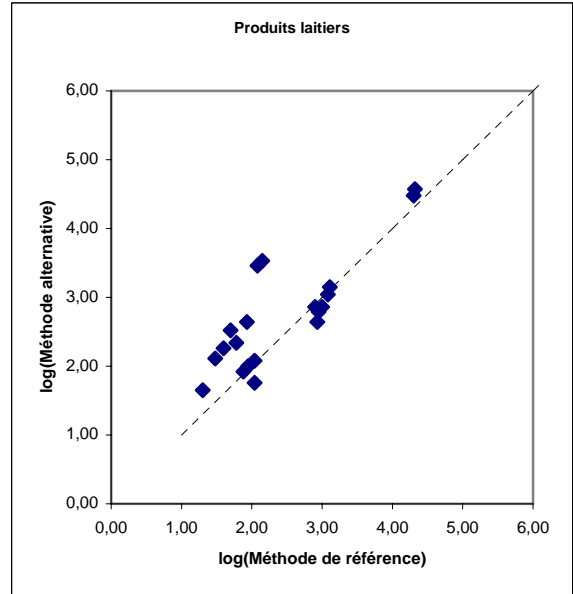
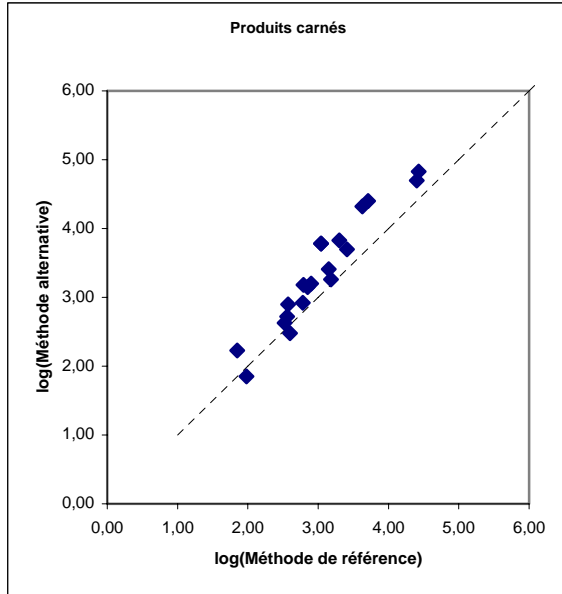
** Estimation des petits nombres

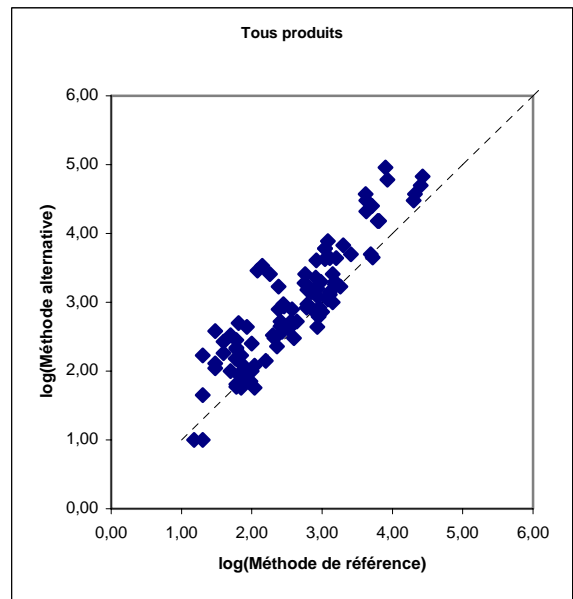
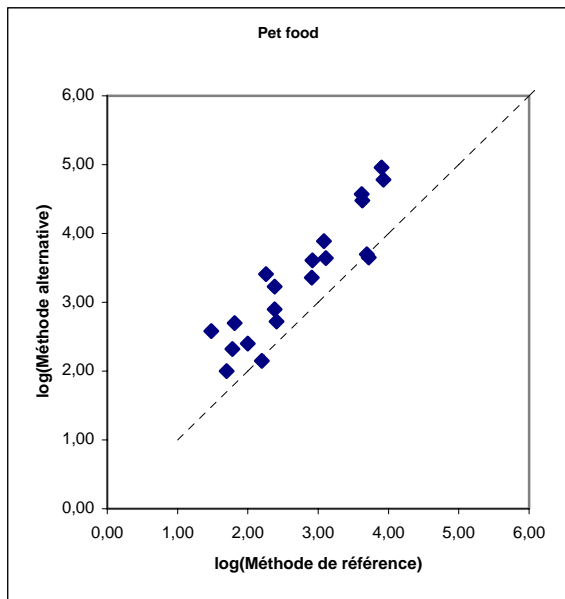
*** PDR19 : pas de résultat ; erreur 19

