

**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 TVC pour le  
dénombrement de la flore aérobie mésophile**

Ce rapport comprend 42 pages dont 2 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 TVC**

Version 0 (06 juillet 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](mailto: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

<b>1</b>	<b>RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE</b>	<b>4</b>
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	Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale	6
1.4.1	<i>Etude comparative des méthodes</i>	6
1.4.2	<i>Etude interlaboratoire</i>	24
1.4.3	<i>Conclusion</i>	29
1.5	Bilan des modifications intervenues dans la méthode alternative, ayant donné lieu ou non à une extension de validation	30
<b>2</b>	<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>PRESENTATION DES MODIFICATIONS EVENTUELLES ENVISAGEES DANS LA METHODE ALTERNATIVE ET COMPLEMENT D'ETUDE PROPOSE</b>	<b>33</b>
□	<i>Annexe 1 - Résultats de l'exactitude relative</i>	35
□	<i>Annexe 2 - Liste des laboratoires collaborateurs</i>	42

## Avant Propos

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

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 TVC pour le dénombrement de la flore aérobie mésophile**
- **Référentiel de validation :** Norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives
- **Méthode de référence<sup>♦</sup> :** NF EN ISO 4833 (février 2003) : directives générales pour le dénombrement des micro-organismes - méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C
- **Etendue de la validation :** Tous produits d'alimentation humaine et pour animaux de compagnie, à l'exclusion du lait cru, des boissons et de l'alimentation du bétail

---

<sup>♦</sup> 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**

TEMPO TVC a été validé le 19 septembre 2005 (n° attestation BIO 12/15 - 09/05). La validation expire le 19 septembre 2009.

## **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 sanitaire dans les produits d'alimentation humaine et pour animaux de compagnie, à l'exclusion du lait cru, des boissons et de l'alimentation du bétail.

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 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 TEMPO pour effectuer la lecture et l'interprétation des cartes TEMPO par l'intermédiaire d'un instrument : TEMPO Reader.

Le protocole général est présenté ci-après :

Préparation échantillon 1/10<sup>ème</sup> en sac TEMPO

Diluant : peptone-sel

↓ dilution 1/400<sup>ème</sup>

3,9 ml eau distillée stérile  
en flacon TEMPO TVC

0,1 ml suspension dans flacon (une carte)

↓

Incubation 40 - 48 h à 30°C ± 1°C

↓

Lecture

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

En fonction de la contamination attendue, la dilution peut être modifiée.

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

La méthode de référence utilisée est la méthode NF ISO 4833 (février 2003) présentée ci-après :

Suspension mère  
et dilutions décimales en peptone-sel

↓

1 ml par boîte (2 boîtes par dilution)

↓

Ajout du milieu PCA

(+ 1 g de poudre de lait écrémé / litre si analyse de produits laitiers)

↓

Incubation 72 h ± 3 h à 30°C ± 1°C

↓

Dénombrement

## 1.4 Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale

### 1.4.1 Etude comparative des méthodes

#### 1.4.1.1 Etude de linéarité

##### □ **Matrices utilisées et protocoles de contamination**

Cinq couples (matrice alimentaire / souche) ont été analysés à cinq niveaux de contamination, de façon à couvrir la gamme de contamination habituellement rencontrée. Deux répétitions ont été réalisées par échantillon. Les produits ont été analysés à la fois par la méthode alternative et la méthode de référence.

Les matrices suivantes ont été testées :

- pâté de porc, inoculé par *Enterobacter agglomerans* 72, isolée de bœuf bourguignon,
- bouchées pour chat, inoculées par *Bacillus cereus* 29, isolée de VSM ionisée,
- haricots verts, inoculés par *Xanthomonas maltophilia* 11.2, isolée de plante,
- crème pâtissière, inoculée par *Staphylococcus aureus* 501, isolée de lait cru,
- pavé de saumon, inoculé par *Listeria seeligeri* BR1, isolée de truite.

Les lectures ont été effectuées à 40 et 48 h pour la méthode TEMPO TVC.

##### □ **Résultats**

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie sont donnés figure 1 et les droites de régression figure 2.

L'interprétation a été réalisée pour les résultats obtenus à 40 h et 48 h d'incubation pour la méthode TEMPO TVC en considérant :

- analyses au 1/400 pour tous les échantillons,
- analyses avec combinaison de dilutions (1/40 pour le niveau 1, 1/400 pour les niveaux 2 et 3, 1/4000 pour les niveaux 4 et 5).

Aucune évolution des dénombrements n'est observée entre 40 h et 48 h d'incubation des cartes TEMPO.

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

**Tableau 1 - Récapitulatif des données statistiques  
de l'étude de linéarité - Incubation TEMPO TVC 40 et 48 heures  
Dilution 1/400**

Matrice	R	Régression utilisée	Rob. F	Valeur critique	P %	Coefficient de corrélation	Equation de la droite de régression
Pâté de porc	1,50	GMFR	1,061	5,41	44	0,997	$\log \text{Alt} = -0,223 + 0,976 \log \text{Réf}$
Bouchées pour chat	2,80	OLS1	9,536	5,41	2	0,984	$\log \text{Alt} = -0,441 + 1,134 \log \text{Réf}$
Haricots verts	4,00	OLS1	3,957	5,41	9	0,992	$\log \text{Alt} = 0,151 + 0,996 \log \text{Réf}$
Crème pâtissière	1,33	GMFR	9,560	5,41	2	0,996	$\log \text{Alt} = -0,50 + 1,165 \log \text{Réf}$
Pavé de saumon	1,67	GMFR	1,668	5,41	29	0,999	$\log \text{Alt} = -0,340 + 1,115 \log \text{Réf}$

**Tableau 2 - Récapitulatif des données statistiques  
de l'étude de linéarité - Incubation TEMPO TVC 40 et 48 heures  
Dilutions combinées**

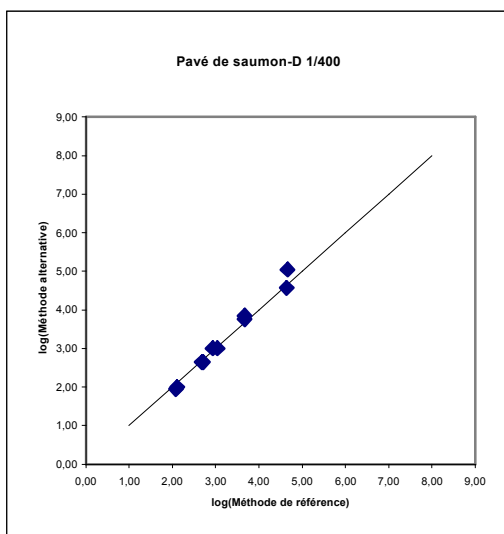
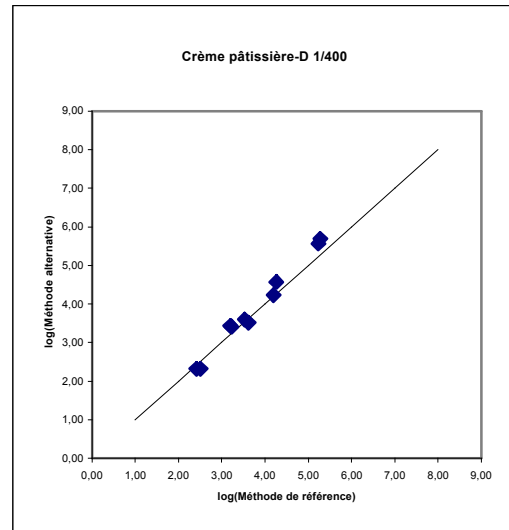
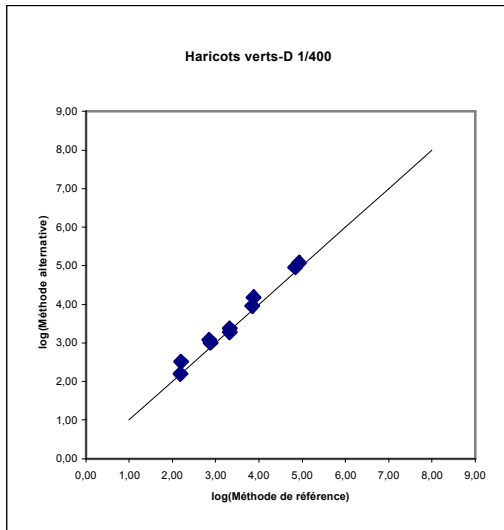
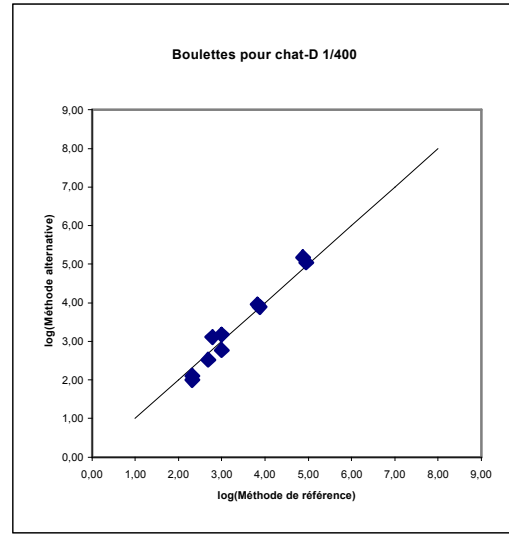
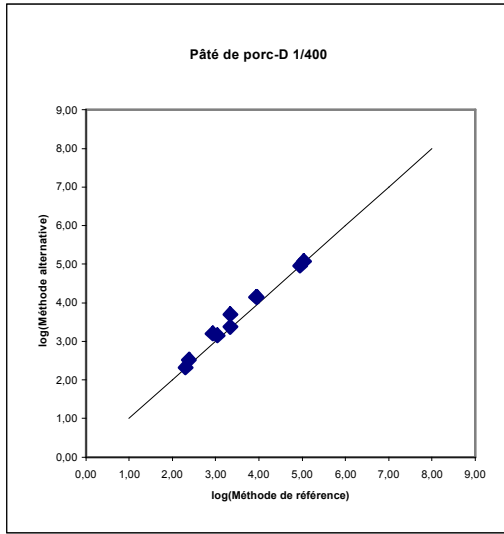
Matrice	R	Régression utilisée	Rob. F	Valeur critique	P %	Coefficient de corrélation	Equation de la droite de régression
Pâté de porc	0,87	GMFR	0,000	5,41	100	0,999	$\log \text{Alt} = 0,141 + 1,018 \log \text{Réf}$
Bouchées pour chat	8,20	OLS1	0,000	5,41	100	0,983	$\log \text{Alt} = -0,398 + 1,137 \log \text{Réf}$
Haricots verts	5,00	OLS1	3,240	5,41	12	0,991	$\log \text{Alt} = -0,282 + 1,101 \log \text{Réf}$
Crème pâtissière	1,40	GMFR	20,489	5,41	0	0,993	$\log \text{Alt} = 0,023 + 1,012 \log \text{Réf}$
Pavé de saumon	4,33	OLS1	3,252	5,41	12	0,992	$\log \text{Alt} = -0,136 + 1,046 \log \text{Réf}$

