

**CONFIDENTIEL**



*Validation de la méthode  
XplOrer64<sup>TM</sup>*

*Partie 2 : recherche et dénombrement  
des entérocoques intestinaux dans les eaux de  
baignade*

*Rapport de synthèse*



<b>Fabricant :</b>	<b>BIO-RAD</b> 3 bd Raymond Poincaré 92 430 Marnes-La-Coquette
<b>Laboratoire expert :</b>	<b>INSTITUT PASTEUR DE LILLE</b> CEREAT 1 rue du Professeur Calmette 59 019 Lille cedex
<b>Méthode à valider :</b>	Méthode <b>XplOrer64<sup>TM</sup></b> pour le dénombrement des <b>entérocoques intestinaux</b>
<b>Référentiel de validation :</b>	Protocole de Validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence (révision 0) adopté par AFNOR Certification le 28/07/2008
<b>Méthode de référence :</b>	<b>NF EN ISO 7899-1 : 1999</b> <sup>(2)</sup> Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduelles Partie 1 : méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour ensemencement en milieu liquide
<b>Domaine d'application :</b>	<b>Eaux de baignade</b> (eaux douces et eaux de mer)

<sup>(1)</sup> Les analyses selon NF EN ISO 7899-1 effectuées dans le cadre de cette étude ont été réalisées sous accréditation COFRAC.

## 1. INTRODUCTION

Ce rapport de synthèse rassemble les résultats de l'étude préliminaire de validation de la méthode XplOrer64<sup>TM</sup> pour le paramètre entérocoques intestinaux dans les eaux de baignade, présentés lors du bureau technique du 15 mai 2009, et les résultats de l'étude interlaboratoire, présentés le 6 novembre 2009.

Ce présent rapport ne traite que du paramètre entérocoques intestinaux. Le paramètre *E. coli*, étudié simultanément, est abordé dans un autre rapport.

## 2. PRESENTATION DES METHODES

### ✓ Méthode alternative XplOrer64™

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

#### Protocole :

- Filtration de 100 ml d'échantillon sur membrane de porosité nominale 0,45 µm.
- Rinçage de la membrane par filtration de 50 ml d'eau distillée stérile.
- Transfert de la membrane pliée dans une cellule de mesure contenant le bouillon spécifique CheckN'Safe™ *Enterococci*.
- Transfert de la cellule dans un compartiment réglé à 37°C de l'automate.
- Incubation pendant 13,5h (dont 1h de pré-chauffage).
- Lecture automatisée en continu, à intervalle de 10 minutes (après 1h de pré-chauffage).
- Résultat en germes / 100 ml rendu directement par l'automate par calculs automatisés.

Le protocole est illustré en **annexe 1**. La notice d'utilisation est en **annexe 2**.

A noter, il existe plusieurs configurations possibles de l'automate :

- configuration « échantillons naturels » pour l'analyse des échantillons naturels ;
- configuration « échantillons dopés / eau douce » pour les analyses d'échantillons d'eau douce dopés avec la souche de contrôle *Enterococcus faecalis* de collection CCM2541 : configuration permettant le contrôle qualité interne ;
- configuration « échantillons dopés / eau de mer » pour les analyses d'échantillons d'eau de mer dopés avec la souche de contrôle *E. faecalis* de collection CCM2541 : configuration permettant le contrôle qualité interne.

### ✓ Méthode de référence NF EN ISO 7899-1

#### Protocole :

- Ensemencement de l'échantillon dilué (2 dilutions pour les eaux de baignade) dans une série de puits d'une microplaque contenant le milieu de culture déshydraté spécifique MUD/SF.
- Incubation à 44°C pendant 36h à 72h.
- Observation sous UV et dénombrement des puits positifs (fluorescents).
- Rendu des résultats en nombre le plus probable (NPP) / 100 ml.

Ce protocole est illustré en **annexe 1**.

## 3. ETUDE PRELIMINAIRE

### 3.1. EVALUATION DE LA SPECIFICITE

La spécificité de la méthode alternative a été testée avec 30 souches d'entérocoques intestinaux (germes cibles) et 30 souches de germes interférents (dont 60% de souches de cocci).

Pour les germes cibles, ont été privilégiées les souches isolées de l'environnement dans des eaux de surface douces ou salées (25 souches sur 30). Les souches ont été isolées à partir d'échantillons naturels prélevés sur la même période à des endroits tous différents. Ces échantillons ont été choisis aléatoirement de manière à ce que le soucier constitué soit le plus représentatif possible des espèces les plus fréquemment rencontrées dans l'environnement. La liste des souches et leur origine figurent en **annexe 3** (germes cibles) **et 4** (interférents).

