

**Méthodes d'analyse pour l'eau
Performances analytiques certifiées**

ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE D'ANALYSE

**suivant le protocole de validation d'une méthode alternative commerciale
par rapport à une méthode de référence
(AFNOR Certification – Rev.1)**

N° attestation : BRD 07-19 – 11/09

Date de validation :	06.11.2009
Date de modification :	10.05.2010
Extension le :	10.06.2011
Fin de validité :	06.11.2013

La Société **BIO-RAD**
(siège social, 3 Bd Raymond Poincaré
distributeur et 92430 MARNES LA COQUETTE
site de production)

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

XplOrer64™ *Enterococci*

Références du protocole : CheckN'Safe™ *Enterococci* test (Code 54721) - Version 3.3
 Manuel utilisateur XplOrer64 – Version 3.0

DOMAINE D'APPLICATION : Eaux de baignade (eau douce et eau de mer) et eaux résiduaires (eaux usées chargées en matières en suspension de type eaux de stations d'épuration).

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : Aucune

METHODE DE REFERENCE

Norme NF EN ISO 7899-1 : Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduaires. Partie 1 : Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour ensemencement en milieu liquide.

**La Directrice Générale
Florence Méaux**



PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode XplOrer64 - CheckN'Safe *Enterococci* est une méthode automatisée pour la recherche et le dénombrement des entérocoques intestinaux par mesure de l'impédancemétrie, en milieu liquide, sans confirmation.

Chaque cellule de mesure contient le milieu de culture sélectif, qui permet la croissance spécifique des souches d'entérocoques, et deux électrodes mesurant la variation du signal d'impédance pendant la croissance.

La détection des entérocoques et l'analyse des données sont optimisées pour une utilisation avec le système automatisé XplOrer64 et le logiciel XplOrer64 V3.0.

Après filtration de 10 ou 100 mL d'échantillon d'eau (protocole spécifique 1 ou protocole général), la membrane de filtration est transférée dans une cellule de mesure. Dans le cas du protocole spécifique 2, 1 mL d'échantillon est directementensemencé dans la cellule de mesure.

La cellule de mesure est ensuite incubée jusqu'à 16 h à 37°C dans le système automatisé XplOrer64™ qui rend un résultat en germes/100mL.

NOTE (historique de la validation)

La méthode XplOrer64™ - CheckN'Safe™ *Enterococci* a été validée en 2009 pour un domaine d'application restreint aux eaux de baignade.

L'extension de la validation au domaine d'application des eaux résiduaires a donné lieu à des essais complémentaires par tierce partie en 2010/2011.

Ces essais ont porté sur la partie exactitude relative, la linéarité et la limite de détection. Le protocole général et 2 nouveaux protocoles spécifiques ont été testés.

L'ensemble des résultats de l'étude comparative déjà acquis (eaux de baignade) ainsi que les nouveaux résultats ont été exploités avec le logiciel XplOrer64 V3.0 (Avril 2011) et la courbe de calibration « QC Entero ».

LINEARITE et EXACTITUDE relative

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

Etude d'exactitude :

Les courbes de calibration V3.0, spécifiques des échantillons naturels, pour les différents domaines d'application (eaux de baignades, eaux résiduaires – protocoles 1, 2 et 3) ont été utilisées pour l'exploitation des données par le système XplOrer64.

Etude 2009 (sur eaux de baignade) : la première exploitation statistique avait 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 étaient 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 domaines de contamination (concentration) étaient les suivants : <100, 100-999, et >1000/100mL.

Des échantillons de matrices ont été testés en parallèle avec les deux méthodes (référence et alternative), en simple.

La ré-exploitation en 2011 de ces données, avec la version V3.0 du logiciel XplOrer64, a permis de retenir **39 résultats** pour la matrice «eau douce» et **15 résultats** pour la matrice «eau de mer».

Etude 2011 (sur eaux résiduaires) : l'exploitation statistique a porté sur **68 résultats interprétables** provenant de 109 échantillons d'eaux résiduaires traitées (effluents de station d'épuration), tous naturellement contaminés, et analysés en double par chacune des deux méthodes.