**Interprétation statistique :**

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

Figure 1 - Linéarité : graphiques bidimensionnels

Dilutions 1/400



### Dilutions combinées

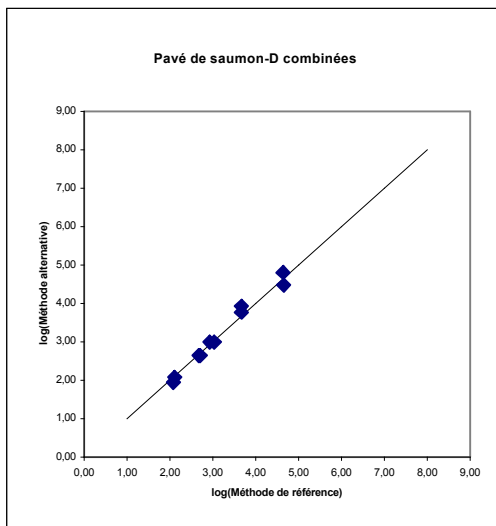
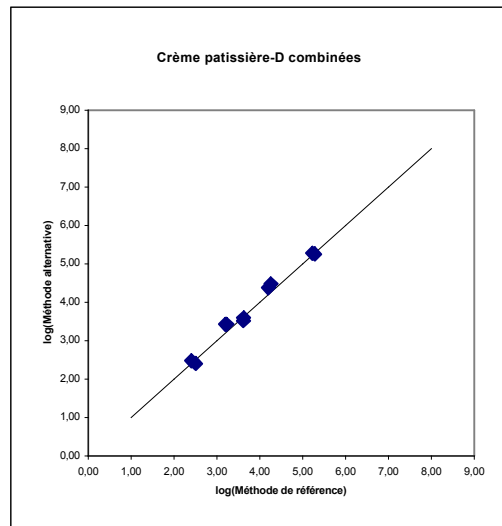
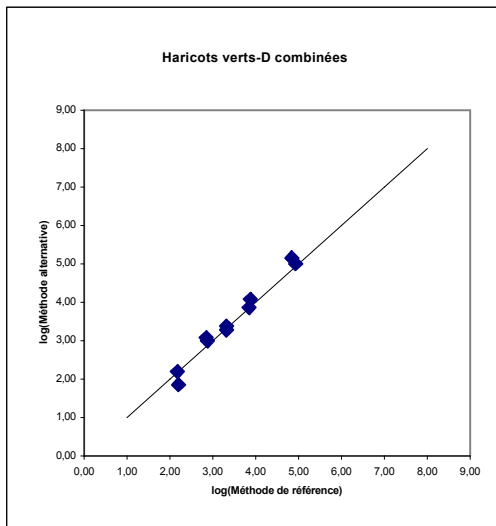
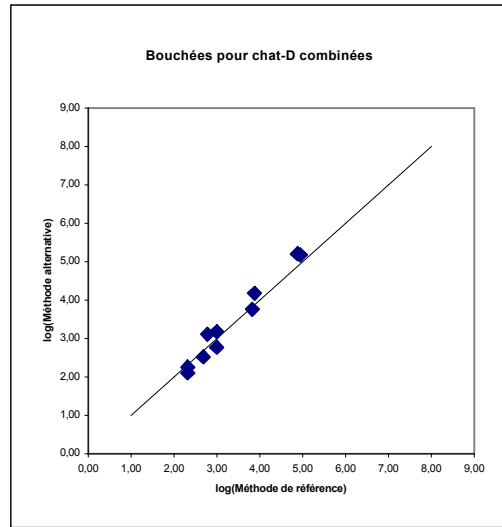
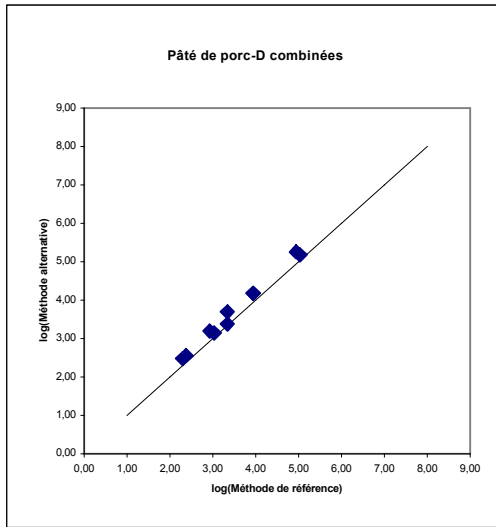
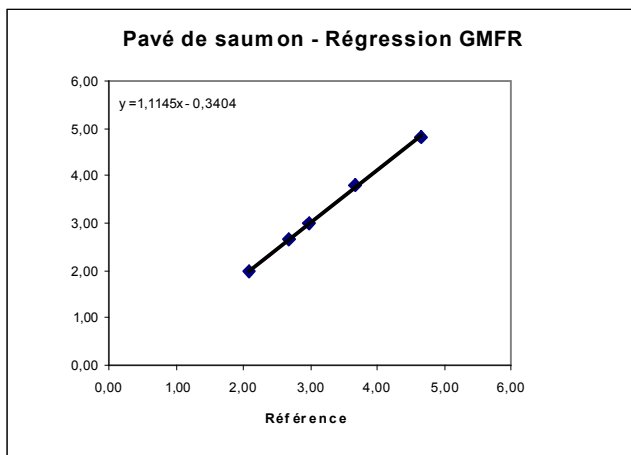
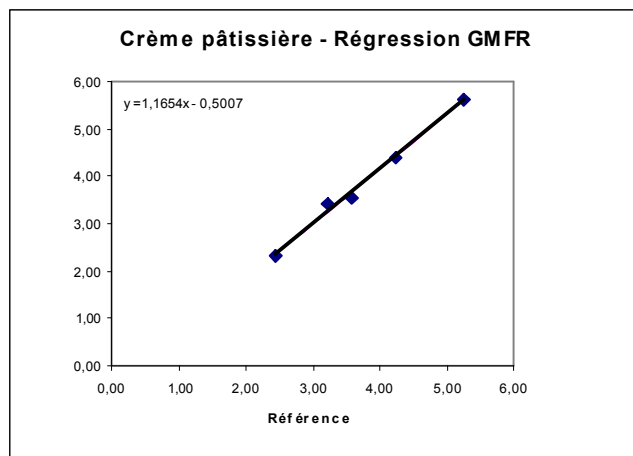
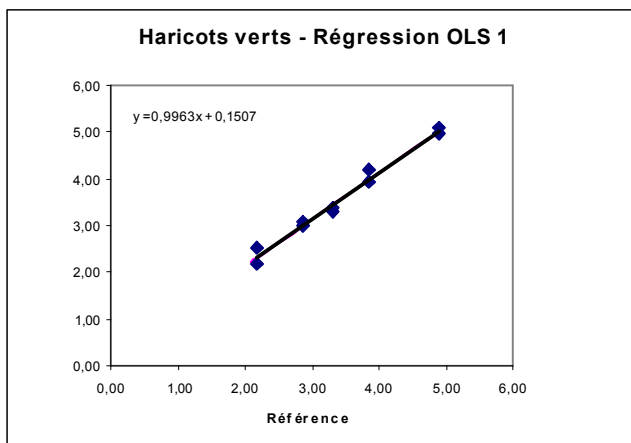
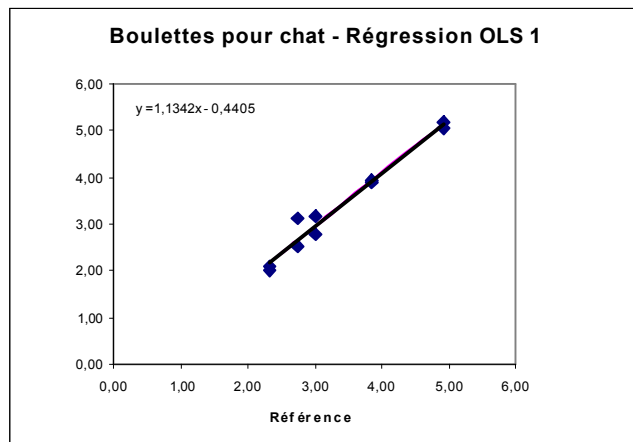
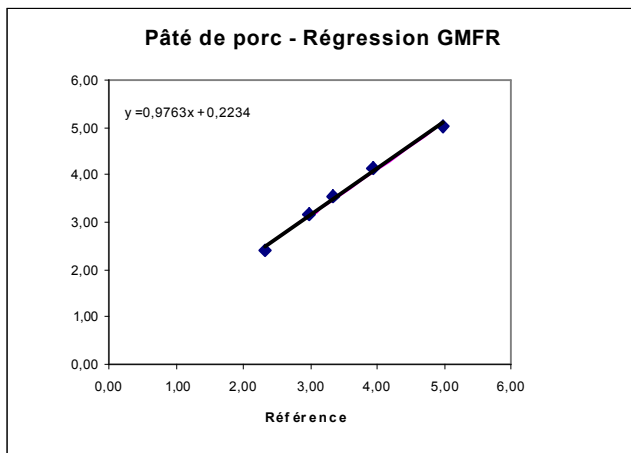
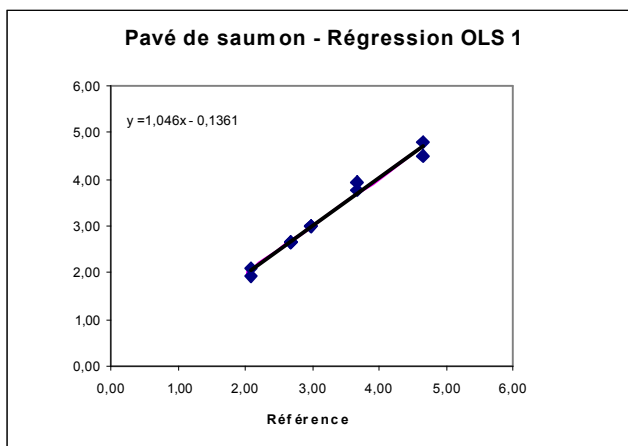
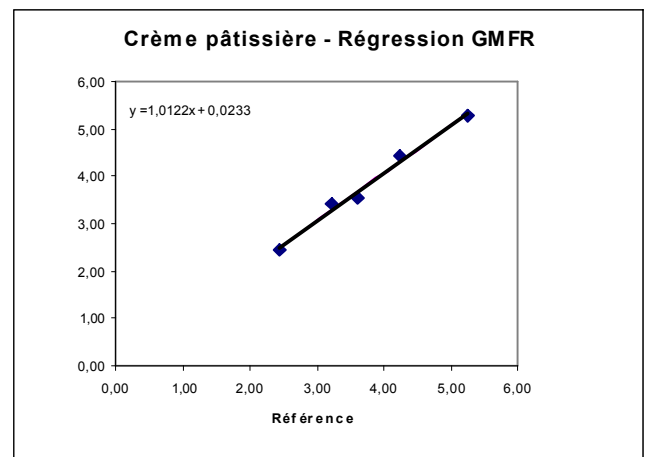
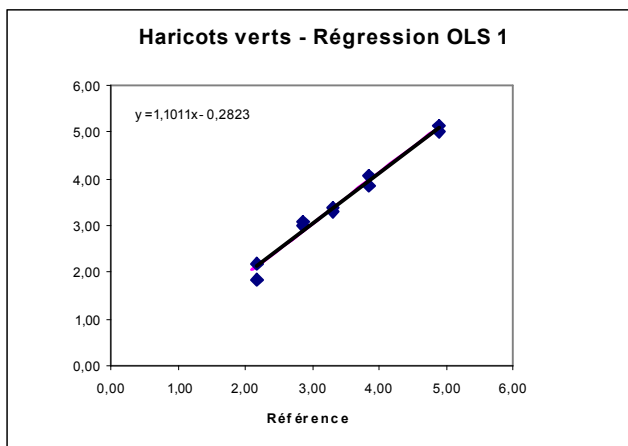
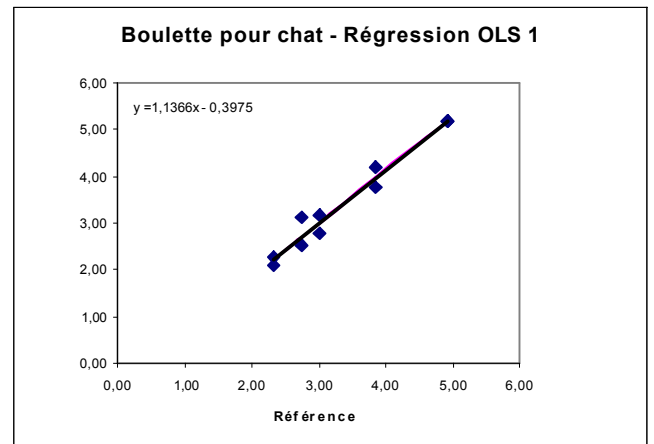
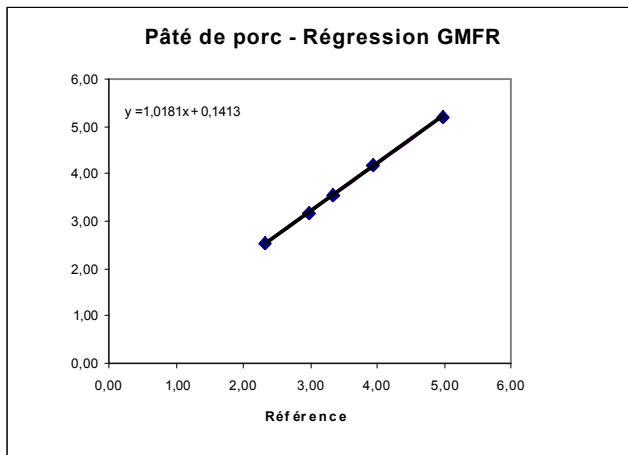


Figure 2 - Linéarité : droites de régression

Dilutions 1/400



### Dilutions combinées



□ **Conclusion**

Dans la majorité des cas, les valeurs de P sont supérieures à 5 %, quelles que soient les dilutions et les analyses considérées. Le test de non-linéarité est non significatif, ce qui permet de conclure à la linéarité de la méthode.

Les coefficients de corrélation associés aux valeurs de P inférieures à 5 % montrent des valeurs élevées (supérieures à 0,98) et satisfaisantes pouvant mettre en défaut la robustesse du test de non-linéarité. L'observation des graphes confirme la linéarité de la méthode TEMPO TVC.

**La linéarité de la méthode TEMPO TVC apparaît satisfaisante.**

#### 1.4.1.2 Exactitude relative

Les résultats bruts sont donnés en annexe 1.

□ **Nombre et nature des échantillons**

Cinq catégories de produits, réparties sur trois types de matrices, ont été testées. Un minimum de dix résultats exploitables a été obtenu par catégorie.

Les matrices étudiées sont les suivantes :

- produits carnés, dont volaille,
- aliments pour animaux de compagnie,
- produits laitiers,
- fruits et végétaux,
- produits de la mer.