#### ✓ Protocole

- Culture des souches en bouillon non sélectif adapté à chaque germe.
- Analyse des suspensions diluées par méthode XplOrer64<sup>TM</sup>, et en parallèle par méthode par incorporation (selon NF EN ISO 6222 « Dénombrement des micro-organismes revivifiants » pour la majorité des germes, ou avec utilisation d'un autre milieu que la gélose à l'extrait de levure pour les germes nécessitant des conditions particulières de culture) pour vérification des concentrations.
- En cas d'obtention de résultat incohérent, réalisation d'un second essai, selon le même protocole que décrit ci-dessus, mais avec ajout d'une analyse par méthode de référence en parallèle.

#### ✓ Résultats

Les résultats bruts sont en **annexe 3** (germes cibles) **et 4** (interférents).

28 des 30 souches d'entérocoques intestinaux testées ont bien été détectées par la méthode XplOrer64<sup>TM</sup>. En revanche, 2 souches non pas été détectées :

- 1 souche d'*Enterococcus avium* (la seule testée), qui n'est cependant pas détectée non plus par la méthode de référence ;
- 1 souche d'*Enterococcus faecalis* (sur les 3 testées), qui est bien détectée par la méthode de référence. Il n'a pas pu être mis en évidence la particularité de cette souche l'empêchant d'être détectée par la méthode alternative. Il faut noter toutefois qu'en fin d'incubation des 2 analyses réalisées avec cette souche, le milieu CheckN'Safe<sup>TM</sup> Enterococci, a à chaque fois viré au noir, ce qui signifie que le germe cible s'est bien développé dans le bouillon spécifique.

29 des 30 souches interférentes testées ne sont pas détectées par la méthode alternative comme attendu. Seule l'échantillon dopé avec *Providencia stuartii* a donné un résultat faussement positif : résultat de 74 entérocoques par prise d'essai alors que la concentration en *P. stuartii* était de 6500 / prise d'essai (soit 2 log de plus). L'erreur est donc très faible, une seconde analyse avec le même ordre de concentration donnant cette fois un résultat négatif avec la méthode alternative, comme avec la méthode de référence.

#### ✓ Conclusion

La non détection d'*E. avium* n'est pas vraiment problématique puisque la souche testée n'est pas retrouvée également avec la méthode normalisée et que cette espèce n'est pas l'une des plus fréquemment rencontrées dans l'environnement.

La détection à tort de *P. stuartii* n'est pas vraiment non plus problématique, puisque le résultat faussement positif est très bas par rapport à la concentration réelle en *P. stuartii*, et que la souche n'a pas été détectée lors d'un second essai.

La non détection d'une souche d'*E. faecalis* est en revanche problématique. Mais les autres souches d'*E. faecalis* ont bien été trouvées, la souche en question semblant alors être une souche particulière. Au final il y a cohérence entre les 2 méthodes pour 29 des souches cibles testées sur 30 (97%).

### 3.2. EVALUATION DE LA LINEARITE ET DE L'EXACTITUDE RELATIVE

#### 3.2.1. Evaluation sur échantillons dopés

La linéarité a été évaluée dans un 1<sup>er</sup> temps sur des échantillons naturels d'eau douce et d'eau de mer dopés en *E. faecalis*.

##### ✓ Protocole

- Prélèvement de plusieurs litres d'eau naturelle (eau douce ou eau de mer) pour constitution d'un batch unique.
- Répartition du batch en 3 flacons.
- Dopage de chaque flacon avec un bouillon nutritif d'*E. faecalis* (souche CCM 2541) : un flacon dopé à un niveau d'environ 50 / 100 ml, un à environ 500 / 100 ml, et le dernier à environ 5000 / 100 ml.
- Analyses des flacons en duplicat par chaque méthode (Référence / Alternative). La méthode alternative a été utilisée en configuration « échantillons dopés / eau douce » pour les analyses d'échantillons d'eau douce dopés, et en configuration « échantillons dopés / eau de mer » pour les analyses d'échantillons d'eau de mer dopés.

Le schéma n°1 ci-dessous récapitule le protocole suivi.