♦ Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

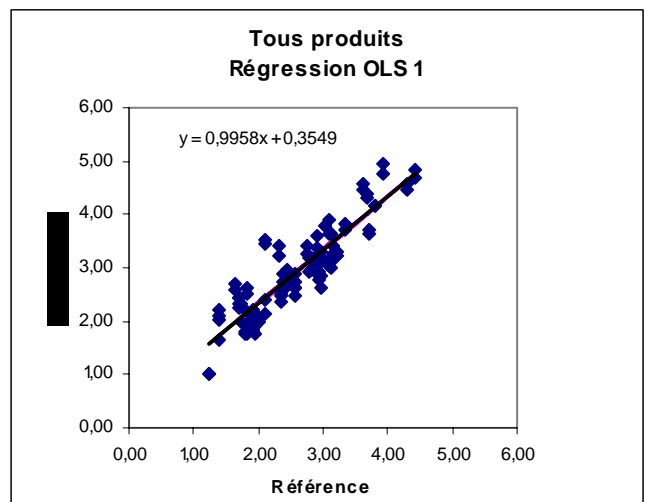
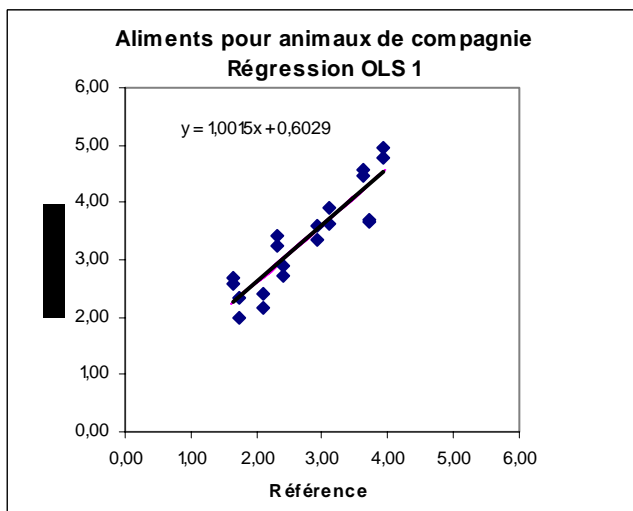
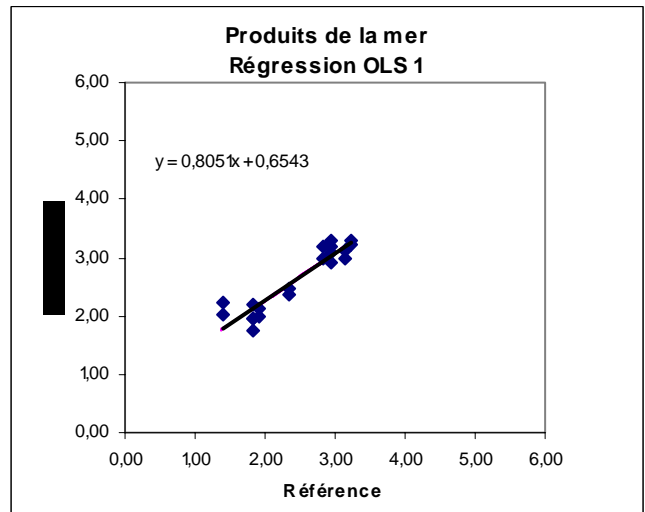
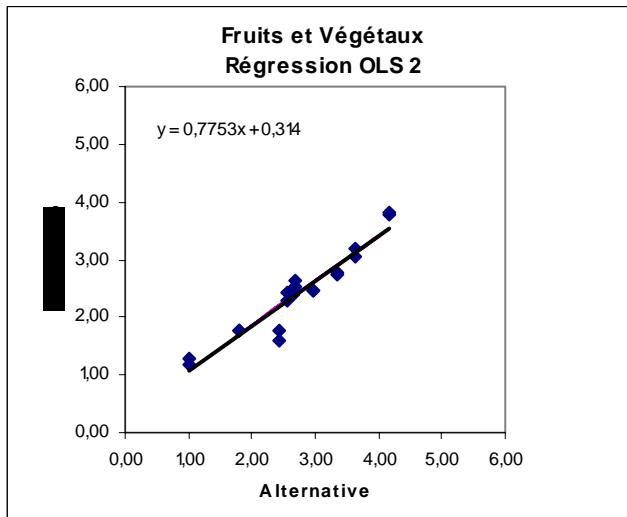
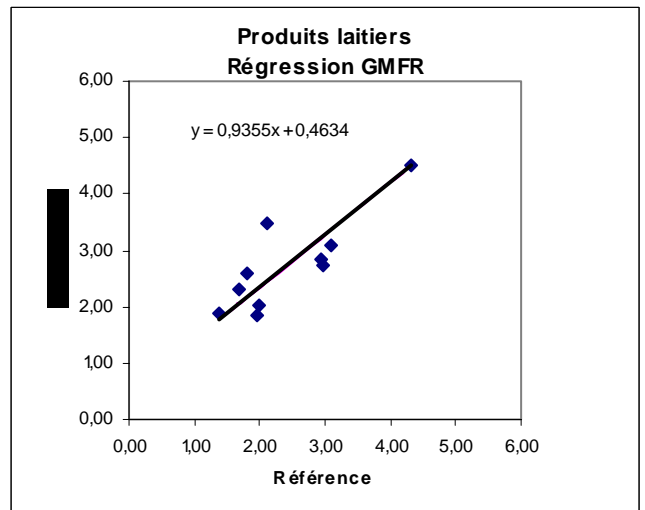
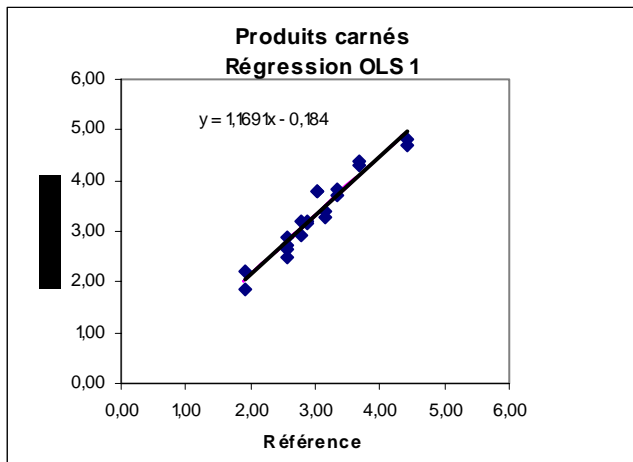
Annexe 3 - Exactitude relative : graphiques bidimensionnels et droites de régression