**Tableau 3 - Nombre d'échantillons analysés et exploités par catégorie**

Catégorie	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons exploités
Produits carnés	17	10
Aliments pour animaux de compagnie	22	10
Produits laitiers	17	12
Fruits et végétaux	22	11
Produits de la mer	12	10
Tous produits	90	53

□ **Résultats**

**Tableau 4 - Calcul du biais et de la limite de répétabilité**

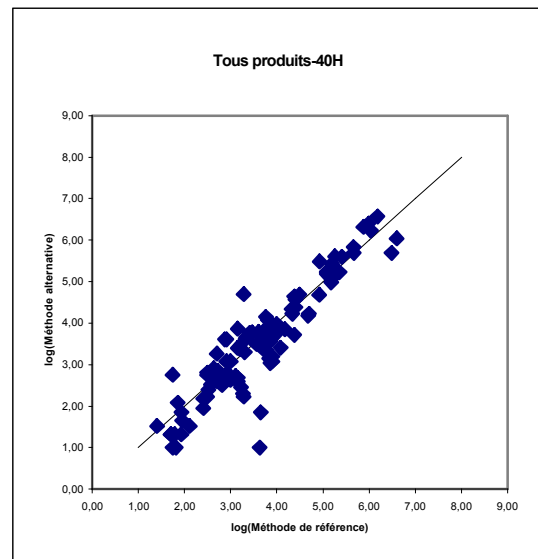
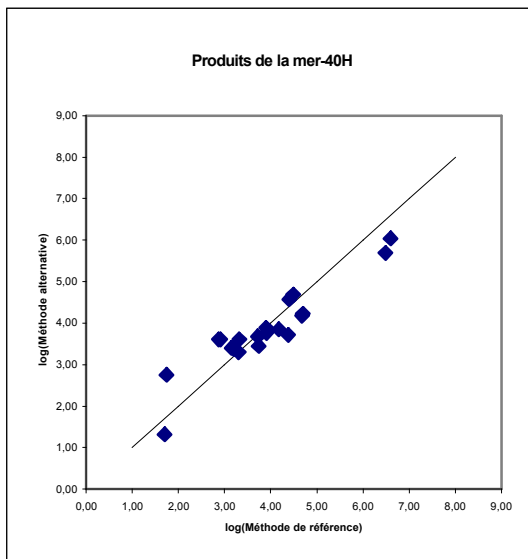
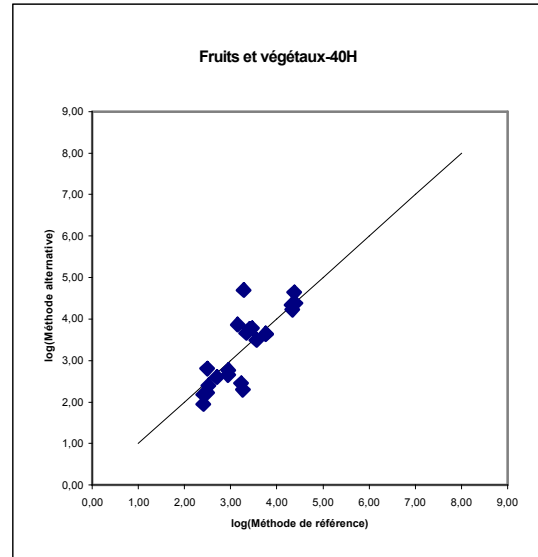
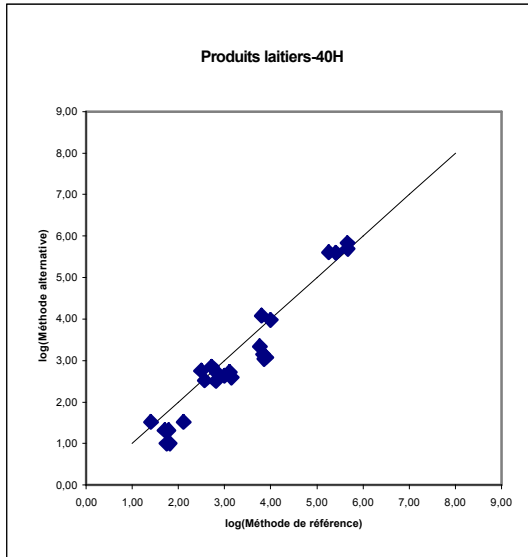
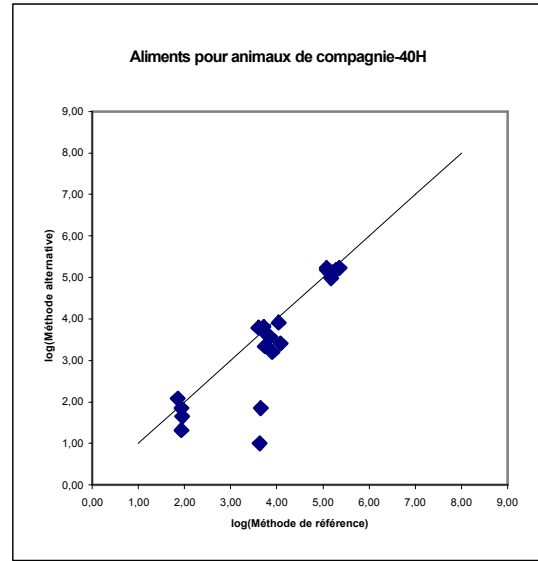
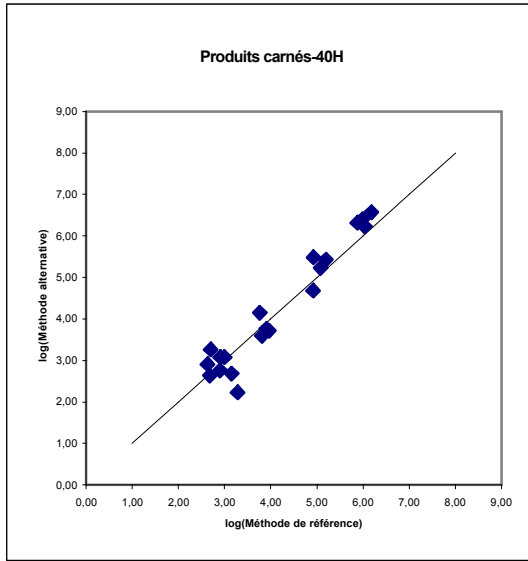
Catégorie	Biais D		Répétabilité méthode alternative		Répétabilité méthode de référence
	40 h	48 h	40 h	48 h	
Produits carnés	0,103	0,208	0,866	0,675	0,352
Aliments pour animaux de compagnie	-0,130	-0,065	0,822	0,440	0,088
Produits laitiers	-0,240	-0,255	0,484	0,183	0,293
Fruits et végétaux	-0,045	0,015	0,470	0,543	0,088
Produits de la mer	0,023	0,120	0,382	0,382	0,191
Tous produits	-0,080	0,040	0,528	0,528	0,235

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination
Produits carnés	2,23 à 6,57 log UFC/g
Aliments pour animaux de compagnie	1,00 à 5,36 log UFC/g
Produits végétaux	1,95 à 4,64 log UFC/g
Produits laitiers	1,00 à 4,70 log UFC/g
Produits de la mer	1,32 à 6,32 log UFC/g

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie sont donnés figure 3 et les droites de régression figure 4.

