



## PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode XplOrer64™ est une méthode automatisée par mesure de l'impédancemétrie, en milieu liquide.

Après filtration de 100 mL d'échantillon sur membrane et rinçage de la membrane, celle-ci est transférée dans une cellule de mesure contenant le bouillon spécifique CheckN'Safe™ *Enterococci*. La cellule est incubée pendant 12,5 heures à 37°C dans l'automate qui rend un résultat en UFC/100mL.

## LINEARITE et EXACTITUDE relative

### Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

#### Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2009. L'exploitation statistique a porté sur **73 résultats interprétables** provenant de 170 échantillons (dont 160 naturellement contaminés et 10 artificiellement contaminés), appartenant aux deux catégories d'eau suivantes : eau douce (40 résultats exploitables) et eau de mer (33 résultats exploitables).

Les 10 échantillons artificiellement contaminés sont des échantillons d'eau de mer obtenus en contaminant de l'eau de mer naturelle avec une eau de station d'épuration (niveau  $10^3$  à  $10^4$ /100mL) afin d'obtenir de fortes concentrations.

Les couples matrice/souche ont été testés en parallèle avec les deux méthodes (référence et alternative). Deux réplicats par niveau ont été testés.

Les domaines de contamination (concentration) étaient les suivants : <100, 100-999, et >1000/100mL.

L'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence a été établie pour chaque couple matrice / souche, sur le modèle  $Y = aX + b$ , Y représentant la méthode alternative et X la méthode de référence.

Le biais (D) entre les deux méthodes (alternative – référence) a été calculé en prenant la médiane des valeurs de différence par niveau :

Les résultats obtenus sont les suivants :

Couple matrice/souche	Biais (D) médian	Droite de régression (Alt = a + b Ref)
Eau douce/ <i>Enterococci</i>	0,07	Alt = 0,953 Ref + 0,210
Eau de mer/ <i>Enterococci</i>	-0,10	Alt = 0,747 Ref + 0,498

#### Conclusion pour l'exactitude

L'exactitude relative entre les deux méthodes est satisfaisante, avec une légère surestimation de la méthode alternative sur les bas niveaux.

Il n'existe pas de différences significatives dans la dispersion des résultats fournis par les 2 méthodes.

#### Etude de linéarité

Des essais ont été effectués en 2009 sur des échantillons d'eau douce et d'eau de mer artificiellement contaminés avec une souche d'*Enterococci faecalis*.

Pour chaque couple matrice/souche, les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes** (référence et alternative), aux 3 niveaux de contamination artificielle suivants : 50, 500 et 5000 UFC/100 mL.

Le faible nombre de résultats n'a pas permis de faire une exploitation statistique mais a montré de manière graphique une relation linéaire entre les deux méthodes pour les points obtenus.

#### **Conclusion pour la linéarité**

La relation entre les deux méthodes est linéaire, pour les couples matrice/souche testés.

### **LIMITE DE DETECTION (LOD) ET DE QUANTIFICATION (LOQ)**

#### **Mise en œuvre de la méthode alternative seule**

La limite critique (LC), la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) sont théoriquement calculées selon l'approche décrite dans la norme ISO 13843, qui fait intervenir un modèle binomial négatif.

L'exploitation selon la norme ISO 13843 est applicable seulement aux méthodes de dénombrement de colonies sur gélose et n'est pas applicable à la méthode XplOrer64™.

### **SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)**

#### **Mise en œuvre de la méthode alternative seule**

##### **Tests d'inclusivité**

- Les tests ont porté sur 30 souches cibles.
- 28 souches d'*Enterococci* ont été détectées par la méthode alternative.
- Les 2 souches non reconnues sont une souche d'*Enterococcus avium* (non détectée par la méthode de référence) et une souche d'*Enterococcus faecalis* (parmi 3 testées)

##### **Tests d'exclusivité**

- L'étude de 30 souches non *Enterococci* a donné un résultat faussement positif très bas pour une souche de *Providencia stuartii*. Un second essai a donné un résultat négatif avec cette même souche.

### **PRATICABILITE**

#### **Mise en œuvre de la méthode alternative seule**

- **Délai d'obtention des résultats :**
  - L'obtention des résultats **positifs** se fait en temps réel, en **9h40min à 11h avec la méthode alternative** (heure de préchauffage incluse) contre 36h au minimum avec la méthode de référence.

