



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 : IDX 33/01 – 11/09

Date de validation : 06.11.2009  
Fin de validité : 06.11.2013

La Société IDEXX Laboratories, Inc.  
(siège social et 1 IDEXX Drive  
site de production) Westbrook, Maine 04092  
USA

Correspondant IDEXX Laboratories  
en Europe Bâtiment Floride Eragny Parc  
11 rue Rosa Luxembourg  
BP 50232 Eragny sur Oise  
F-95614 Cergy Pontoise CEDEX

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

**COLILERT-18® / QUANTI-TRAY®**

Dénombrement des bactéries coliformes  $\beta$ -galactosidase positive  
et des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive

Références du protocole :

- Colilert-18 : 06-02027-17
- Quanti-Tray : 06-02030-13

DOMAINE D'APPLICATION : Eau de consommation humaine

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.

Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN

AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France  
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 91 91  
[www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org) et [www.afnor-validation.com](http://www.afnor-validation.com)

## PRINCIPE DE LA METHODE

Colilert-18®/Quanti-Tray® est une méthode colorimétrique/fluorimétrique utilisée pour la détection et le dénombrement des bactéries coliformes  $\beta$ -galactosidase positive et des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive dans les eaux de boisson.

Cette méthode est basée sur la Technologie DST (Definite Substrate Technology) comprenant le minimum d'éléments nutritifs indispensables pour les microorganismes de l'eau, et le dénombrement NPP avec 51 puits. Une incubation à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  est réalisée.

Lorsque les coliformes totaux métabolisent l'indicateur ONPG, le milieu vire au jaune. Lorsque les *E. coli* métabolisent l'indicateur MUG, le milieu devient fluorescent.

### NOTE

Dans cette étude, les résultats obtenus ne sont pas exprimés en log : se reporter aux unités spécifiées.

### 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 **108 résultats interprétables** provenant de 130 échantillons artificiellement contaminés, appartenant aux deux catégories d'eau suivantes : **eau de distribution** et **eau de fontaine**.

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

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 (Alt) et X la méthode de référence (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	Droite de régression (Alt = a Ref + b)
Eau de fontaine/ <i>E. coli</i>	2,150	Alt = 1,155 Ref – 3,392
Eau de distribution/ <i>E. coli</i>	4,425	Alt = 0,971 Ref – 6,091
Eau de fontaine/coliformes	1,050	Alt = 1,031 Ref + 1,749
Eau de distribution/coliformes	-1,000	Alt = 1,256 – 3,008 Ref

#### Conclusion pour l'exactitude

L'exactitude relative entre les deux méthodes est satisfaisante.

#### Etude de linéarité

Des essais ont été effectués en 2009 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 4 niveaux de contamination artificielle suivants : 10, 30, 50, 100 UFC/100 mL.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Couple matrice/souche	Droite de régression
Eau de distribution / <i>E. coli</i>	Alt = 1,099 Réf + 6.935
Eau de fontaine / coliformes	Alt = 0,919 Réf – 0,529

#### 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 de la souche d'*E. coli* ESC.1.112 et une culture pure de la souche *Citrobacter freundii* CIT.2.2 ont été analysées par la méthode alternative, à quatre niveaux de contamination (0 – 0,25 – 0,5 – 1 UFC/100 mL), avec six répétitions pour chaque niveau, dans de l'eau stérilisée.

La limite critique (LC), la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été calculées selon l'approche décrite dans la norme ISO 13843, qui fait intervenir un modèle binomial négatif. Le niveau 0,5 UFC/100mL a servi au calcul.

Les résultats sont les suivants pour *E. coli* :

	Valeur obtenue
LC	0,85
LOD	1,70
LOQ	5,16

Les résultats sont les suivants pour les coliformes :

	Valeur obtenue
LC	1,40
LOD	2,31
LOQ	5,98

#### 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 50 souches cibles, dont 20 souches d'*E.coli* et 30 souches de coliformes (non *E. coli*).
- 25 souches de coliformes ont été détectées par la méthode alternative. Les 5 souches non reconnues ne sont pas détectées par la méthode de référence ou ne sont pas caractéristiques sur le milieu TTC-Tergitol de la méthode de référence. Ce sont des souches de *Kluyvera intermedia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea spp* et *Rahnella aquatilis*.
- 1 souche d'*E.coli* n'a pas été détectée par la méthode alternative. C'est une souche ATCC 8739 non détectée par la méthode de référence

### Tests d'exclusivité

- L'étude de 30 souches non coliformes n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

### PRATICABILITE

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

- **Délai d'obtention des résultats :**
  - L'obtention des résultats **positifs** se fait en **18 heures avec la méthode alternative** contre 48 heures avec la méthode de référence incluant la confirmation, voire 72 heures si les colonies sont douteuses.
  - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en **18 heures avec la méthode alternative** contre 48 heures avec la méthode de référence.

