



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. 0)

N° attestation : BRD 07/20-03/11

Date de validation :	29.03.2011
Fin de validité :	29.03.2015

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 :

RAPID'E.coli 2 + Supplément (Water Testing)

**Dénombrement des bactéries coliformes β D-galactosidase positive
et des *Escherichia coli* β D-glucuronidase positive**

Références du protocole :


- RAPID'E.coli 2 Supplément (pour le contrôle des eaux) : 355-5298 V5
- RAPID'E.coli 2 Agar (pour le contrôle des eaux) : 356-3982 / 355-5296 V3

DOMAINE D'APPLICATION : Eaux de consommation humaine à faible teneur en matière en suspension (MES), traitée ou non.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : Aucune

METHODE DE REFERENCE

Norme NF EN ISO 9308-1 : Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et bactéries coliformes. Partie 1 : Méthode par filtration sur membrane.


La Directrice Générale
Florence Méaux

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode RAPID'E.coli 2 + Supplément (Water Testing) est une méthode chromogénique qui permet le dénombrement simultané des coliformes totaux et des *Escherichia coli*, après une étape de filtration sur membrane d'un échantillon d'eau.

Le principe du milieu complet (RAPID'E.coli 2 supplémenté) repose sur la détection simultanée de deux activités enzymatiques : la β -DGalactosidase (GAL) et la β -D-Glucuronidase (GLUC) par deux substrats chromogéniques :

- le clivage du substrat spécifique de la GAL conduit à la formation d'un précipité donnant une coloration verte aux colonies positives pour cette enzyme (coliformes),
- le clivage du substrat spécifique de la GLUC conduit à la formation d'un précipité donnant une coloration rose aux colonies positives pour cette enzyme (*E. coli*).

Le résultat de l'analyse permet de distinguer les coliformes (GAL+/GLUC-) qui forment des colonies vertes, et les *E.coli* (GAL+/GLUC+) qui forment des colonies bleues foncées à violettes en raison de la superposition des deux couleurs.

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 2010. L'exploitation statistique a porté sur 50 résultats interprétables pour le paramètre « coliformes » et 42 résultats interprétables pour le paramètre « *E. coli* », provenant de 66 échantillons, appartenant aux deux catégories d'eau suivantes :

- eaux traitées à faible teneur en matière en suspension (MES) : eau de réseau
- eaux non traitées à faible teneur en matière en suspension (MES) : eau de minérale, eau de source, eau de pluie/souterraine

Des contaminations artificielles ont été réalisées en utilisant, soit des suspensions contaminantes contenant des *E.coli* ou des coliformes, soit des eaux naturellement contaminées (contamination par mélange). Parmi les résultats exploités, 48 résultats « coliformes » et 42 résultats « *E. coli* » sont issus d'échantillons artificiellement contaminés, soit un pourcentage de contamination artificielle de 96 et 100% respectivement.

Deux répliqués par couple matrice/souche ont été analysés en parallèle avec les deux méthodes (référence et alternative).

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 $y = bx + a$, y représentant la méthode alternative ($\log(\text{Alt})$) et x la méthode de référence ($\log(\text{Ref})$).

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 en log	Droite de régression $\log(\text{Alt}) = b \cdot \log(\text{Ref}) + a$
Eau traitées/ <i>E. coli</i>	-0,218	$\log(\text{Alt}) = 1,163 \cdot \log(\text{Ref}) - 0,471$
Eau non traitées/ <i>E. coli</i>	-0,074	$\log(\text{Alt}) = 0,977 \cdot \log(\text{Ref}) - 0,078$
Eau traitées/coliformes	-0,045	$\log(\text{Alt}) = 0,990 \cdot \log(\text{Ref}) + 0,022$
Eau non traitées/coliformes	-0,060	$\log(\text{Alt}) = 0,948 \cdot \log(\text{Ref}) - 0,020$

Conclusion pour l'exactitude

L'exactitude relative entre les deux méthodes est satisfaisante. Pour le couple eaux traitées / E.coli, un biais faible mais systématique est observé entre la méthode de référence et la méthode alternative.