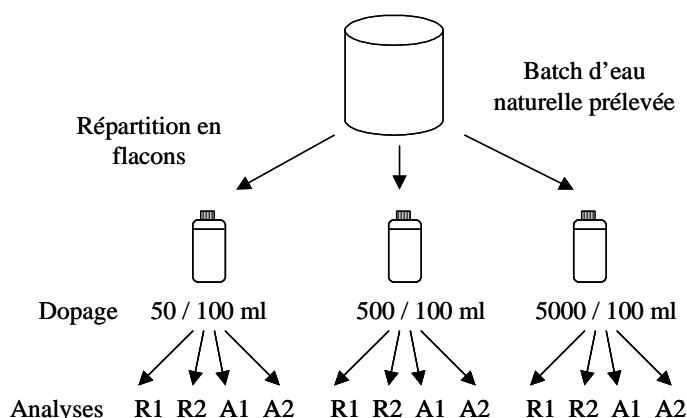
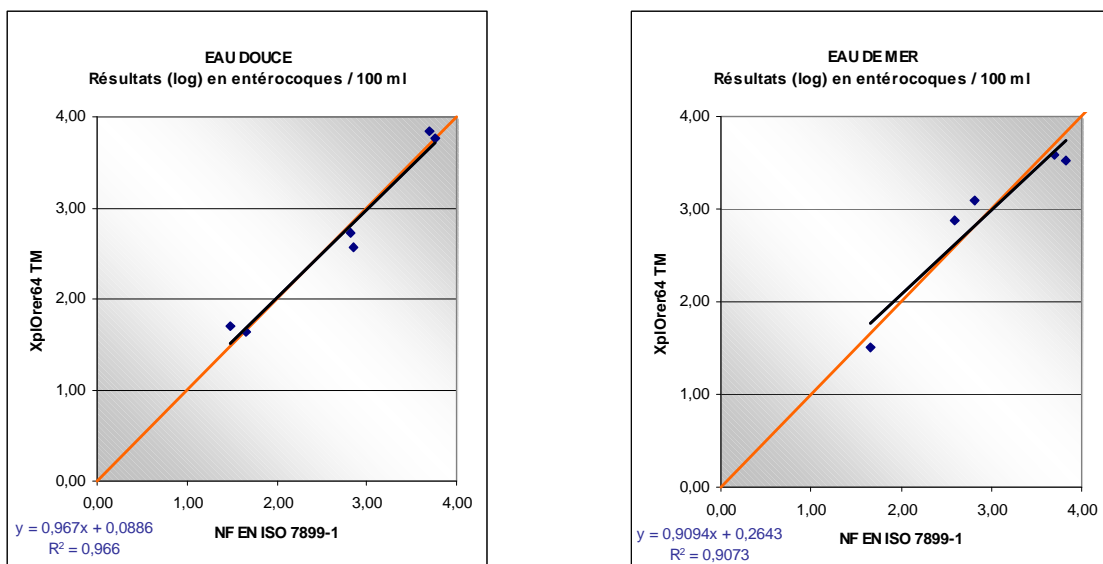


Schéma n°1: résumé du protocole de préparation et analyse des échantillons dopés pour étude de linéarité

##### ✓ Résultats

Les **graphiques n°1** et **n°2** ci-après permettent de visualiser les données obtenues (en bleu la relation linéaire observée entre les 2 méthodes, en rouge la droite d'équivalence des méthodes  $y = x$ ).



Graphiques n°1 et n°2 : résultats de l'étude de linéarité sur échantillons dopés

### ✓ Conclusion

D'un point de vue descriptif, ces résultats montrent :

- l'absence de points aberrants quelque soit la matrice et le niveau de concentration testé ;
- une pente proche de 1 dans les 2 cas ;
- une ordonnée à l'origine proche de 0 dans les 2 cas.

(A noter que les équations des droites de régression et coefficient de corrélation associés sont donnés à titre uniquement informatif vu le faible nombre de points).

Les résultats obtenus apparaissent donc satisfaisants.

### 3.2.2. Evaluation sur échantillons naturels

Une étude a été également réalisée sur des échantillons naturellement contaminés.

#### ✓ Protocole

- Prélèvement de 160 échantillons naturels d'eau douce ou d'eau de mer (lieu de prélèvement différent pour chacun des échantillons analysés) selon le guide technique FD T 90-521 : 2006 « Guide technique de prélèvement pour le suivi sanitaire des eaux de piscines et baignades en application du Code de la Santé Publique ».
- Analyses (sans duplicat) par chaque méthode (Référence / Alternative). La méthode alternative a été utilisée en configuration « échantillons naturels ».

#### ✓ Complément d'essai

Suite à cette évaluation, il s'est avéré que le nombre d'échantillons naturels prélevés fortement concentrés en entérocoques étaient restreint. Des échantillons d'eau de mer dopés à forte concentration en entérocoques intestinaux à l'aide d'eau de station d'épuration, ont donc été rajoutés pour compenser le faible nombre de données obtenues pour les fortes concentrations en germes cibles. Ils ont été préparés et analysés selon le protocole suivant :

- Prélèvement de 5 échantillons d'eau de mer en des lieux différents.