Les résultats exploités sont répartis comme suit :

- 21 résultats pour le protocole général (filtration 100 mL),
- 26 résultats pour le protocole spécifique 1 (filtration de 10 mL),
- 21 résultats pour le protocole spécifique 2 (ensemencement direct de 1mL).

Les domaines de contamination (concentration) varient en fonction des matrices analysées:

- eaux de mer : de $1,5.10^1$ à $6,5.10^2$
- eaux douces : de $1,5.10^1$ à $2,1.10^3$
- eau de STEP : de $5,8.10^1$ à $2,9.10^6$

L'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence a été établie sur le modèle $Y = aX + b$, l'axe vertical Y représentant (\log *Enterococci* / 100 mL) de la méthode alternative et l'axe horizontal X représentant (\log *Enterococci* / 100 mL) de 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 :

Matrice - Protocole	Biais (D) médian	Droite de régression (\log <i>Enterococci</i> / 100 mL)
Eau douce *	0,051	$\log(\text{Alt}) = 0,8672 \log(\text{Ref}) + 0,3521$
Eau de mer*	0,452	$\log(\text{Alt}) = 0,0033 \log(\text{Ref}) + 0,7693$
Eaux de baignade*	0,064	$\log(\text{Alt}) = 0,7227 \log(\text{Ref}) + 0,6756$
Eaux usées – Protocole général (filtration 100 mL) **	-0,140	$\log(\text{Alt}) = 0,7924 \log(\text{Ref}) + 0,6062$
Eaux usées - Protocole spécifique 1 (filtration 10 mL) **	-0,319	$\log(\text{Alt}) = 0,6996 \log(\text{Ref}) + 0,7588$
Eaux usées protocole spécifique 2 (ensemencement direct 1 mL) **	-0,109	$\log(\text{Alt}) = 0,9802 \log(\text{Ref}) + 0,7900$

* l'étude a été réalisée en simple en 2009 (39 résultats exploitables 'eau douce' et 15 résultats exploitables 'eau de mer')

** les interprétations statistiques ont été réalisées avec les données obtenues après 16 heures d'incubation de la méthode XplOrer64

Conclusion pour l'exactitude

Il n'existe pas de différence significative dans la dispersion des résultats fournis par les 2 méthodes, quel que soit le domaine d'application et le protocole utilisé pour la méthode alternative.

Etude de linéarité

Etude 2009 : des essais ont été effectués sur des échantillons d'eau douce et d'eau de mer artificiellement contaminés chacun 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.

La courbe de calibration «QC *Entero*» spécifique des échantillons artificiellement contaminés a été utilisée pour la ré-exploitation des données par le système XplOrer64. Le temps de détection maximum associé à cette équation de calibration est de 13 h

Etude 2011 : des essais ont été effectués sur des échantillons d'eaux résiduaires traitées (effluents de station d'épuration) artificiellement contaminés chacun 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 – 3 protocoles testés), aux 3 niveaux de contamination artificielle suivants : $2 \cdot 10^2$ germes/100 mL, $2 \cdot 10^4$ germes/100 mL, $2 \cdot 10^6$ germes/100 mL.

La courbe de calibration «QC *Entero*» spécifique des échantillons artificiellement contaminés a été utilisée pour l'exploitation des données par le système XplOrer64. Le temps de détection maximum associé à cette équation de calibration est de 13 h.

Les résultats obtenus sont repris dans le tableau suivant, pour chaque matrice et protocole :

Matrice - Protocole	Droite de régression (log <i>Enterococci</i> / 100 mL)
Eau douce	$\log(\text{Alt}) = 0,918 \log(\text{Ref}) - 0,036$
Eau de mer	$\log(\text{Alt}) = 0,933 \log(\text{Ref}) - 0,137$
Eaux de baignade	$\log(\text{Alt}) = 0,920 \log(\text{Ref}) - 0,067$
Eaux usées – Protocole général (filtration 100 mL)	$\log(\text{Alt}) = 0,915 \log(\text{Ref}) + 0,457$
Eaux usées - Protocole spécifique 1 (filtration 10 mL)	$\log(\text{Alt}) = 0,908 \log(\text{Ref}) + 0,461$
Eaux usées protocole spécifique 2 (ensemencement direct 1 mL)	$\log(\text{Alt}) = 0,805 \log(\text{Ref}) + 1,397$

Conclusion pour la linéarité

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

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

Mise en œuvre de la méthode alternative seule

La limite de détection (LOD) a été déterminée par l'analyse d'une culture pure d'entérocoques avec la méthode alternative. Cinq niveaux d'inoculation ont été testés, avec six répétitions par niveau.