Graphiques bidimensionnels





Droites de régression



Annexe 4 - Spécificité et sélectivité : résultats

✓ Souches cibles

Référence souche	PCA	ISO 16649-2	TEMPO EC	
	log ufc/ml	log ufc/ml	log 1	log 2
<i>E.coli</i> 1	8,87	8,89	8,89	9,08
<i>E.coli</i> 17	9,28	8,53	9,48	9,32
<i>E.coli</i> 19	8,76	8,34	9,04	8,89
<i>E.coli</i> 101	9,15	7,81 colonies à centre bleu pâle	9,08	8,78
<i>E.coli</i> 108	9,32	8,66	9,04	8,96
<i>E.coli</i> 2B	8,81	8,76	8,96	8,96
<i>E.coli</i> 118	8,89	8,71	9,04	8,96
<i>E.coli</i> 12	9,08	8,88 colonies blanches	<6	<6
<i>E.coli</i> 121	8,92	8,71	8,61	8,89
<i>E.coli</i> 123	9,30	8,68	9,32	9,32
<i>E.coli</i> 13	9,15	8,70	9,23	9,18
<i>E.coli</i> 14	9,28	8,70	9,08	9,08
<i>E.coli</i> 143	9,20	7,96 colonies blanches contour bleuté	8,83	8,83
<i>E.coli</i> 144	9,15	8,76 colonies blanches contour bleuté	8,96	8,96
<i>E.coli</i> 21	8,96	8,61	8,87	8,53
<i>E.coli</i> ATCC 43888	8,93	8,04 colonies blanches	<6	<6
<i>E.coli</i> 70	9,28	8,64	9,23	8,96
<i>E.coli</i> 9	9,23	8,68	9,18	9,04
<i>E.coli</i> 91	9,36	6,65	6,32	6,52
<i>E.coli</i> 94	9,23	8,76	9,23	9,18
<i>E.coli</i> 96	8,77	8,30	8,89	8,96
<i>E.coli</i> 97	9,04	8,64	9,32	9,18
<i>E.coli</i> Ad 217	9,20	8,63	9,32	8,96
<i>E.coli</i> Ad 222	9,20	8,76	9,18	9,04
<i>E.coli</i> Ad 223	9,18	8,71	9,18	9,04
<i>E.coli</i> Ad 228	9,11	8,26	8,89	8,96
<i>E.coli</i> 18	9,91	8,96	8,89	9,23
<i>E.coli</i> CIP 54127	9,15	8,18	9,08	8,83
<i>E.coli</i> CIP 54117	9,28	8,56	9,23	9,04
<i>E.coli</i> CIP 7624	9,26	8,72	9,40	9,32