- Ajout dans chaque échantillon d'un volume négligeable d'eau de STEP afin d'obtenir une concentration en germes cibles comprise entre  $10^3$  et  $10^4$  / 100 ml.
- Analyses des 5 échantillons en duplicat par chaque méthode (référence / alternative). La méthode alternative a été utilisée en configuration « échantillons naturels ».

✓ Nombre d'échantillons final analysés

	Eau douce	Eau de mer	Total
Nombre d'échantillons analysés y compris dopés	51	119	170

Tableau n°1 : nombre d'échantillons naturels analysés

✓ Analyses physico-chimiques

Une mesure de la turbidité et de la teneur en matières en suspension a été réalisée sur certains échantillons naturels prélevés.

Le **tableau n°2** indique la répartition par niveaux des résultats obtenus.

	Nombre de résultats obtenus par niveaux			Total
	0-9 (NTU ou mg/l)	10-99 (NTU ou mg/l)	>100 (NTU ou mg/l)	
Turbidité	40	61	27 (max 520 NTU)	128
MEST	9	18	12 (max 520 mg/l)	39

Tableau n°2 : répartition par niveau des résultats de turbidité et MEST obtenus sur les échantillons naturels

A noter qu'aucun problème de colmatage n'a été observé. Toutes les prises d'essai de 100 ml pour la méthode XplOrer64<sup>TM</sup> ont pu être filtrées sans problème sur une seule membrane.

✓ Résultats

Sur les 170 couples de résultats obtenus (160 couples de résultats sur échantillons naturels + 10 couples de résultats sur échantillons naturels), 73 sont exploitables statistiquement (c'est à dire résultats sous forme de nombres entiers obtenus pour les 2 méthodes).

	Eau douce	Eau de mer	Total
Nombre d'échantillons analysés y compris dopés	51	119	170
Nombre de résultats exploitables	40	33	73

Tableau n°3 : nombre de résultats exploités pour l'évaluation de l'exactitude relative sur échantillons naturels

Concernant les 97 autres couples de résultats, 96 présentent un résultat négatif avec au moins l'une des méthodes :

- 53 sont négatifs avec les 2 méthodes

- 19 sont négatifs avec la méthode de référence (<15 / 100 ml) et positifs avec la méthode alternative (15 résultats sont compris entre 22 / 100 ml et 53 / 100 ml et 4 entre 10<sup>2</sup> et 10<sup>5</sup> / 100 ml). Les isolements d'éventuels germes cibles dans les échantillons fortement positifs avec la méthode alternative n'ont pas pu être réalisés. A noter que les 2 résultats aberrants de l'ordre de 10<sup>5</sup> / 100 ml obtenus avec la méthode alternative présentent un signalement informatique (courbe d'évolution de l'impédancemétrie) non caractéristique de la présence d'entérocoques intestinaux. Une visualisation manuelle des courbes (non prévue dans la notice d'utilisation) permet donc d'écarter ces résultats (les résultats obtenus manuellement pour ces 2 analyses seraient de <20 / 100 ml et 29 / 100 ml, donc satisfaisants).
- 24 sont positifs avec la méthode de référence (de 15 / 100 ml à 77 / 100 ml) et négatifs avec la méthode alternative (<15 / 100 ml).

Le dernier couple de résultats non exploitable correspond à un couple comprenant une valeur dépassant la limite haute de quantification avec la méthode de référence (>35000 / 100 ml).