La courbe de calibration «QC *Entero*» spécifique des échantillons artificiellement contaminés a été utilisée pour l'exploitation des données par le système XplOrer64.

Les limites de détection ont été évaluées avec chacun des 3 protocoles de la méthode XplOrer64 - CheckN'Safe™ *E. coli* dans des eaux résiduaires.

Les niveaux de contamination étaient les suivants (en entérocoques / 100 mL) :

Protocole général filtration de 100mL	Protocole spécifique 1 filtration de 10mL	Protocole spécifique 2 ensemencement de 1mL
0,0	0,0	0
0,5	1,0	0,5
1,1	2,1	0,7
2,1	5,2	1,4
	10,4	2,9

L'étude de la limite de détection a été étudiée selon le protocole décrit dans la norme NF EN ISO 16140. Les formules utilisées sont les suivantes :

	Formule	
Limite critique (LC)	$1,65 s_0 + x_0$	pour $\alpha = 5\%$ (et $1 - \beta = 50\%$)
Limite de détection (LOD)	$3,3 s_0 + x_0$	pour $\alpha = 5\%$ (et $1 - \beta = 95\%$)
Limite de quantification (LOQ)	$10 s_0 + x_0$	

Où :

- s_0 est l'écart-type correspondant des déterminations et x_0 le biais.
- α est la probabilité de détecter une différence qui n'existe pas (faux positif)
- β est la probabilité de ne pas détecter une différence vraie (faux négatif).
- La puissance $1-\beta$ est la probabilité de détecter une valeur supérieure à LC.

Pour les 2 protocoles spécifiques, un facteur 10 ou 100 en liaison avec les prises d'essai 10 ou 100 fois plus faible a été appliqué aux résultats de la courbe de calibration.

Les valeurs obtenues sont les suivantes (en *Enterococci* /100 mL):

	Protocole général filtration de 100mL	Protocole spécifique 1 filtration de 10mL	Protocole spécifique 2 ensemencement de 1mL
LC	14	$7,9 \cdot 10^1$	$1,8 \cdot 10^3$
LOD	19	$1,4 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^3$
LOQ	41	$3,8 \cdot 10^2$	$4,4 \cdot 10^3$

Conclusion

Les limites de détection observées pour les protocoles spécifiques sont 10 à 100 fois plus élevées que celles du protocole général, en relation avec les prises d'essai plus faibles.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en œuvre de la méthode alternative seule

L'étude a été réalisée en 2009 mais les résultats ont été réexploités en 2011 avec le logiciel XplOrer64™ Software V3.0 (Avril 2011) et la courbe de calibration « QC *Entero* » qui est spécifique des échantillons artificiellement contaminés (avec un temps de détection maximum pour cette équation de 13 h).

Tests d'inclusivité

- Sur 30 souches d'entérocoques intestinaux testées, 27 souches ont été détectées par la méthode XplOrer64™ - CheckN'Safe™ *Enterococci*.

- Les 3 souches suivantes n'ont pas été détectées car le temps de détection maximum (13h) était dépassé:
 - une souche d'*Enterococcus avium*, pas détectée non plus par la méthode de référence.
 - une souche d'*Enterococcus faecalis* (sur 3 testées),
 - une souche d'*Enterococcus gallinarum* (sur 5 testées),

Tests d'exclusivité

- L'étude de 30 souches non *Enterococci* avait donné un résultat faussement positif très bas pour une souche de *Providencia stuartii* avec la version V2.0 du logiciel XplOrer64™ Manager. Cette souche n'est plus détectée après traitement du signal avec la nouvelle version du logiciel XplOrer64™ Manager V3.0.