### ETUDE INTERLABORATOIRE

Une étude interlaboratoire a été réalisée en 2009, avec 13 laboratoires collaborateurs. La matrice utilisée était une eau de distribution, contaminée artificiellement avec une souche d'*E. coli* (issu d'un environnement aquatique), aux 4 taux de contamination suivants : 0, 1-10, 10-50, 50-200 UFC/100mL.

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

Les données de deux laboratoires ont été exclues de l'interprétation finale pour les raisons suivantes :

- un laboratoire n'a pas reporté les résultats de la lecture des puits fluorescents sur la feuille de résultats
- l'autre laboratoire na pas dénombré les boîtes de TTC-Tergitol supérieures à 100 UFC/100 mL.

### 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	10,000	52,000	112,000
Concentration retrouvée moyenne	11,227	61,227	147,318
Écart-type de répétabilité	3,126	13,683	36,070
Écart-type inter-séries	1,853	10,045	28,727
Écart-type de fidélité intermédiaire	3,634	16,974	46,112
Biais moyen absolu	1,123	1,177	1,315

*Les résultats sont exprimés en UFC/100 mL et en NPP / 100 mL*

## 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.

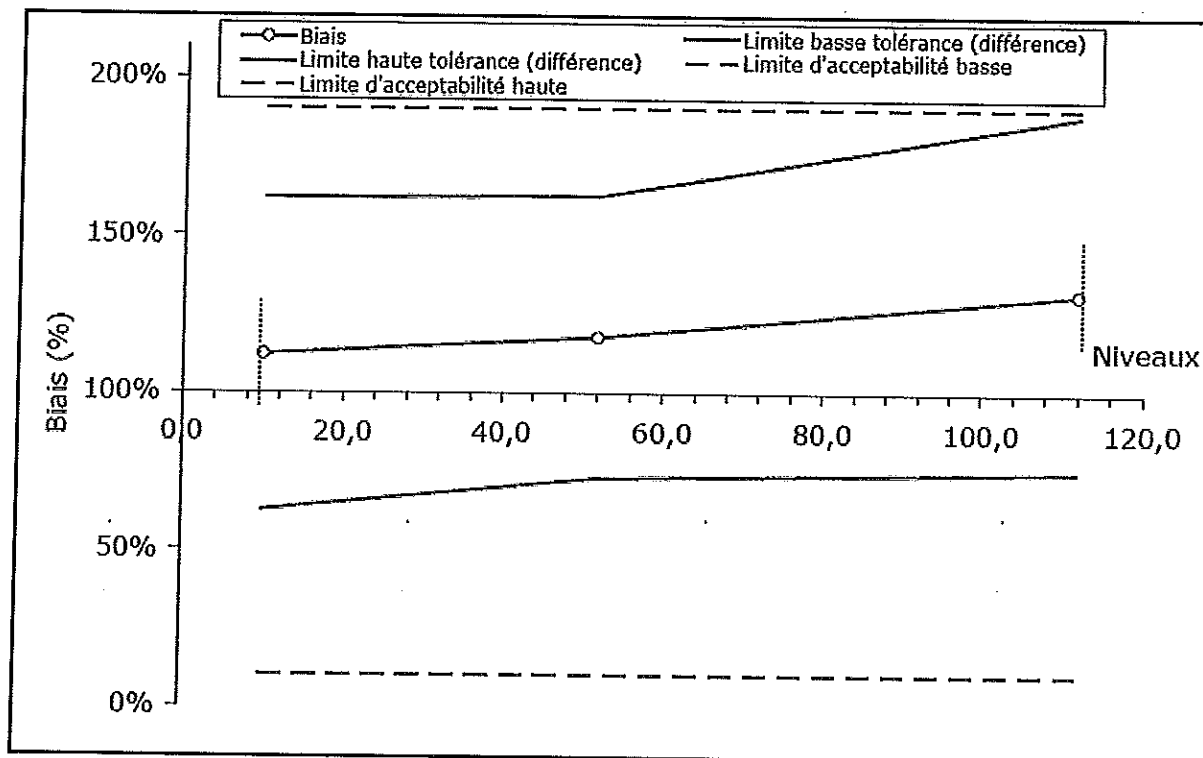
La méthode proposée par Mee [Mee, 1984] a été choisie pour ce protocole. Le calcul se fait à partir des données obtenues avec la méthode alternative pour chaque niveau de concentration. La valeur choisie pour  $\beta$  doit être au moins de 80%.

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	10,000	52,000	112,000
Limite de tolérance basse	6,268	37,968	84,015
Limite de tolérance haute	16,187	84,487	210,621
Limite de tolérance basse différentielle	63%	73%	75%
Limite de tolérance haute différentielle	162%	162%	188%

## 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. La **limite d'acceptabilité  $\lambda$**  dépend du contexte d'utilisation de la méthode et de la proportion  $\beta$  choisie. Les limites des intervalles d'acceptabilité, notées  $\pm\lambda$ , sont ici de 90 %.

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

### Conclusion

L'intervalle de tolérance est compris entre les limites d'acceptabilité pour  $\lambda = 90\%$ .  
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 inter-laboratoire  
sur le site [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)