✓ **Souches non cibles**

Référence souche	PCA	ISO 16649-2	TEMPO EC	
	log ufc/ml	log ufc/ml	log 1	log 2
<i>Bacillus subtilis</i> 630	7,78	<6	<4	<4
<i>Citrobacter diversus</i> 140	9,11	<6	<4	<4
<i>Citrobacter freundii</i> 23	8,96	<6	<4	<4
<i>Enterobacter aerogenes</i> CIP 6086	8,45	<6	<4	<4
<i>Enterobacter cloacae</i> 10	8,48	<6	<4	<4
<i>Enterobacter sakazakii</i> D7	9,30	<6	<4	<4
<i>Enterococcus faecalis</i> 25	9,04	<6	<4	<4
<i>Erwinia carotovora</i> CIP 103762	8,62	<6	<4	<4
<i>Escherichia hermanii</i> 395	9,11	<6	<4	<4
<i>Escherichia vulneris</i> 127	8,36	<6	<4	<4
<i>Escherichia vulneris</i> 132	8,32	<6	<4	<4
<i>Hafnia alvei</i> 111	9,04	<6	<4	<4
<i>Klebsiella oxytoca</i> CIP 7932	8,70	<6	<4	<4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 47	8,90	<6	<4	<4
<i>Kluyvera ascorbata</i> CIP 8295T	8,75	<6	<4	<4
<i>Proteus vulgaris</i> 56	8,74	<6	<4	<4
<i>Providencia stuartii</i> 46	8,72	<6	<4	<4
<i>Rhanella aquatilis</i> 69	8,38	<6	<4	<4
<i>Serratia liquefaciens</i> 26	8,81	<6	<4	<4
<i>Shigella flexneri</i> CIP 8248	8,57	<6	<4	<4

Annexe 5 - Liste des laboratoires collaborateurs

Nom du laboratoire	Contact	Adresse
ACM VAL DE LOIRE	Monsieur PETAT	30-32 Av. du 21 août 1994 45270 BELLEGARDE
ASEPT	Madame COIGNARD	Rue Drs Calmette & Guérin BP 2047 53020 LAVAL Cedex 09
IDAC	Monsieur Th. VALLEE	La Chantreterie Rte de Gachet - BP 80603 44306 NANTES Cedex 03
INSTITUT PASTEUR DE LILLE - SERMHA	Madame EWE	Domaine du Certia 369 Rue Jules Guesdes - BP 39 59651 VILLENEUVE D'ASCQ
Laboratoire Départemental d'Hygiène du Tarn	Monsieur VIALA	32 rue Gustave Eiffel 81011 ALBI Cedex 9
Laboratoire Départemental Frank DUNCOMBE	Madame DIEULEVEUX Monsieur DOREY	1, Rte de Rosel 14280 SAINT CONTEST
LDA 01	Madame DARBON Monsieur BAROUX	Plateforme Alimentec Rue Henri de Boissieu 01000 BOURG EN BRESSE
LDV 19	Madame VERON	Le Treuil 19012 TULLE Cedex
LDV 43	Monsieur FILLETON	16, rue de Vienne - BP 81 43000 LE PUY EN VELAY
N.Q.A.C. CERGY-NESTLE Laboratoire de Microbiologie	Monsieur DEBERGHES	Allée du Promenoir BP 8418 95806 CERGY POINTOISE CEDEX
ROQUEFORT, Société des Caves	Monsieur REVERBEL	Laboratoire R&D Avenue de la gare 12250 ROQUEFORT S/SOULZON
SILLIKER	Madame GRAZIANA Monsieur BARLET	Lab. Microbiologie 70 Mail Marcel Cachin - 38600 FONTAINE