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 un temps maximum de **13,5 heures** pour les **eaux de baignade** et **17 heures** pour les **eaux résiduaires** avec la **méthode alternative** (heure de préchauffage incluse), contre 36 à 72 heures au minimum avec la méthode de référence.
 - Les résultats **négatifs** sont obtenus en **13h30** pour les **eaux de baignade** et **17h** pour les **eaux résiduaires** avec la **méthode alternative** (heure de préchauffage incluse) contre 36 à 72 heures avec la méthode de référence.
- **Automatisation des résultats**
 - Lecture simple, automatisée et en temps réel des résultats,
 - Analyse en continu jusqu'à 62 échantillons simultanément,
 - Calcul automatisé du résultat exprimé en germes/100 mL,
 - 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 germes/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 exclues 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.

(La version V2.0 du logiciel XplOrer64™ a été utilisée)

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 (*résultats exprimés en Log*):

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

Calcul de l'intervalle de tolérance

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

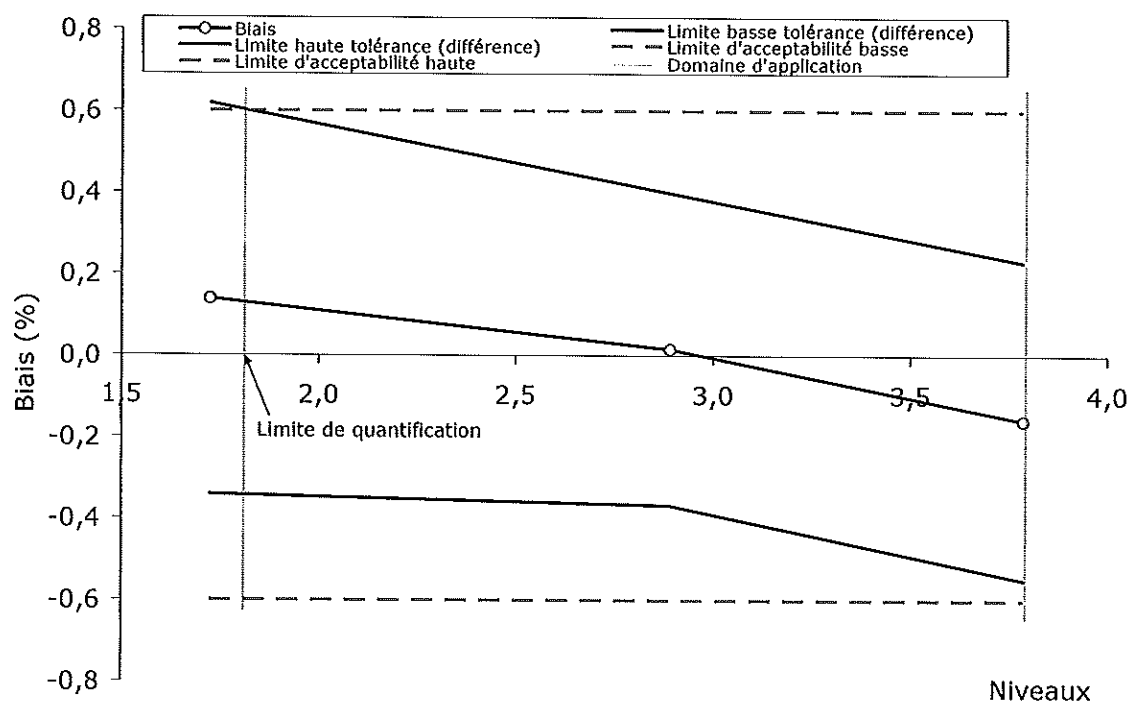
La méthode proposée par Mee [Mee, 1984] a été choisie pour ce protocole. Le calcul se fait à partir des données obtenues avec la méthode alternative pour chaque niveau de concentration. La valeur choisie pour β doit être au moins de 80%.

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
Limite de tolérance basse différentielle	-0,34	-0,37	-0,55
Limite de tolérance haute différentielle	0,62	0,40	0,23

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 λ dépend du contexte d'utilisation de la méthode et de la proportion β choisie.

Dans le domaine délimité par les traits verticaux discontinus, la méthode est capable de produire une proportion β 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 β de résultats obtenus par la méthode alternative qui soient acceptables.

La limite de quantification en unité log calculée avec β à 80% et λ à 0,6 est de **1,449** (soit **28** 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