Figure 3 - Exactitude relative : graphiques bidimensionnels

40 h



48 h

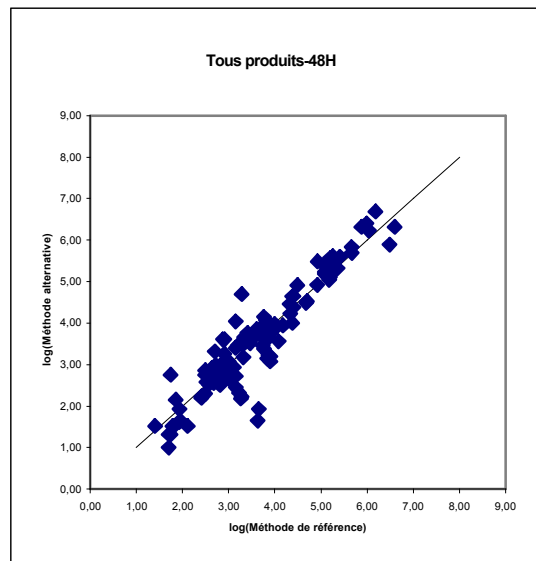
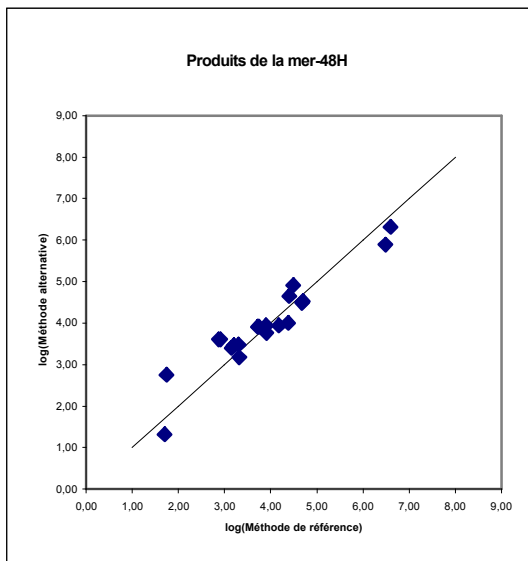
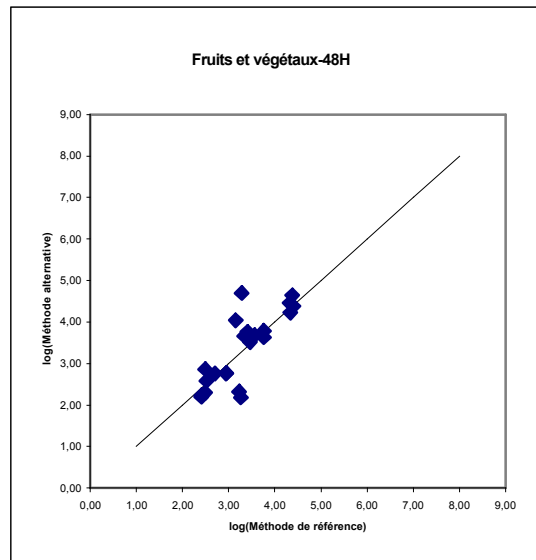
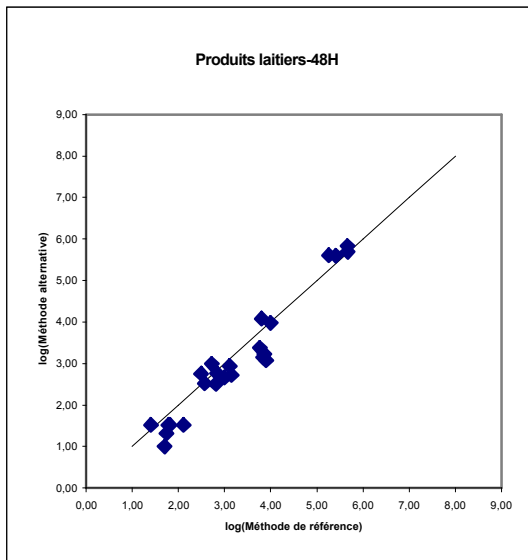
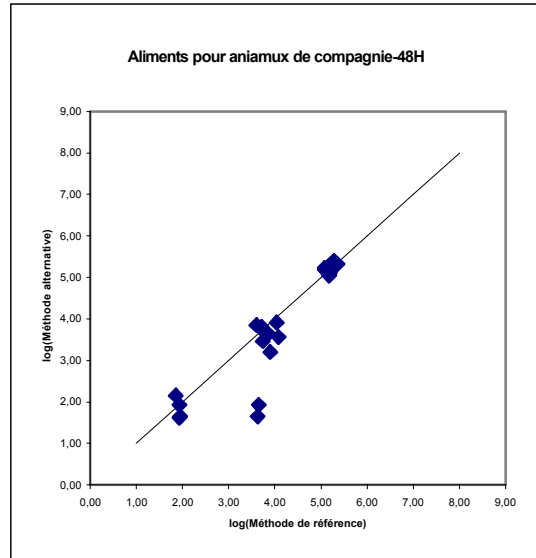
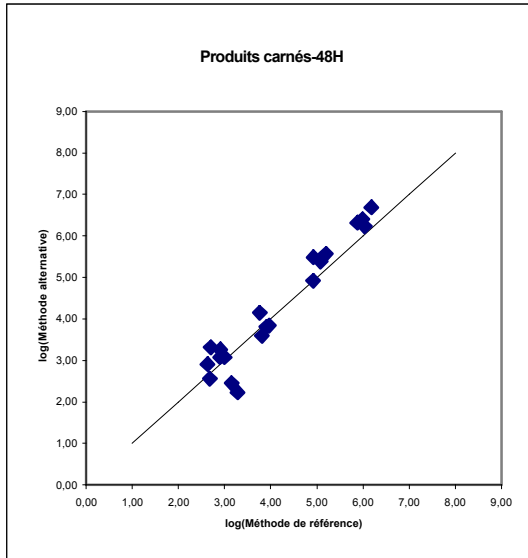
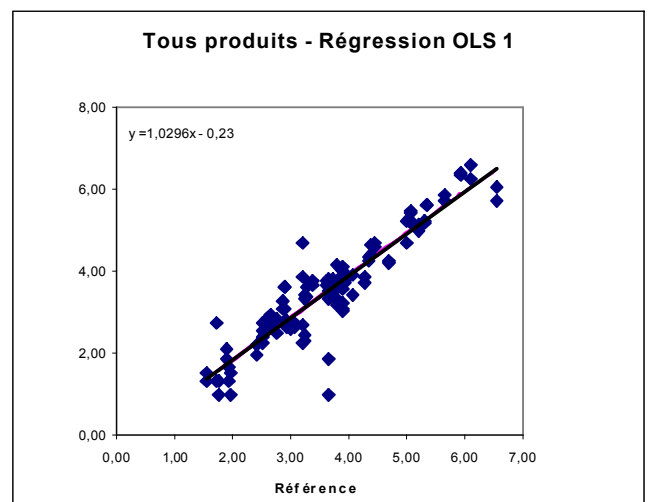
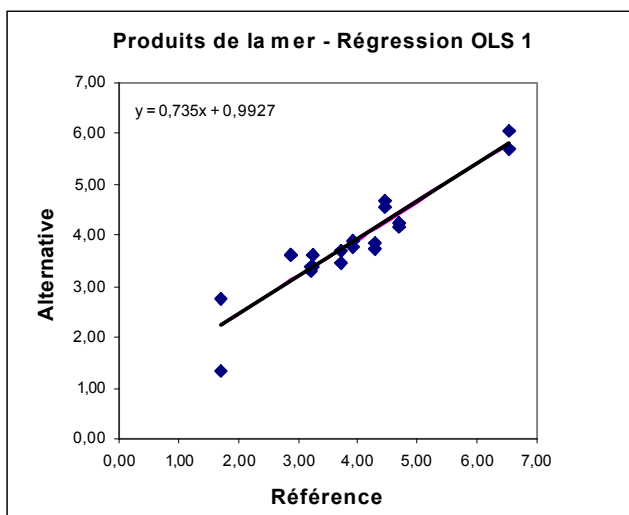
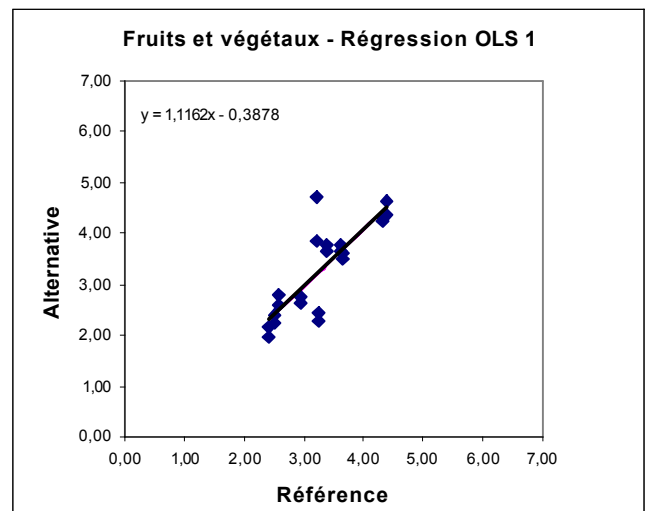
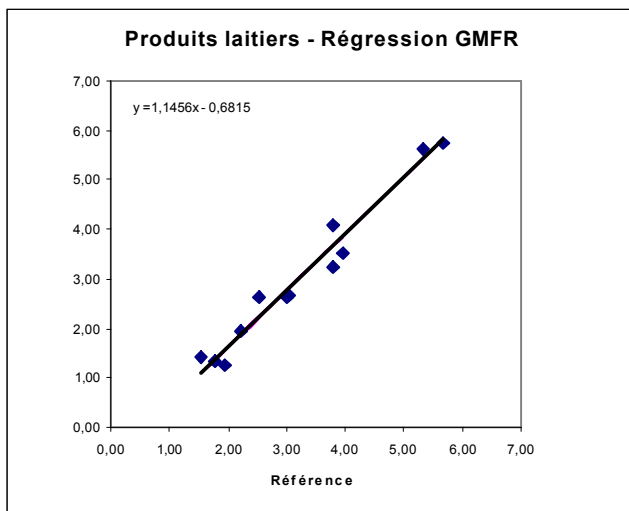
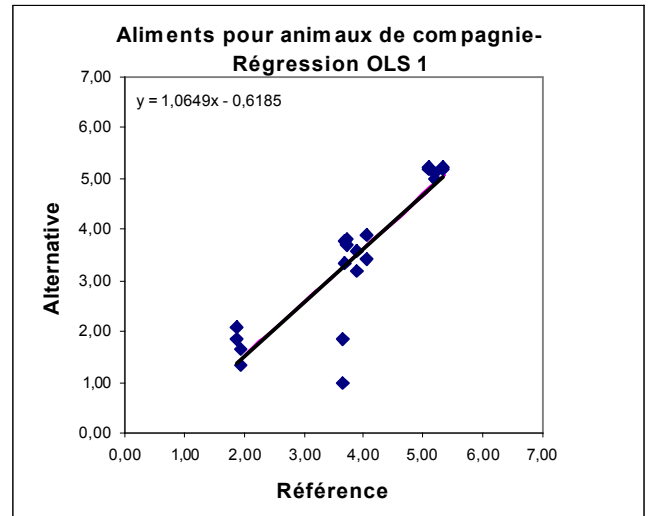
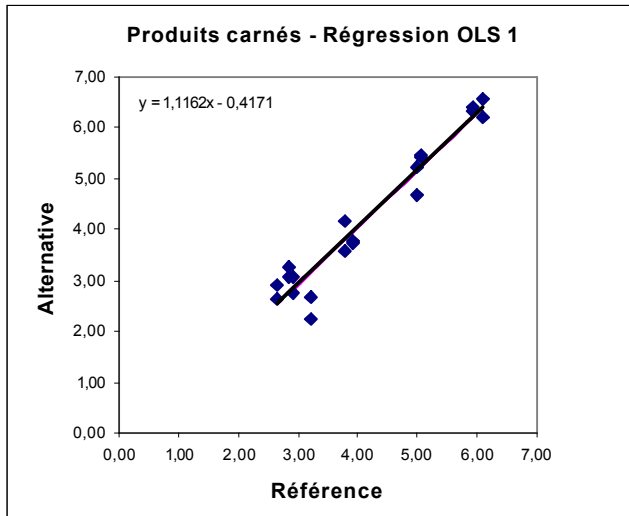
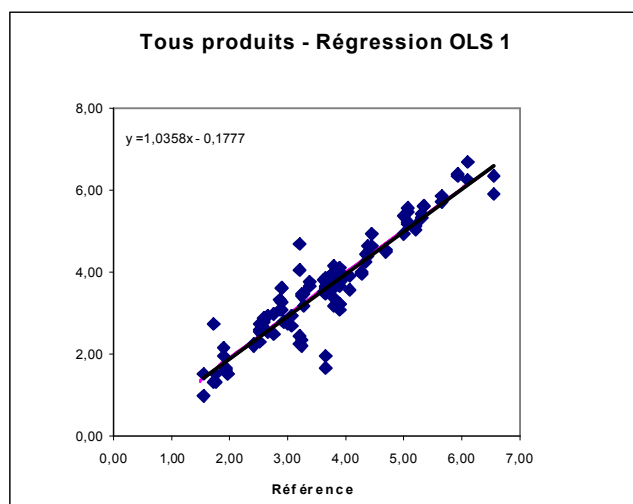
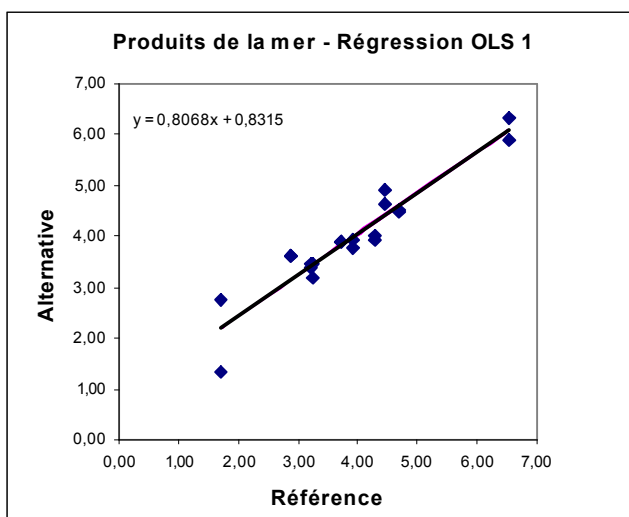
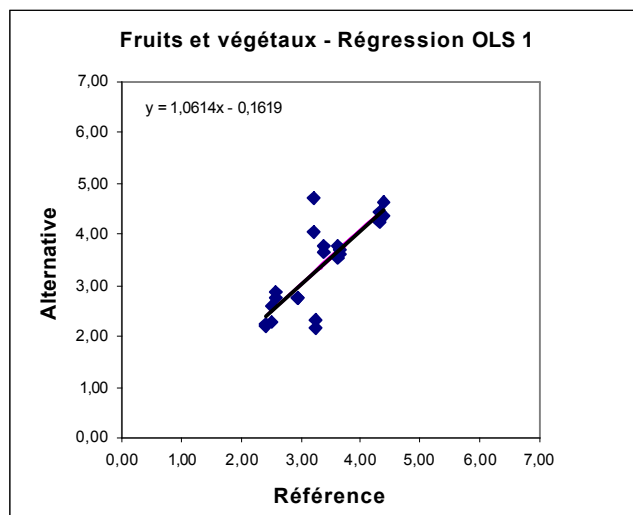
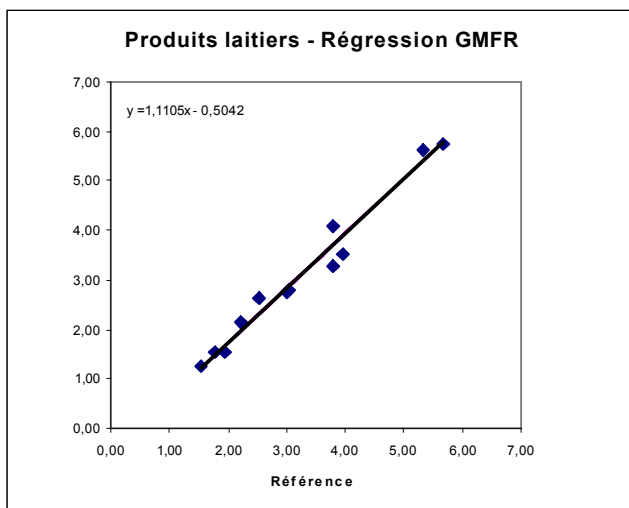
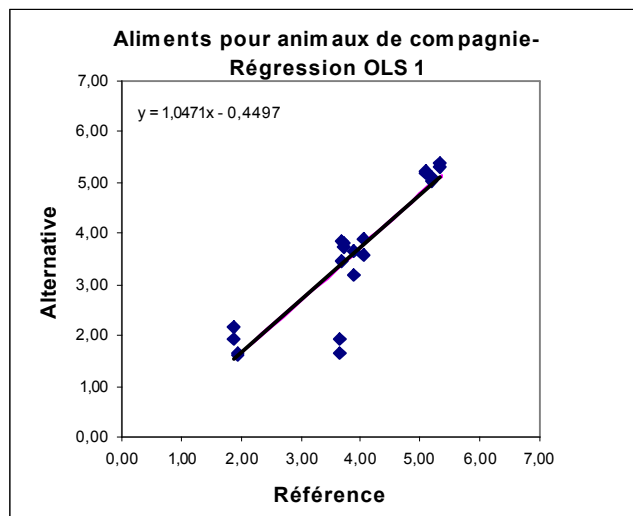
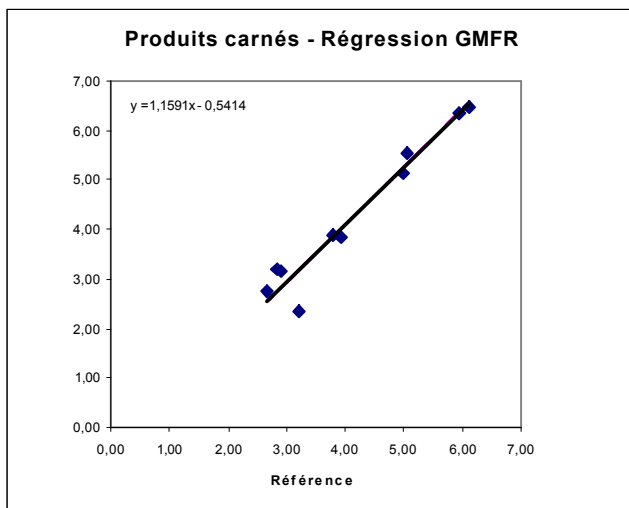


Figure 4 - Exactitude relative : droites de régression

40 h



48 h



□ **Interprétation statistiques selon la norme ISO16140**

**Tableau 5 - Récapitulatif des données statistiques  
de l'étude d'exactitude relative -  
Incubation TEMPO TVC 40 heures**

Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t (a)	b	t (b)	T critique	P %		Biais D
									Ordonnée à 0	Pente à 1	
Produits carnés	10	2,46	OLS1	- 0,417	1,026	1,116	1,236	2,306	33	25	0,103
Aliments pour animaux de compagnie	10	9,33	OLS1	- 0,619	0,786	1,065	0,330	2,306	75	45	-0,130
Produits laitiers	12	1,65	GMFR	- 0,682	2,923	1,146	2,164	2,228	2	6	-0,240
Fruits et végétaux	11	5,33	OLS1	- 0,388	0,497	1,116	0,500	2,262	63	63	-0,045
Produits de la mer	10	2,00	OLS1	0,993	2,532	0,735	2,741	2,306	4	3	0,023
Tous produits	53	2,25	OLS1	- 0,230	0,993	1,030	0,492	2,008	33	63	-0,080

Avec - a : ordonnée à l'origine de la droite de régression  
- b : pente de la droite de régression

Interprétation statistique :

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

Pour toutes catégories de produits confondues, l'équation de la droite de régression est :

$$\log \text{TEMPO TVC} = - 0,23 + 1,03 \log \text{Référence}$$

**Tableau 6 - Récapitulatif des données statistiques  
de l'étude d'exactitude relative -  
Incubation TEMPO TVC 48 heures**

Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t (a)	b	t (b)	T critique	P %		Biais D
									Ordonnée à 0	Pente à 1	
Produits carnés	10	1,92	GMFR	-0,541	1,279	1,159	1,625	2,306	24	14	0,208
Aliments pour animaux de compagnie	10	5,00	OLS1	-0,450	0,672	1,047	0,282	2,306	52	79	-0,065
Produits laitiers	12	1,75	GMFR	-0,504	2,475	1,111	1,880	2,228	3	9	-0,255
Fruits et végétaux	11	6,17	OLS1	-0,162	0,197	1,061	0,250	2,262	85	81	0,015
Produits de la mer	10	2,00	OLS1	0,832	2,228	0,807	2,099	2,306	6	7	0,120
Tous produits	53	2,25	OLS1	-0,178	0,830	1,036	0,642	2,008	41	52	0,040

Avec - a : ordonnée à l'origine de la droite de régression  
- b : pente de la droite de régression

Interprétation statistique :

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

Pour toutes catégories de produits confondues, l'équation de la droite de régression est :

$$\log \text{TEMPO TVC} = - 0,178 + 1,036 \log \text{Référence}$$

Pour toutes catégories confondues et quel que soit le temps d'incubation des cartes TEMPO TVC, les résultats des tests statistiques valident des ordonnées à l'origine proches de 0 et des pentes proches de 1.