A titre d'exemples :

- 100 *Enterococci*/100 ml (valeur guide Directive 76/167/CE) sont détectés en 11h ;
- 250 *Enterococci*/100 ml (valeur impérative Directive 2006/7/CE, eau de mer) sont détectés en 10h18min ;
- 370 *Enterococci*/100 ml (recommandation AFSSET eau de mer) sont détectés en 10h03 min ;
- 400 *Enterococci*/100 ml (valeur impérative Directive 2006/7/CE, eau douce) sont détectés en 10h ;
- 660 *Enterococci*/100 ml (recommandation AFSSET eau douce) sont détectés en 9h42 min.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en **13h30min avec la méthode alternative** (heure de préchauffage incluse) contre 36h au minimum avec la méthode de référence.

- **Automatisation des résultats**

- Lecture simple, automatisée et en temps réel des résultats
- Analyse en continu jusqu'à 64 échantillons simultanément
- Calcul automatisé du résultat
- Historiques des données relatives aux échantillons (traçabilité automatisée)

## ETUDE INTERLABORATOIRE

Une étude interlaboratoire a été réalisée en 2009, avec 12 laboratoires collaborateurs. La matrice utilisée était une eau de mer, contaminée artificiellement avec une souche d'entérocoque issue d'un environnement aquatique, aux 4 taux de contamination suivants : 0, 100, 1 000, 10 000 UFC/100 mL.

Les laboratoires ont analysé deux échantillons par niveau de contamination, par chacune des deux méthodes (alternative et référence)

Les données de 4 laboratoires ont été exclus de l'interprétation finale pour les raisons suivantes :

- Un laboratoire a rencontré des problèmes de logiciel lors de l'analyse par la méthode alternative
- Un laboratoire a rendu des résultats aberrants par la méthode alternative
- Deux laboratoires ont rendu des résultats anormaux par la méthode de référence.

### Calcul des écarts-types de fidélité par niveau de concentration

Pour chaque niveau de concentration, les écarts-types de répétabilité, inter-séries et de reproductibilité ont été calculés à partir des répétitions de la méthode alternative, selon le principe de la norme ISO 5725-2.

Les critères de fidélité et de justesse par niveau figurent dans le tableau\* suivant :

Niveau de concentration	Bas	Moyen	Haut
Concentration cible théorique moyenne	1,72	2,89	3,79
Concentration retrouvée moyenne	1,86	2,91	3,63
Écart-type de répétabilité	0,15	0,27	0,14
Écart-type inter-séries	0,32	0,10	0,25
Écart-type de fidélité intermédiaire	0,35	0,29	0,28
Biais moyen absolu	0,14	0,02	-0,16

\* Les résultats sont exprimés en LOG.

### Calcul de l'intervalle de tolérance

L'**intervalle de tolérance** est l'intervalle dans lequel on s'attend à trouver en moyenne une **proportion  $\beta$  de futurs résultats** obtenus en appliquant la méthode en routine, c'est-à-dire dans des conditions de reproductibilité.