Etude de linéarité

Des essais ont été effectués en 2010 sur les couples matrice/souche figurant dans le tableau ci-dessous. 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 :

Niveaux de contamination	Eau de réseau	Eau minérale
Niveau 1	5 à 10 germes/100 mL	5 à 10 germes/250 mL
Niveau 2	20 germes/100 mL	20 germes/250 mL
Niveau 3	200 germes/100 mL	200 germes/250 mL

Les résultats obtenus sont les suivants :

Couple matrice/souche	Droite de régression	R ²
Eau de réseau / <i>E. coli</i>	$\text{Log(Alt)} = 0,9276.\text{log(Ref)} + 0,1695$	0,9756
Eau minérale / <i>E. coli</i>	$\text{Log(Alt)} = 1,1218.\text{log(Ref)} - 0,2128$	0,9797

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

Une culture pure d'une souche d'*E. coli* a été analysée par la méthode alternative, à cinq niveaux de contamination, avec six répétitions pour chaque niveau, dans deux types d'eau : eau de réseau et eau minérale.

Les niveaux de contamination étaient les suivants :

Eau de réseau, en UFC/100mL	0	0,180	0,224	0,500	1,440
Eau minérale, en UFC/250mL	0	0,050	0,520	0,705	1,030

L'étude de la limite de détection a été étudiée selon le protocole décrit dans la norme NF EN ISO 16140.

Les valeurs obtenues sont les suivantes:

	Formule	Eau de réseau	Eau minérale	
		UFC/100 mL	UFC/250 mL	UFC/100 mL
Limite critique (LC)	$1,65s_0 + x_0$ pour $\alpha = 5\%$ (et $1 - \beta = 50\%$)	3,77	2,24	0,90
Limite de détection (LOD)	$3,3s_0 + x_0$ pour $\alpha = 5\%$ (et $1 - \beta = 95\%$)	6,05	3,48	1,40
Limite de quantification (LOQ)	$10s_0 + x_0$	15,30	8,52	3,40

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.

Conclusion

La LOD et la LOQ de la méthode alternative sont adaptées à son domaine d'application.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en œuvre de la méthode alternative seule

Tests d'inclusivité

Les tests ont porté sur 43 souches cibles, dont **20 souches d'*E. coli*** et **23 souches de coliformes** (non *E. coli*).

- Les 20 souches d'*E. coli* testées ont été détectées par la méthode alternative.
- Sur les 23 souches de coliformes autres qu'*E. coli*, une souche n'a pas été détectée. Il s'agissait d'une souche d'*Hafnia alvei*, d'origine alimentaire. Cette souche a donné des colonies blanches non caractéristiques (GAL-/GLUC-) sur le milieu RAPID'E.coli2 + Supplement (Water testing). Sur gélose TTC-tergitol, les colonies étaient bien caractéristiques (lactose +).

Tests d'exclusivité

- Sur les 32 souches non coliformes testées, 3 ont été détectées par la méthode alternative. Des réactions croisées ont été observées avec une souche de *Salmonella* et une souche de *Shigella sonnei* possédant des activités β -D-Galactosidase et β -D-Glucuronidase (GAL+/GLUC+) ainsi qu'une souche d'*Erwinia* possédant une activité β -D-Galactosidase (GAL+/GLUC-).

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seule

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en **1 jour avec la méthode alternative** contre 2 jours avec la méthode de référence incluant la confirmation, voire 3 jours si les colonies sont douteuses.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en **1 jour avec la méthode alternative** contre 2 jours avec la méthode de référence.

ETUDE INTERLABORATOIRE

Une étude interlaboratoire a été réalisée en 2011, avec 16 laboratoires collaborateurs. La matrice utilisée était une eau de source, contaminée artificiellement avec une souche d'*E. coli* (issue d'eau de source non embouteillée), aux 4 taux de contamination suivants : 0, 5-10, 30 et 100 UFC/100 mL.

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

Les données de trois laboratoires ont été exclues de l'interprétation finale en raison d'une réception des échantillons hors délai.