De même, toutes catégories confondues, le biais entre les deux méthodes varient entre - 0,080 et 0,040 log UFC/g, respectivement pour des durées d'incubation des cartes TEMPO TVC de 40 h et 48 h..

Pour une incubation de 40 et 48 heures des cartes TEMPO TVC, la limite de répétabilité (tous produits) est de 0,235 pour la méthode de référence et de 0,528 pour la méthode alternative

#### □ **Conclusion**

Selon les échantillons, une faible variation des dénombrements est observée entre les deux durées d'incubation des cartes TEMPO TVC, 40h et 48h.

Pour toutes catégories confondues et quel que soit le temps d'incubation des cartes TEMPO TVC, les résultats des tests statistiques valident des ordonnées à l'origine proches de 0 et des pentes proches de 1.

La limite de répétabilité de la méthode alternative est supérieure à celle de la méthode de référence, tel qu'observé de manière générale entre une méthode basée sur le principe NPP et une méthode de dénombrement sur gélose (Gangar<sup>1</sup> et Gambrel-Lenarz, 1999). La plupart des études comparatives de méthodes AFNOR ou AOAC rapporte des limites de répétabilité comprises entre 0,7 et 1,8 log UFC/g pour les méthode de référence basées sur le principe NPP.

**La méthode TEMPO TVC avec une valeur de 0,528 présente une limite de répétabilité satisfaisante.**

<sup>1</sup> Gangar V., Curiale M.S., Lindberg K., Gambrel-Lenarz S. (1999) Dry rehydratable film method for enumerating confirmed *Escherichia coli* in poultry, meats and seafood: collaborative study. J. AOAC Int., 82 (1) :73-8

### 1.4.1.2 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

#### □ **Protocole**

La limite de détection a été réalisée à l'aide d'une culture de *Escherichia coli* 94.

Quatre niveaux d'inoculation ont été testés, ainsi que le niveau 0. Les dénombrements des suspensions ont été réalisés en milieu PCA.

Des suspensions ont été préparées puis diluées au 1/10 (tryptone-sel) en sac TEMPO. Une dilution au 1/40 de chaque suspension a donc été analysée par la méthode TEMPO TVC.

#### □ **Résultats**

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

**Tableau 7 - Récapitulatif**

Niveau visé (UFC/g)	Nombre d'échantillons « positifs »	Ecart-type So	Biais Xo
0	0 / 6	/	/
10	4 / 6	7,842	10
50	6 / 6	28,081	87,5
100	6 / 6	37,639	140

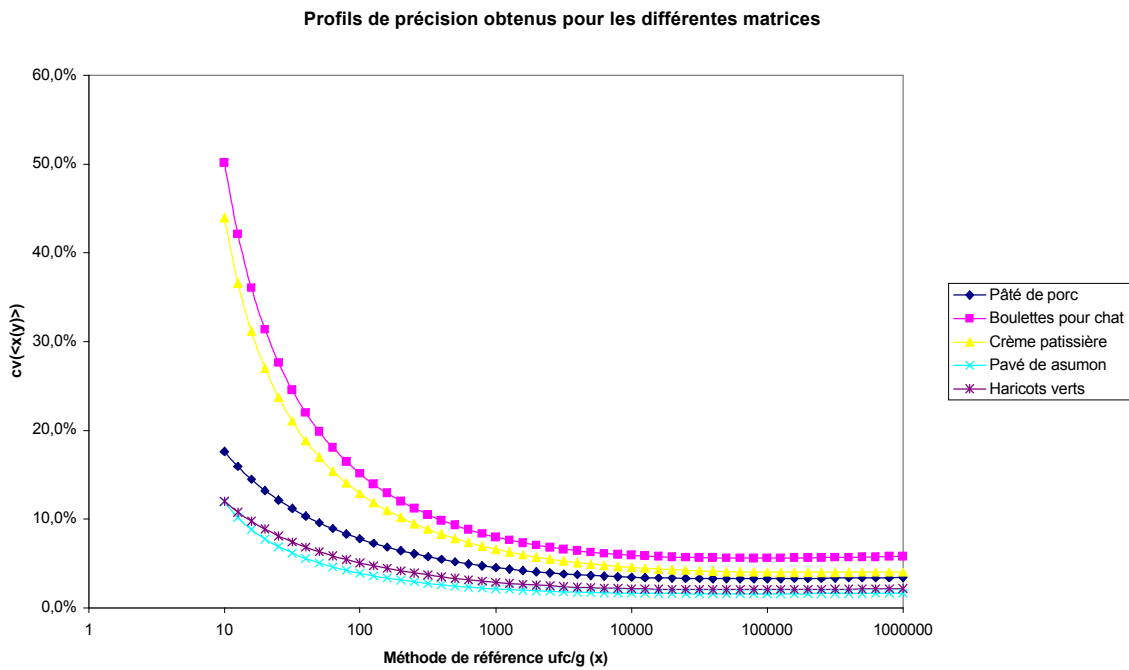
**Tableau 8**

	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 S_o + X_o$	22,9
LOD	$3,3 S_o + X_o$	35,9
LOQ	$10 S_o + X_o$	88,4

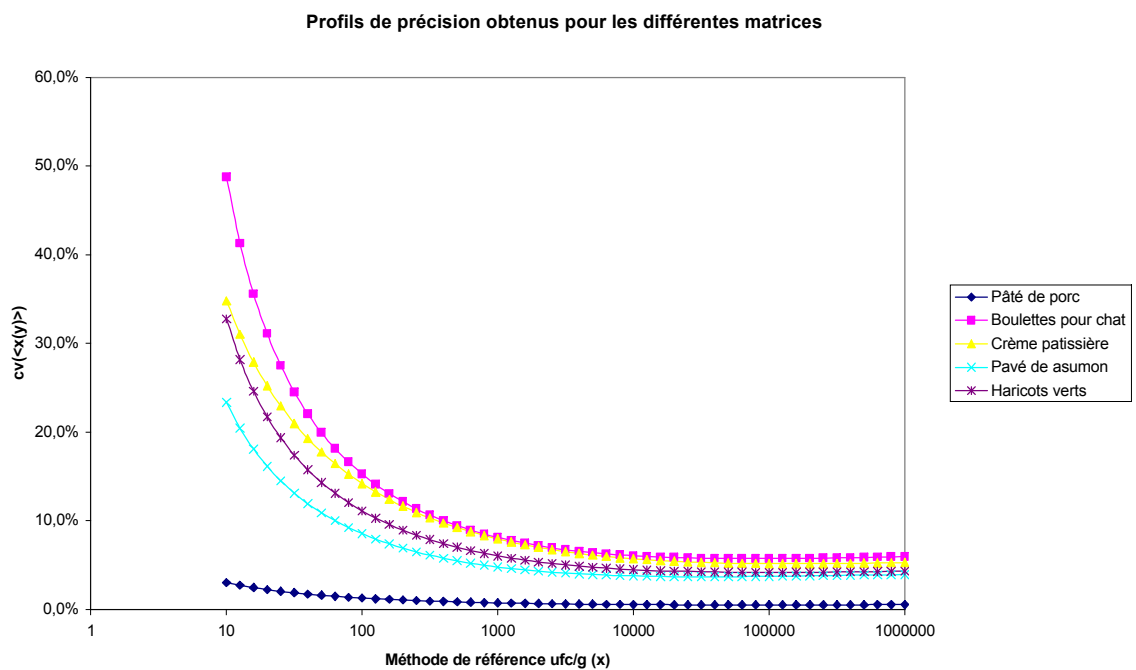
### 1.4.1.3 Sensibilité relative

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 figures 5 et 6.

**Figure 5 - Profils de précision obtenus pour les différentes matrices  
Dilution 1/400**



**Figure 6 - Profils de précision obtenus pour les différentes matrices  
Dilutions combinées**



#### 1.4.1.4 Praticabilité

- ✓ Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser (temps en minutes)

Etape	Méthode ISO 4833		Méthode TEMPO TVC	
	1 échantillon	20 échantillons	1 échantillon	20 échantillons
Prélèvement	4	45	4	45
Ajout diluant Broyage	2	15	2	15
Préparation des boîtes <sup>(2)</sup>	0,5	21	/	/
Dilutions Ensemencements	6	107	2	20
Lecture	2,5	90	0,45	2
Temps total	15	278	8,45	82
Temps pour 1 échantillon	15	13,9	8,45	4,1

Les temps indiqués ne tiennent pas compte de la préparation des milieux qui vient s'ajouter essentiellement pour la méthode de référence, la méthode TEMPO TVC nécessitant uniquement du TS pour la préparation de la suspension-mère, et un ou deux tubes de TS de 9 ml pour les dilutions décimales.

L'utilisation de la méthode TEMPO TVC réduit considérablement les temps de manipulation, en particulier au niveau du poste de lecture.

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

Le volume des consommables par la méthode TEMPO TVC est négligeable par rapport au volume des consommables nécessaires pour la méthode ISO 4833.

L'espace d'incubation nécessaire pour la méthode TEMPO TVC est particulièrement restreint par rapport à celui de la méthode ISO 4833.

---

<sup>(2)</sup> 5 dilutions x 2 boîtes

✓ Délai d'obtention des résultats

Etape	Méthode ISO 4833	Méthode TEMPO TVC
Prélèvement		
Broyage	J0	J0
Analyse		
Lecture	J3 (72h)	J2 (40 à 48 h)

**La méthode TEMPO TVC permet de gagner plus d'un jour (32h) sur l'obtention du résultat par rapport à la méthode ISO 4833.**

✓ 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 kit,
- manipulateur ayant réalisé le test,
- lots de réactifs et consommables utilisés,
- heure de lecture des cartes,
- 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).

✓ Maintenance par le laboratoire

Les performances du TEMPO Reader sont contrôlées une fois par mois à l'aide du kit TEMPO QC qui est composé de :

- 3 flacons TEMPO QC 8  $\mu$ M
- 2 flacons TEMPO QC 20  $\mu$ M
- 3 cartes TEMPO QC 8  $\mu$ M
- 2 cartes TEMPO QC 20  $\mu$ M
- 1 notice.

Ce kit permet de vérifier que le niveau de fluorescence donné par le TEMPO Reader se situe bien dans la plage de valeurs attendues, signifiant que l'appareil est conforme.

**L'intérêt majeur de la méthode TEMPO TVC réside :**

- dans le gain de temps important au niveau de l'analyse et de la lecture,
- dans le délai d'obtention du résultat qui se trouve réduit de 32 heures,
- dans le gain de place à l'incubation des cartes TEMPO TVC et la gestion facilitée des déchets.

## **1.4.2 Etude interlaboratoire**

### **1.4.2.1 Préparation**

Treize laboratoires ont participé à l'étude ; la liste est donnée en annexe 2.

Du lait UHT a été inoculé par la souche d'*Enterobacter cloacae* 10, isolée de produit laitier.

### **1.4.2.2 Analyses**

Les laboratoires collaborateurs et le laboratoire expert ont effectués les analyses à la fois par la méthode alternative et la méthode de référence.