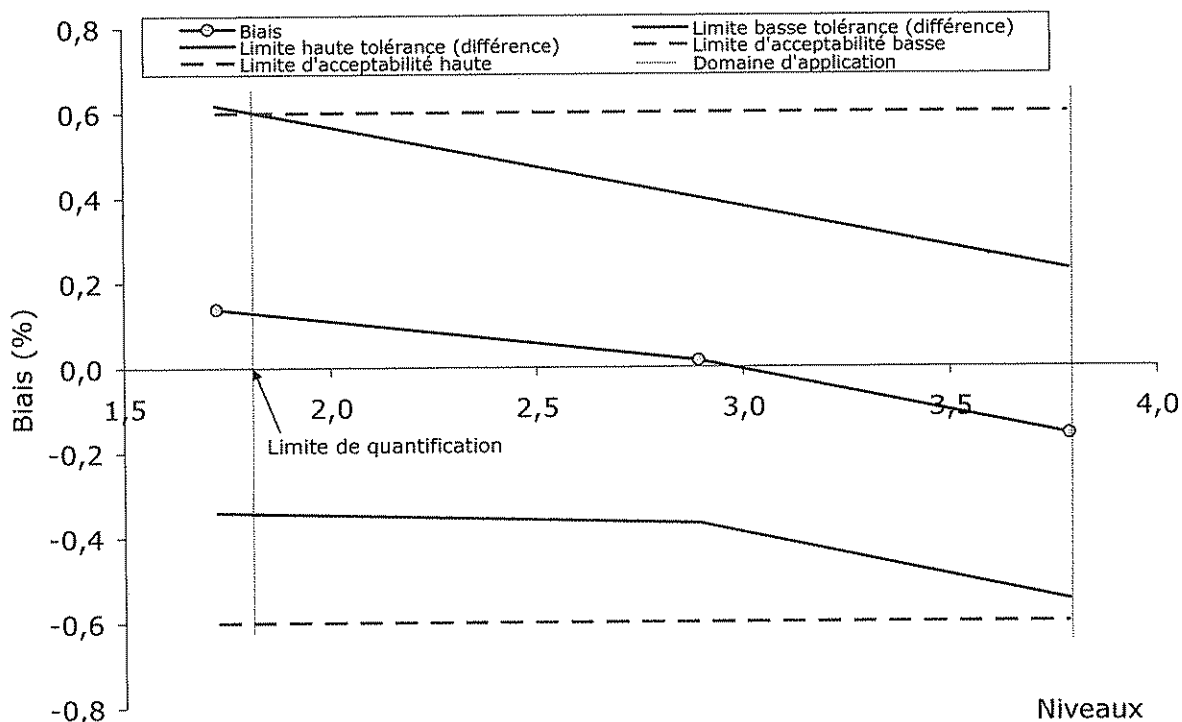
La méthode proposée par Mee [Mee, 1984] a été choisie pour ce protocole. Le calcul se fait à partir des données obtenues avec la méthode alternative pour chaque niveau de concentration. La valeur choisie pour  $\beta$  doit être au moins de 80%.

Le tableau suivant rassemble les calculs des limites des intervalles de tolérance par niveau, pour une probabilité de tolérance  $\beta=80\%$  :

Niveaux	Bas	Moyen	Haut
Concentration théorique moyenne	1,72	2,89	3,79
Limite de tolérance basse	1,38	2,52	3,24
Limite de tolérance haute	2,34	3,29	4,02
<b>Limite de tolérance basse différentielle</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,37</b>	<b>-0,55</b>
<b>Limite de tolérance haute différentielle</b>	<b>0,62</b>	<b>0,40</b>	<b>0,23</b>

### Construction du profil d'exactitude

Les données sélectionnées dans les tableaux précédents ont été reportées sur un graphique pour construire le profil d'exactitude suivant :



### Interprétation des résultats

L'axe horizontal du graphique représente la concentration théorique des niveaux et l'axe vertical la différence entre la concentration théorique et la concentration retrouvée exprimée en %, soit le biais absolu. Les limites des intervalles de tolérance définissent un domaine où se situe une proportion  $\beta=80\%$  de futurs résultats.

Ensuite, le profil d'exactitude peut être comparé à un **intervalle d'acceptabilité**, défini en fonction de l'objectif de la méthode. Les limites des intervalles d'acceptabilité, notées  $\pm\lambda$ , sont ici de 0,6. La limite d'acceptabilité  $\lambda$  dépend du contexte d'utilisation de la méthode et de la proportion  $\beta$  choisie.

Dans le domaine délimité par les traits verticaux discontinus, la méthode est capable de produire une proportion  $\beta$  de résultats compris entre les limites d'acceptabilité. La méthode alternative est dite valide dans tout le domaine où l'intervalle de tolérance est compris entre les limites d'acceptabilité.

Le domaine d'application représente le domaine initialement choisi pour conduire la validation.

La **limite de quantification** est définie comme le point où l'intervalle de tolérance coupe une des deux limites d'acceptabilité. C'est la limite au-delà de laquelle, le microbiologiste ne peut plus garantir un pourcentage  $\beta$  de résultats obtenus par la méthode alternative qui soient acceptables.

La limite de quantification en unité log calculée avec  $\beta$  à 80% et  $\lambda$  à 0,6 est de **1,83** (soit 68 germes / 100 ml).

### **Conclusion**

L'intervalle de tolérance est compris entre les limites d'acceptabilité pour  $\lambda = 0,6$ .

La méthode alternative est valide pour tous les niveaux.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification  
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire  
sur le site [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)