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. Les résultats sont exprimés en log (UFC/100 mL) :

Niveau de concentration	Bas	Moyen	Haut
Concentration cible théorique moyenne (en log N)	0,85	1,30	1,84
Concentration retrouvée moyenne (en log N)	0,68	1,05	1,63
Écart-type de répétabilité	0,23	0,13	0,10
Écart-type inter-séries	0,30	0,15	0,13
Écart-type de fidélité	0,38	0,20	0,17
Biais général absolu	0,17	0,25	0,20
Biais relatif	-20%	-19%	-11%

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.

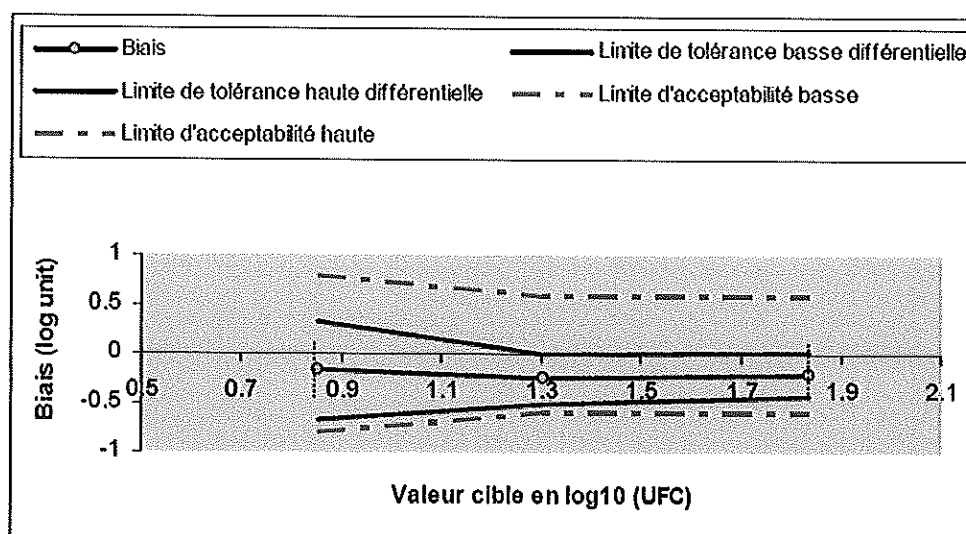
La méthode proposée par Mee [Mee, 1984] a été choisie pour ce protocole. Le calcul se fait à partir des données obtenues avec la méthode alternative pour chaque niveau de concentration. La valeur choisie pour β doit être au moins de 80%.

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 (en log N)	0,85	1,30	1,84
Limite de tolérance basse	0,18	0,79	1,41
Limite de tolérance haute	1,18	1,31	1,85
Limite de tolérance basse différentielle	-0,67	-0,51	-0,42
Limite de tolérance haute différentielle	0,33	0,01	0,01

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 log, 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. La **limite d'acceptabilité** λ dépend du contexte d'utilisation de la méthode et de la proportion β choisie.

Les limites des intervalles d'acceptabilité, notées $\pm\lambda$, ont été fixées à $\pm 0,8 \log$ (UFC/100mL) pour le niveau 1, et $\pm 0,6 \log$ (UFC/100mL) pour les niveaux 2 et 3.

Les limites d'acceptabilité varient avec le niveau de contamination pour prendre en compte la plus grande dispersion des résultats, du fait de dénombrements de petit nombre, pour le niveau de contamination le plus faible (niveau 1).

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. Aucune limite de quantification n'a été mise en évidence dans le domaine de contamination étudié.

Conclusion

Le profil d'exactitude avec une **probabilité de tolérance** $\beta=80\%$ a permis de conclure à la validité de la méthode sur l'ensemble du domaine des eaux de boisson :

- Pour $\lambda = \pm 0,8 \log$ (UFC/100mL), le domaine de validité s'étend de 0,85 à 1,84 log (UFC/100mL)
- Pour $\lambda = \pm 0,6 \log$ (UFC/100mL), le domaine de validité s'étend de 1,30 à 1,84 log (UFC/100mL).

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification toute réclamation concernant les performances de la méthode validée. Le document de synthèse des études préliminaire et inter-laboratoire est disponible sur le site www.afnor-validation.org