## 1.4.2.3 Résultats

□ **Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs**

**Tableau 9 - Synthèse des résultats obtenus par la méthode alternative et la méthode de référence (en UFC)**

Laboratoires	Niveau 0				Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3			
	Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative	
A	<10	<10	<100	<100	670	950	1100	1900	13000	14000	6400	11000	190000	180000	170000	250000
B	<10	<10	<100	<100	760	910	1200	730	11000	11000	12000	8100	160000	170000	300000	250000
D	<10	<10	<100	<100	1000	1000	1400	860	15000	13000	19000	17000	160000	130000	490000	300000
E	<10	<10	<100	<100	1600	2300	830	1100	26000	31000	20000	22000	510000	430000	490000	150000
F	<10	<10	<100	<100	720	1200	1400	1000	13000	10000	13000	21000	160000	150000	490000	490000
G	<10	<10	<100	<100	610	880	1600	1000	6700	18000	21000	18000	170000	120000	300000	150000
H	<10	<10	<100	<100	1600	1800	1000	1600	18000	19000	12000	11000	220000	230000	210000	300000
I	<10	<10	<100	<100	1000	1700	1400	2800	12000	15000	37000	53000	210000	210000	300000	>490000
J	<10	<10	<100	<100	1000	1300	590	5000	15000	13000	13000	23000	170000	180000	370000	300000

**Tableau 10 - Synthèse des résultats obtenus avec la dilution 1/4000 par la méthode TEMPO TVC (en UFC/g)**

Laboratoires	Niveau 0				Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3			
	Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative	
A	<10	<10	<1000	<1000	670	950	1000	1000	13000	14000	/	19000	190000	180000	120000	180000
B	<10	<10	<1000	<1000	760	910	1000	<1000	11000	11000	12000	20000	160000	170000	290000	310000
D	<10	<10	<1000	<1000	1000	1000	1000	1000	15000	13000	16000	19000	160000	130000	290000	310000
E	<10	<10	<1000	<1000	1600	2300	4500	5700	26000	31000	24000	24000	510000	430000	390000	280000
F	<10	<10	<1000	<1000	720	1200	<1000	46000	13000	10000	48000	7100	160000	150000	210000	290000
G	<10	<10	<1000	<1000	610	880	<1000	1000	6700	18000	8300	63000	170000	120000	190000	310000
H	<10	<10	<1000	<1000	1600	1800	2100	<1000	18000	19000	18000	15000	220000	230000	340000	260000
I	<10	<10	<1000	<1000	1000	1700	4400	1000	12000	15000	40000	56000	210000	210000	190000	910000
J	<10	<10	<1000	<1000	1000	1300	2100	1000	15000	13000	12000	10000	170000	180000	210000	280000

□ **Interprétation statistique**

➤ **Biais**

**Tableau 11 - Valeurs de t(d) obtenues par niveau**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Biais D		t(d)		t critique ddl (n-1)	Conclusion
		d 1/400	d 1/4000	d 1/400	d 1/4000		
0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1	n=9	0,10	NA	1,706	NA	2,306	Biais D non significatif
2	n=9	0,09	NA	0,932	NA	2,306	Biais D non significatif
	n=8	NA	0,12	NA	1,290	2,365	Biais D non significatif
3	n=8	0,20	NA	2,000	NA	2,365	Biais D non significatif
	n = 9	NA	0,20	NA	3,970	2,306	Biais D significatif

NA : Non Applicable

*Niveau critique :  $t(d) < t_{critique}$*

➤ **Répétabilité**

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

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de répétabilité			F calculé		F critique (0,05 ; n ; n)	P %	
		Méthode de référence	Méthode alternative		d 1/400	d 1/4000		d 1/400	d 1/4000
			d 1/400	d 1/4000					
1	n = 9	0,445	0,621	NA	1,947	NA	3,18	17	NA
2	n = 9	0,182	0,458	NA	6,307	NA	3,18	1	NA
	n = 8	0,203	NA	0,331	NA	2,645	3,44	NA	10
3	n = 8	0,08	0,473	NA	35,18	NA	3,44	0	NA
	n = 9	0,077	NA	0,411	NA	28,35	3,18	NA	0

NA : Non Applicable

*Interprétation statistique*

P > 5% : non significatif

0,1 % < P < 1 % : très significatif

1 % < P < 5 % : significatif

P < 0,1 % : hyper significatif

➤ Reproductibilité**Tableau 13 - Valeurs obtenues pour la limite de reproductibilité et valeurs pour le Test F**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de reproductibilité			F calculé (ou 1/F)		F critique (0,05 ; n - 1 ; n - 1)	P %	
		Méthode de référence	Méthode alternative		d 1/400	d 1/4000		d 1/400	d 1/4000
			d 1/400	d 1/4000					
1	n = 9	0,580	0,651	NA	1,07	NA	3,44	44	NA
2	n = 9	0,345	0,690	NA	4,002	NA	3,44	3	NA
	n = 8	0,375	NA	0,544	NA	2,106	3,79	NA	17,3
3	n = 8	0,288	0,514	NA	3,198	NA	3,79	7	NA
	n = 9	0,299	NA	0,414	NA	2,107	3,44	NA	16

NA : Non Applicable

*Interprétation statistique*

P &gt; 5% : non significatif

1 % &lt; P &lt; 5 % : significatif

0,1 % &lt; P &lt; 1 % : très significatif

P &lt; 0,1 % : hyper significatif

**Tableau 14 - Rapports répétabilité / Reproductibilité**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de reproductibilité / limite de répétabilité		
		Méthode de référence	Méthode alternative	
			d 1/400	d 1/4000
1	n = 9	1,304	1,000	NA
2	n = 9	1,891	1,507	NA
	n = 8	1,843	NA	1,644
3	n = 8	3,605	1,087	NA
	n = 9	3,690	NA	1,006

NA : Non Applicable

*Niveau critique : reproductibilité / répétabilité : < 2*➤ Dispersion entre laboratoires**Tableau 15 - Dispersion entre les laboratoires**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Méthode de référence F ou 1/F	Méthode alternative F ou 1/F		F critique (0,05 ; n - 1 ; n)
			d 1/400	d 1/4000	
			1	n = 9	2,401
2	n = 9	6,155	3,541	NA	3,23
	n = 8	5,792	NA	4,408	3,50
3	n = 8	24,986	1,363	NA	3,50
	n = 9	28,238	NA	1,025	3,23

NA : Non Applicable

*Niveau critique : F ou 1/F < F (critique)*

## □ **Discussion**

Le biais entre les deux méthodes apparaît non significatif pour l'ensemble des niveaux et dilutions testés, à l'exception du biais calculé pour le niveau 3 lors d'une dilution au 1/4000<sup>ème</sup> (tableau 11). Avec une valeur de 0,20 log UFC/g identique à la valeur obtenue pour la dilution 1/400<sup>ème</sup> avec un biais donné non significatif, le biais observé à la dilution 1/4000<sup>ème</sup> est acceptable. Au cours de l'étude préliminaire, toutes catégories confondues, le biais entre les deux méthodes était compris entre -0,080 et 0,040 log UFC/g en faveur de la méthode alternative. Les biais observés lors de l'étude collaborative sont légèrement supérieurs, mais en corrélation avec des biais précédemment observés lors de comparaison de méthodes alternatives à la méthode de référence NF EN ISO 4833.

Au cours de l'étude préliminaire, la limite de répétabilité de la méthode TEMPO TVC a été déterminée à 0,528, celle de la méthode de référence était alors de 0,235. Lors de l'étude collaborative, les limites de répétabilité de la méthode TEMPO TVC varient entre 0,331 et 0,621 selon les niveaux et les dilutions testés. Celles de la méthode de référence varient entre 0,077 et 0,445 : l'obtention de valeurs inférieures à 0,1 semble cependant exceptionnelle. La limite de répétabilité de la méthode alternative est supérieure à celle de la méthode de référence, telle qu'observée de manière générale entre une méthode basée sur le principe NPP et une méthode de dénombrement sur gélose (Gangar<sup>3</sup> et Gambrel-Lenarz, 1999). La plupart des études comparatives de méthodes AFNOR ou AOAC rapporte des limites de répétabilité comprises entre 0,7 et 1,8 log UFC/g pour les méthodes de référence basées sur le principe NPP. Les limites de répétabilité de la méthode TEMPO TVC déterminées au cours des deux études apparaissent de ce fait satisfaisantes.

Quelle que soit la dilution ou le niveau testé, les limites de reproductibilité de la méthode TEMPO TVC ne diffèrent pas de celles de la méthode de référence, à l'exception des limites de reproductibilité observées au niveau 2 avec une dilution 1/400<sup>ème</sup>. La différence est donnée significative avec une valeur de P égale à 3% : la limite de reproductibilité de la méthode TEMPO TVC est alors de 0,690, celle de la méthode de référence de 0,375. Lors

---

<sup>3</sup> Gangar V., Curiale M.S., Lindberg K., Gambrel-Lenarz S. (1999) Dry rehydratable film method for enumerating confirmed *Escherichia coli* in poultry, meats and seafood: collaborative study. J. AOAC Int., 82 (1) :73-8

d'études précédentes, il est à noter que les limites de reproductibilité de la méthode de référence NF EN ISO 4833 variaient entre 0,612 et 0,829.

Contrairement à la méthode de référence, la valeur du rapport «Reproductibilité / répétabilité» de la méthode TEMPO TVC est systématiquement inférieure à 2 pour tous les niveaux et dilutions testés, tel que souhaité dans la norme ISO 16140

Enfin, de manière générale, la dispersion des résultats entre laboratoires est meilleure par la méthode TEMPO TVC que par la méthode de référence.

### **1.4.3 Conclusion**

***Les conclusions de l'étude comparative des méthodes sont les suivantes :***

- ✓ La méthode TEMPO TVC montre une linéarité et une exactitude relative satisfaisantes.
- ✓ La limite de répétabilité de la méthode alternative apparaît supérieure à celle de la méthode de référence avec une valeur de 0,528.
- ✓ Le biais entre les deux méthodes est compris entre -0,080 et 0,040 log UFC/g en faveur de la méthode TEMPO TVC.
- ✓ La méthode TEMPO TVC offre :
  - un gain de temps important au niveau de l'analyse et de la lecture,
  - un gain de temps important pour le rendu des résultats,
  - un gain de place à l'incubation des cartes TEMPO TVC,
  - une gestion facilitée des déchets,
  - une traçabilité complète de l'analyse,
  - une simplicité dans la mise en œuvre, et pour la formation des laboratoires.

***Les conclusions de l'étude interlaboratoire sont les suivantes :***

- ✓ Les biais observés entre les deux méthodes sont en faveur de la méthode TEMPO TVC. La valeur la plus importante est égale à 0,2 log UFC/g : elle

est obtenue pour l'analyse d'échantillons présentant une flore totale comprise entre 5,11 et 5,96 log UFC/g tous résultats d'analyse confondus.

- ✓ Les limites de répétabilité de la méthode TEMPO TVC sont satisfaisantes.
- ✓ Les limites de reproductibilité de la méthode TEMPO TVC sont comparables à celles de la méthode de référence.
- ✓ La dispersion des résultats entre laboratoires est plus faible pour la méthode TEMPO TVC que celle observée pour la méthode de référence.

### **1.5 Bilan des modifications intervenues dans la méthode alternative, ayant donné lieu ou non à une extension de validation**

Aucune modification n'est intervenue dans la méthode depuis la dernière validation.

## 2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

6 articles ont été référencés. Ils concluent tous à l'équivalence des résultats de la méthode TEMPO TVC avec ceux des méthodes par dénombrements sur gélose.

ARTICLES			
Auteurs	Titre	Références	Conclusions
P. Paulsen, E. Schopf, and FJM Smulders University of Veterinary Medicine	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	J. Food Prot., Vol. 69, No.10, 2006, p2500-2503	Les performances de la méthode TEMPO TVC ont été comparées à celle du dénombrement sur gélose PCA pour l'analyse de morceaux de viandes crues et surfaces de carcasses. Les résultats des 163 échantillons analysés montrent la justesse de la méthode alternative par rapport à celle de la méthode prise en référence avec l'équation suivant : $\text{Log (TEMPO TVC)} = 1,05 \text{ Log (Ref)} - 0,25$ avec $r = 0,99$
A. Kunicka <i>Technical University of Lodz,</i>	Evaluation of the TEMPO system : An automated method for food microbiological quality control	Journal of biotechnology, Vol. 131 (S), 2007, S69-S72	Les résultats de la méthode TEMPO TVC ont été comparés à ceux obtenus par dénombrements sur PCA pour des échantillons de fromages, viandes crues et végétaux congelés, ionisés et artificiellement contaminés. Des taux de contamination variant de 5 à 9,4. 10 <sup>8</sup> CFU/g ont été appliqués. La relation entre les deux méthodes apparaît linéaire.
A. Kunicka Technical University of Lodz	TEMPO System in Microbiological Analysis of Spices and Food Additives	Pol. J. Food Nutr. Sci., Vol. 57, No.3(A), p. 67-69	Les résultats de la méthode TEMPO TVC ont été comparés à ceux de la méthode de référence ISO 4833 pour l'analyse des épices et additifs. L'étude conclut à la linéarité des résultats entre les deux méthodes.
R. Johnson, J. Mills and L. Bezzole <i>Biomérieux</i>	BioMérieux TEMPO TVC Test Granted PTM Status	Inside Laboratory Management – AOAC International – 2008	Les résultats de la validation AOAC-RI de la méthode TEMPO TVC sont présentés ici de manière synthétique, pour les 22 matrices testées. L'étude montre que la méthode TVC permet de dénombrer la flore totale en 8h, avec des résultats concordants avec ceux de la méthode de référence AOAC.
P. in't Veld and S. Dissel <i>Food and Consumer Product Safety Authority</i>	Evaluation of TEMPO methods for the enumeration of quality indicators in food products	New Food, Issue 1, 2008, p.44-47	Les performances de la méthode TEMPO TVC ont été comparées à celles de la méthode ISO 4833, par l'analyse de 140 échantillons. Les résultats apparaissent clairement comparables, avec une linéarité satisfaisante.

ARTICLES			
Auteurs	Titre	Références	Conclusions
E. Crowley, P. Bird, M. Torontali, J. Agin, and D. Goins, R. Johnson <i>Q Laboratory Inc.</i> <i>bioMérieux</i>	TEMPO TVC for the Enumeration of Aerobic Mesophilic Flora in Foods : Collaborative Study	Journal of AOAC international, Vol. 92, No.1, 2009, p 165-174	Les résultats de la validation AOAC selon le protocole PTM de la méthode TEMPO TVC sont présentés. La méthode alternative a été comparée à la méthode SMEDP pour l'analyse des produits laitiers, et à la méthode AOAC 966.23 pour les autres catégories. Les matrices testées, naturellement contaminées sont les suivantes : viande hachée crue de bœuf, viande de poulet crue, filets cuits de poisson blanc, laitue emballée, et lait. 14 laboratoires collaborateurs ont participé à cette étude. Les résultats montrent une justesse, répétabilité et reproductibilité de la méthode TVC clairement satisfaisantes.

**5 posters sont également à noter.**

POSTERS			
Auteurs	Titre	Références	
D. Versatti, G. Raggi, PJ Cotte-Pattat, L. Bridon, T. Sofia <i>Inalca, BioMérieux</i>	Evaluation of the TEMPO System for Total Viable Count, Total Coliforms and <i>E. coli</i> Enumeration in Meat Products	2005, CCFRA, UK	
D. Sohier, M. Rannou F. Gorse <i>ADRIA Développement</i> <i>Biomérieux</i>	TEMPO system : AFNOR validation according to the ISO 16140 standard	2006, FoodMicro, Italy	
G. Devulder, M. Mou, F. Doleans <i>Biomérieux</i>	Evaluation of the TEMPO System versus the ISO Reference Methods for the Enumeration of Total Viable Count, <i>Escherichia coli</i> and Coliforms in a Variety of Dairy Products	2006, IDF, Shanghai - China	
J. Mills, J. Colon-Reveles, L. Beiner, J. Mayer, R. Johnson, G. Devulder <i>Biomérieux</i>	A Comparative Evaluation of the TEMPO TVC Method for the Enumeration of Viable Aerobic Mesophilic Flora in Foods	2007, IAFP, Orlando – USA	
F. Cattapan, P. Villard, N. Dumont <i>CHELAB,</i> <i>Biomérieux</i>	A New Approach for Workflow Evaluation in Food Microbiology Laboratories : TEMPO, Automated MPN Method <i>versus</i> Plate Count Method	2007, IAFP, Orlando – USA	

### 3 PRESENTATION DES MODIFICATIONS EVENTUELLES ENVISAGEES DANS LA METHODE ALTERNATIVE ET COMPLEMENT D'ETUDE PROPOSE

---

Le projet d'étude complémentaire est présenté ci-après pour la réfrigération des cartes TEMPO® destinées au dénombrement de la flore aérobie mésophile (TEMPO® TVC).

Cette étude vient en complément des analyses réalisées par le laboratoire ADRIA DEVELOPPEMENT, dans le cadre de la validation ISO 16140 obtenue en septembre 2005 pour cette méthode.

**La procédure actuellement validée, décrit la lecture des cartes après une incubation de 40h – 48h à 30°C ± 1°C. Une étape de réfrigération des cartes, après incubation et avant lecture, est testée de manière à vérifier l'équivalence des résultats TEMPO avec et sans réfrigération.**

Cinq catégories de produits sont testées, avec 3 produits minimum par catégorie, appartenant à des types différents et présentant des niveaux de contamination les plus variés possibles, de manière à obtenir au total un minimum de 15 résultats exploitables.

L'incubation des cartes TEMPO® TVC étant comprise entre 40 h et 48 h, quatre cartes indépendantes sont réalisées par essai :

- 2 cartes pour la lecture à 40h puis réfrigération
- 2 cartes pour la lecture à 48h puis réfrigération.

Les 5 catégories alimentaires testées sont celles décrites pour la validation ISO 16140 du paramètre TEMPO TVC :

Catégorie
Produits carnés
Alimentation des animaux de compagnie
Produits laitiers
Fruits et végétaux
Produits de la mer

Les matrices seront toutes naturellement contaminées.

La dilution (1/40, 1/400 ou 1/4000) effectuée à l'analyse sera choisie en fonction du produit testé, et sera précisée dans les tableaux de synthèse des résultats.

Les analyses permettront de comparer, d'une part, les résultats obtenus sans et avec réfrigération et, d'autre part, les résultats obtenus après 24h et 48h de réfrigération.

## Annexe 1 - Résultats de l'exactitude relative

1:Dilution 1/40

2:Dilution 1/400

3:Dilution 1/4000

N° Ech	Date d'analyse	Produit	ISO 4833 *								TEMPO TVC								
			Dilution	Répétition 1		Répétition 2		Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	Incubation 40H				Incubation 48H			
				ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2
239	18/04/2005	Salade de museau de porc	10	29	36	23	19	310	220	2,49	2,34	<100	<100	<2	<2	100	210	2,00	2,32
			100	3	1	4	2					2	2			2	2		
240	18/04/2005	Côtes de veau	10000	>300	>300	>300	>300	29000000	27000000	7,46	7,43	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			100000	284	286	293	243	N	N			3	3			3	3		
241	18/04/2005	Lardons natures	10000	>300	>300	>300	>300	24000000	8100000	7,38	6,91	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			100000	269	209	101	61					3	3			3	3		
242	18/04/2005	Terrine forestière	10	164	177	110	123	1900	1400	3,28	3,15	170	480	2,23	2,68	170	280	2,23	2,45
			100	39	41	29	50					1	1			1	1		
243	18/04/2005	Terrine de lapin aux noisettes	10	51	45	36	50	480	430	2,68	2,63	440	810	2,64	2,91	360	810	2,56	2,91
			100	5	4	4	4					1	1			1	1		
244	18/04/2005	Rillettes du Mans	100	>300	>300	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	370000	490000	5,57	5,69	370000	>490000	5,57	>5,69
			1000	>300	>300	>300	>300					2	2			2	2		
245	18/04/2005	Steak haché de bœuf	10	>300	>300	>300	>300	6400	5700	3,81	3,76	3900	14000	3,59	4,15	3900	14000	3,59	4,15
			100	56	72	57	56					2	2			2	2		
246	18/04/2005	Steak haché de bœuf surgelé	10	>300	>300	>300	>300	>30000	>30000	>4,48	>4,48	44000	45000	4,64	4,65	55000	45000	4,74	4,65
			100	>300	>300	>300	>300					2	2			2	2		
247	18/04/2005	Crème glacée au fruits du verger	10	1	0	0	3	5	15	0,70	1,18	10	<10	1,00	<1	10	10	1,00	1,00
			100	1	2	0	0	e	e			1	1			1	1		
248	18/04/2005	Crème glacée vanille fraise	10	3	7	1	4	50	25	1,70	1,40	21	33	1,32	1,52	10	33	1,00	1,52
			100	1	0	0	0	e	e			1	1			1	1		
249	18/04/2005	Shitakee (champignons déshydratés)	100	14	13	16	12	1400	1900	3,15	3,28	7300	50000	3,86	4,70	11000	50000	4,04	4,70
			1000	7	4	6	7	e				3	3			3	3		
250	18/04/2005	Trompettes (champignons déshydratés)	100000	>300	>300	>300	>300	66000000	93000000	7,82	7,97	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			1000000	71	61	94	91	N	N			3	3			3	3		
251	18/04/2005	Mousserons (champignons déshydratés)	1000	25	43	28	24	39000	33000	4,59	4,52	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			10000	14	3	6	15					3	3			3	3		
252	18/04/2005	Epinards surgelés	10	>300	>300	>300	>300	24000	25000	4,38	4,40	44000	24000	4,64	4,38	44000	24000	4,64	4,38
			100	248	232	261	248					3	3			2	2		
253	18/04/2005	Palets aux choux fleurs et brocolis	10	>300	>300	286	245	5700	2900	3,76	3,46	4500	6000	3,65	3,78	6200	3300	3,79	3,52
			100	49	64	58	52					1	1			2	2		
254	18/04/2005	Palets aux poireaux	100	>300	>300	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	>490000	>490000	>5,69	>5,69	>490000	>490000	>5,69	>5,69
			1000	>300	>300	>300	>300					2	2			2	2		
255	18/04/2005	Colin d'Alaska Grillé à l'huile d'olive et aux fines herbes	10	163	114	200	187	1400	2000	3,15	3,30	2500	2000	3,40	3,30	2500	3000	3,40	3,48
			100	24	15	22	26					2	2			2	2		
256	18/04/2005	Nuggets de poisson	10	210	214	151	150	2100	1600	3,32	3,20	4100	2400	3,61	3,38	1500	2900	3,18	3,46
			100	32	14	17	32					1	1			2	2		
257	18/04/2005	Rosty de poisson	100	74	75	85	78	7900	8100	3,90	3,91	7700	5800	3,89	3,76	8800	5800	3,94	3,76

\* Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

N° Ech	Date d'analyse	Produit	ISO 4833 *								TEMPO TVC								
			Dilution	Répétition 1		Répétition 2		Répétition 1	Répétition 2	Incubation 40H				Incubation 48H					
				ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2
			1000	14	10	9	6					2	2			2	2		
258	18/04/2005	Jambon supérieur avec couenne	10000	223	279	267	238	2500000	2600000	6,40	6,41	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			100000	32	24	31	28					3	3			3	3		
331	04/05/2005	Langue de bœuf	10000	98	116	146	142	1100000	1500000	6,04	6,18	1700000	3700000	6,23	6,57	1700000	4900000	6,23	6,69
			100000	3	19	16	19					3	3			3	3		
332	04/05/2005	Rognons de porc	1000	1	1	0	1	1000e	500e	3,00	2,70	1200	1800	3,08	3,26	1200	2100	3,08	3,32
												2	2			2	2		
333	04/05/2005	Bœuf bourguignon	1000	65	95	116	122	83000	120000	4,92	5,08	48000	170000	4,68	5,23	83000	240000	4,92	5,38
			10000	12	11	11	10					3	3			3	3		
334	04/05/2005	Filet de sebastes	100000	62	61	112	120	8000000	11000000	6,90	7,04	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			1000000	29	25	11	8					3	3			3	3		
335	04/05/2005	Filet de merlan	100000	19	61	47	37	3100000	4000000	6,49	6,60	490000	1100000	5,69	6,04	770000	2100000	5,89	6,32
			1000000	9	9	1	0					3	3			3	3		
336	04/05/2005	Croquettes pour chien	100	49	39	47	43	4500	4300	3,65	3,63	71	10	1,85	1,00	86	45	1,93	1,65
			1000	5	6	3	2					1	1			1	1		
337	04/05/2005	Croquettes pour chats	10	10	7	10	8	85e	90e	1,93	1,95	21	45	1,32	1,65	42	45	1,62	1,65
			100	2	0	1	5					1	1			1	1		
338	04/05/2005	Croquettes pour chats	10	10	7	9	5	85e	70e	1,93	1,85	71	120	1,85	2,08	86	140	1,93	2,15
			100	4	1	1	2					1	1			1	1		
339	04/05/2005	Carottes râpées	100000	241	201	164	144	22000000	16000000	7,34	7,20	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			1000000	26	24	18	22					3	3			3	3		
340	04/05/2005	Mâche	100000	62	64	89	37	6600000	6100000	6,82	6,79	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			1000000	14	5	4	4					3	3			3	3		
341	04/05/2005	Céleri râpé	100000	>300	>300	>300	>300	32000000	65000000	7,51	7,81	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			1000000	32	32	66	63	N	N			3	3			3	3		
342	04/05/2005	Salade Rocquette	100000	59	57	64	73	5900000	7100000	6,77	6,85	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			1000000	6	8	11	8					3	3			3	3		
343	04/05/2005	Poudre de lait HQ	10	98	100	107	93	1100	1000	3,04	3,00	13000	code19	4,11	code19	13000	code19	4,11	code19
			100	22	21	13	15					2	2			2	2		
344	04/05/2005	Poudre de lait	10	39	36	34	30	370	310	2,57	2,49	330	560	2,52	2,75	330	560	2,52	2,75
			100	2	4	4	1					1	1			1	1		
345	04/05/2005	Viande fraîche pour animaux	100000	>300	>300	>300	>300	49000000	77000000	7,69	7,89	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			1000000	39	58	73	80	N	N			3	3			3	3		
346	04/05/2005	Escalope de poulet	10000	59	76	97	102	760000	980000	5,88	5,99	2100000	2500000	6,32	6,40	2100000	2500000	6,32	6,40
			100000	11	4	6	10					3	3			3	3		
347	04/05/2005	Escalope de dinde	10000	11	6	19	14	85000	160000	4,93	5,20	300000	270000	5,48	5,43	300000	370000	5,48	5,57
			100000	2	1	2	0	e				3	3			2	2		
348	04/05/2005	Poitrine de porc sans os	100000	70	88	104	105	8000000	11000000	6,90	7,04	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
			1000000	13	4	13	12					3	3			3	3		
349	04/05/2005	Crème fraîche entière	1000	261	264	174	193	260000	180000	5,41	5,26	400000	410000	5,60	5,61	400000	410000	5,60	5,61
			10000	20	25	18	21					3	3			3	3		
350	04/05/2005	Poudre de lait Raema	10000	35	55	40	53	460000	470000	5,66	5,67	680000	490000	5,83	5,69	680000	490000	5,83	5,69
			100000	5	6	7	4					3	3			3	3		
351	04/05/2005	Edam	1000	>300	>300	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	67000	>49000	4,83	code19	67000	code19	4,83	code19
												2	2			2	2		

N° Ech	Date d'analyse	Produit	ISO 4833 *										TEMPO TVC							
			Dilution	Répétition 1		Répétition 2		Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	Incubation 40H				Incubation 48H				
				ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2	
352	04/05/2005	Babybel	1000	>300	>300	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69	
353	04/05/2005	Mozarella	100 1000	62 3	75 12	49 4	64 8	6900	5700	3,84	3,76	1400 1	2200 1	3,15	3,34	1400 1	2400 1	3,15	3,38	
354	04/05/2005	Abricots secs	10 100	158 24	169 28	167 16	188 22	1700	1800	3,23	3,26	280 1	200 1	2,45	2,30	210 1	150 1	2,32	2,18	

N° Ech	Date d'analyse	Produit	ISO 4833*								TEMPO TVC								
			Dilution	Répétition 1		Répétition 2		Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	Incubation 40H				Incubation 48H			
				ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2
355	04/05/2005	Figues sèches	10 100	241 24	201 20	268 39	218 36	2200	2600	3,34	3,41	4600 2	5700 2	3,66 3,76	4600 2	5700 2	3,66 3,76	3,66 3,76	
356	06/05/2005	Loup de mer	100 1000	43 7	59 11	55 1	55 3	5500	5200	3,74	3,72	2800 2	4800 2	3,45 3,68	8100 2	8100 2	3,91 3,91	3,91 3,91	
357	06/05/2005	Sole tropicale	100 1000	245 47	217 44	272 32	323 59	25000	31000	4,40	4,49	37000 2	49000 2	4,57 4,69	45000 2	82000 2	4,65 4,65	4,91 4,91	
358	06/05/2005	Merlu blanc	100 1000	>300 45	>300 55	>300 44	>300 52	50000	48000	4,70	4,68	17000 2	15000 2	4,23 4,18	34000 2	31000 2	4,53 4,53	4,49 4,49	
359	06/05/2005	Tiramisu	10 100	7 1	6 3	12 1	16 0	65 e	130	1,81	2,11	10 1	33 1	1,00 1,52	33 1	33 1	1,52 1,52	1,52 1,52	
360	06/05/2005	Cocktail de fruits séchés	10 100	34 4	27 3	34 5	29 4	310	330	2,49	2,52	170 1	250 1	2,23 2,40	200 1	380 1	2,30 2,30	2,58 2,58	
361	06/05/2005	Bananes chips	10 100	1 0	2 0	0 0	2 0	15 e	10 e	1,18	1,00	<10 1	33 1	<1 1,52	<10 1	33 1	<1 1,52	1,52 1,52	
362	06/05/2005	Filets de harengs fumés	100 1000	179 12	127 14	266 25	203 29	15000	24000	4,18	4,38	7000 2	5200 2	3,85 3,72	8800 2	10000 2	3,94 3,94	4,00 4,00	
363	06/05/2005	Truite fumée	10 100	95 7	74 5	69 14	75 4	820	740	2,91	2,87	4100 2	4100 2	3,61 3,61	4100 2	4100 2	3,61 3,61	3,61 3,61	
364	06/05/2005	Saumon fumé	1000	>300	>300	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	>490000 2	>490000 2	>5,69 3,72	>5,69 3,72	>490000 2	>490000 2	>5,69 3,94	>5,69 4,00
365	06/05/2005	Poêlée méridionale	10 100	23 6	33 5	76 4	22 7	310	500	2,49	2,70	640 1	400 1	2,81 2,60	730 1	570 1	2,86 2,86	2,76 2,76	
366	06/05/2005	Viande hachée bolognaise	100 1000	98 4	68 9	91 9	88 14	8100	9200	3,91	3,96	5700 2	5300 2	3,76 3,72	6400 2	6900 2	3,81 3,81	3,84 3,84	
367	06/05/2005	Viande hachée de bœuf	10 100	74 3	91 5	81 10	82 8	790	820	2,90	2,91	570 1	1200 1	2,76 3,08	1200 1	1800 1	3,08 3,08	3,26 3,26	
368	06/05/2005	Tablette tendre au bœuf marque A	1000	>300	>300	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	>490000 2	>490000 2	>5,69 3,72	>5,69 3,72	>490000 2	>490000 2	>5,69 3,94	>5,69 4,00
369	06/05/2005	Tablette tendre au bœuf marque B	1000	>300	>300	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	>490000 2	>490000 2	>5,69 3,72	>5,69 3,72	>490000 2	>490000 2	>5,69 3,94	>5,69 4,00
370	06/05/2005	Déchets pour animaux	10000 100000	22 4	22 3	18 1	19 4	230000	190000	5,36	5,28	170000 2	150000 2	5,23 5,18	210000 2	250000 2	5,32 5,32	5,40 5,40	
371	06/05/2005	Viande hachée pour animaux	100 1000	>300 121	>300 124	>300 121	>300 123	120000 N	120000 N	5,08 5,08	5,08 5,08	150000 2	170000 2	5,18 5,23	150000 2	170000 2	5,18 5,18	5,23 5,23	

\* Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

N° Ech	Date d'analyse	Produit	ISO 4833*								TEMPO TVC								
			Dilution	Répétition 1		Répétition 2		Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	Incubation 40H				Incubation 48H			
				ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2
372	06/05/2005	Saucisson pour chien	1000	>300	>300	>300	>300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	>490000	>490000	>5,69	>5,69	>490000	>490000	>5,69	>5,69
				2	2							2	2			2	2		
373	06/05/2005	Aliment complet frais pour animaux	10000 100000	0	0	0	0	<10000	<10000	<4	<4	100	<100	2,00	<2	100	100	2,00	2,00
				2	2							2	2			2	2		
374	06/05/2005	Champignons de Paris	100000 1000000	115	164	166	177	15000000	18000000	7,18	7,26	>4900000	>490000	>6,69	>6,69	>4900000	>4900000	>6,69	>6,69
				18	24	22	21					3	3			3	3		
375	06/05/2005	Pommes de terre en dès	10 100	0	0	0	0	<10	<10	<1	<1	<10	10	<1	1,00	<10	10	<1	1,00
				1	1							1	1			1	1		
376	06/05/2005	Betteraves rouges	10 100	81	96	85	90	880	890	2,94	2,95	450	590	2,65	2,77	450	590	2,76	2,77
				9	8	12	8					2	2			2	2		
377	06/05/2005	Spécialité fromagère en part individuelle	10 100	65	71	203	78	690	1400	2,84	3,15	500	390	2,70	2,59	580	530	2,76	2,72
				8	8	10	9					1	1			1	1		

N° Ech	Date d'analyse	Produit	ISO 4833*								TEMPO TVC								
			Dilution	Répétition 1		Répétition 2		Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	Incubation 40H				Incubation 48H			
				ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2
378	06/05/2005	Cerfeuil frais	10000 100000	>300 43	>300 57	>300 48	>300 64	5000000 N	5600000 N	6,70	6,75	>4900000 3	>4900000 3	>6,69	>6,69	>4900000 3	>4900000 3	>6,69	>6,69
388	11/05/2005	Viande pour animaux	100000 1000000	>300 164	>300 196	>300 127	>300 124	180000000 N	130000000 N	8,26	8,11	>4900000 3	>4900000 3	>6,69	>6,69	>4900000 3	>4900000 3	>6,69	>6,69
389	11/05/2005	Saucisson pour chien	100 1000	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300000 >300000	>300000 >300000	>5,48	>5,48	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69
390	11/05/2005	Concombre	100 1000	180 21	232 26	231 18	219 25	21000 21000	22000 22000	4,32	4,34	22000 2	17000 2	4,34	4,23	29000 2	17000 2	4,46	4,23
391	11/05/2005	Maquereaux fumés	10 100	2 0	9 0	4 0	6 0	55 e	50 e	1,74	1,70	560 1	21 1	2,75	1,32	560 1	21 1	2,75	1,32
392	11/05/2005	Spécialité fromagère en part individuelle	10000 100000	2 0	0 0	0 0	1 0	100000 e	50000 e	5,00	4,70	100 2	<100 2	2,00	<2,00	100 2	<100 2	2,00	<2,00
393	11/05/2005	Poudre de lait	10	51	149	116	149	1000 N	1300 N	3,00	3,11	430 1	520 1	2,63	2,72	460 1	880 1	2,66	2,94
394	11/05/2005	Bouchées pour chien-A	100 1000	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300000 >300000	>300000 >300000	>5,48	>5,48	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69
395	11/05/2005	Bouchées pour chien-B	100 1000	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300000 >300000	>300000 >300000	>5,48	>5,48	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69
396	11/05/2005	Bouchées pour chien-C	100 1000	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300000 >300000	>300000 >300000	>5,48	>5,48	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69
397	16/05/2005	Bouchées pour chien	100 1000	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300000 >300000	>300000 >300000	>5,48	>5,48	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69
398	16/05/2005	Viande de bœuf hachée pour animaux	100 1000	115 9	124 8	121 10	95 8	12000 12000	11000 11000	4,08	4,04	2600 2	8100 2	3,41	3,91	3600 2	8100 2	3,56	3,91
399	16/05/2005	Viande de bœuf hachée pour animaux	100 100	43 6	36 3	40 29	51 2	4000 4000	5500 5500	3,60	3,74	6200 2	2200 2	3,79	3,34	7000 2	2900 2	3,85	3,46
400	16/05/2005	Viande de bœuf hachée pour animaux	100 1000	74 3	77 5	79 4	82 10	7200 7200	8000 8000	3,86	3,90	3600 2	1600 2	3,56	3,20	4400 2	1600 2	3,64	3,20
401	16/05/2005	Viande crue pour animaux	100 1000	57 6	43 8	51 8	46 7	5200 5200	5100 5100	3,72	3,71	5000 2	6400 2	3,70	3,81	5600 2	6400 2	3,75	3,81
402	16/05/2005	Babybel emmenthal	100 1000	89 5	73 9	75 3	77 5	8000 8000	7300 7300	3,90	3,86	1200 1	1100 1	3,08	3,04	1200 2	1700 2	3,08	3,23
403	17/05/2005	Poudre de lait	10 100	53 8	54 2	55 5	78 3	530 530	640 640	2,72	2,81	700 1	320 1	2,85	2,51	970 1	320 1	2,99	2,51

\* Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

N° Ech	Date d'analyse	Produit	ISO 4833*								TEMPO TVC								
			Dilution	Répétition 1		Répétition 2		Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	Incubation 40H				Incubation 48H			
				ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/boite a	ufc/boite b	ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2	Répétition 1	Répétition 2	log ufc/g Rep 1	log ufc/g Rep 2
404	17/05/2005	Crème glacée vanille fraise	100 1000	71 6	55 7	103 14	89 11	6300	9900	3,80	4,00	12000 2	9500 2	4,08	3,98	12000 2	9500 2	4,08	3,98
405	17/05/2005	Crème glacée Tiramisu	10 100	4 0	8 0	5 0	6 0	60 e	55 e	1,78	1,74	21 1	10 1	1,32	1,00	33 1	21 1	1,52	1,32
406	17/05/2005	Courgettes	100 1000	41 4	30 5	49 3	68 5	3600	5700	3,56	3,76	3100 1	4300 1	3,49	3,63	4800 2	4300 2	3,68	3,63
407	17/05/2005	Choux de Bruxelles	10 100	31 1	24 1	22 6	25 4	260	260	2,41	2,41	150 1	89 1	2,18	1,95	160 1	170 1	2,20	2,23
408	17/05/2005	Saucisson pour chien	1000 10000	135 10	153 26	170 11	146 14	150000	160000	5,18	5,20	95000 3	130000 3	4,98	5,11	110000 3	130000 3	5,04	5,11
409	17/05/2005	Saucisson pour chien	100 1000	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300000	>300000	>5,48	>5,48	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69	>490000 2	>490000 2	>5,69	>5,69

## Annexe 2 - Liste des laboratoires collaborateurs

Nom du laboratoire	Contact	Adresse postale
IPHB	Madame DELAMARE	Bvd Saintelette 55 7000 MONS Belgique
LDV 43	Monsieur FILLETON	16, rue de Vienne BP 81 - 43000 LE PUY EN VELAY
RIANS	Madame LANSIAUX	Laiterie Triballat 18220 RIANS
SOGEPS	Madame VOIVENEL	LCAE - Route de Giéville 50890 CONDE / VIRE
ACM VAL DE LOIRE	Monsieur PETAT	30-32 Av. du 21 Août 1994 45270 SELLEGARDE
ASEPT	Madame COIGNARD	Rue Drs Calmette & Guérin BP 2047 - 53020 LAVAL Cédex 09
SILLIKER	Madame GRAZIANA	Laboratoire de Microbiologie 70 Mail Marcel Cachin 38600 FONTAINE
ENVL	Madame VERNOZY	Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle BP 83 - 69280 Marcy L'Etoile
LDA 01	Madame DARBON	Plateforme Alimentec Rue Henri de Boissieu 01000 BOURG EN BRESSE
INALCA	Dr RAGGI	10 Via Europa 26864 Ospedaletto Lodigiano (LO) Italie
SSICA	Dr GOLA Dr PREVIDI	Via F. Tanara, 31/A 43100 PARMA Italie
APPLUS	Mrs BERMEJO	C/ Miguel Yuste 12, 4° Planta 28037 MADRID Espagne
Campden & Chorleywood Food Research Association Group	Dr Roy BETTS	Microbiology Department Chipping Campden GLOUCESTERSHIRE GL55 6LD Royaume-Uni