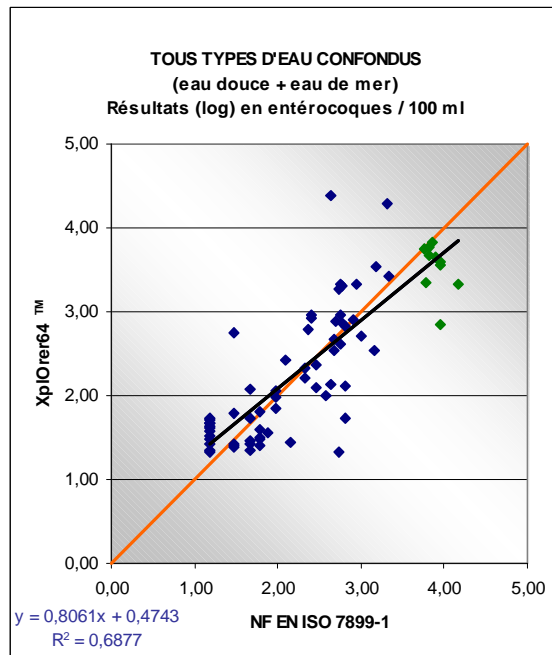
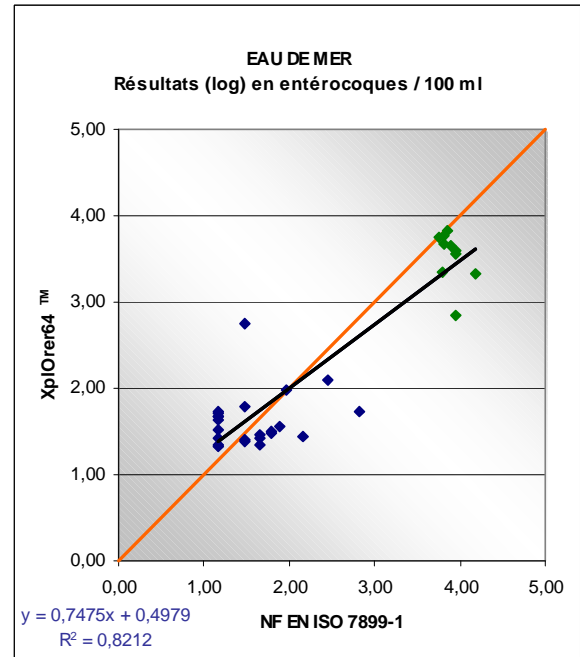
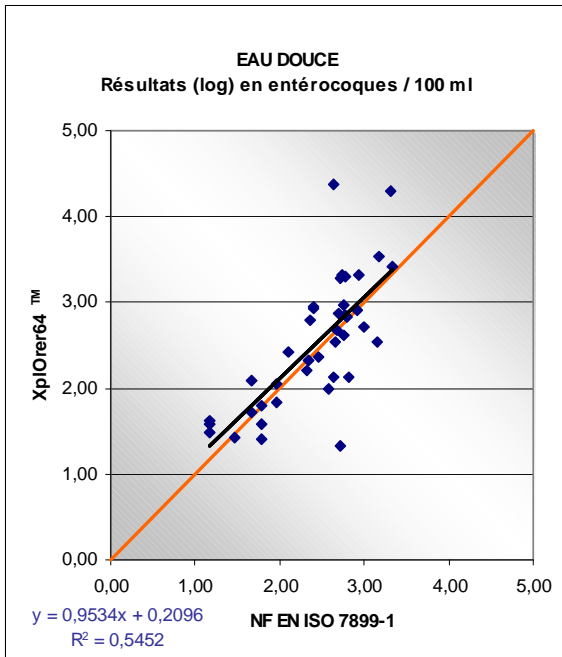
Quant aux résultats exploitables, leur répartition par niveaux de concentration est précisée dans le **tableau n°4**.

	Nombre de résultats exploitables obtenus par niveaux de concentrations avec la méthode de référence			
	<100 (/ 100 ml)	100 - 999 (/ 100 ml)	>1000 (/ 100 ml)	Total
<b>Eau douce</b>	11 (28%)	25 (63%)	4 (10%)	40 (100%)
<b>Eau de mer</b>	20 (61%)	3 (9%)	10 (30%)	33 (100%)
<b>Total</b>	31 (42%)	28 (38%)	14 (19%)	73 (100%)

Tableau n°4 : répartition par niveaux de concentration des résultats obtenus sur échantillons naturels

✓ Observation graphique des résultats

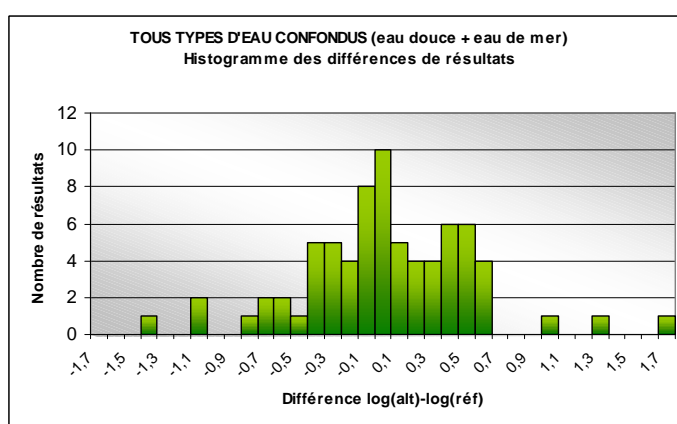
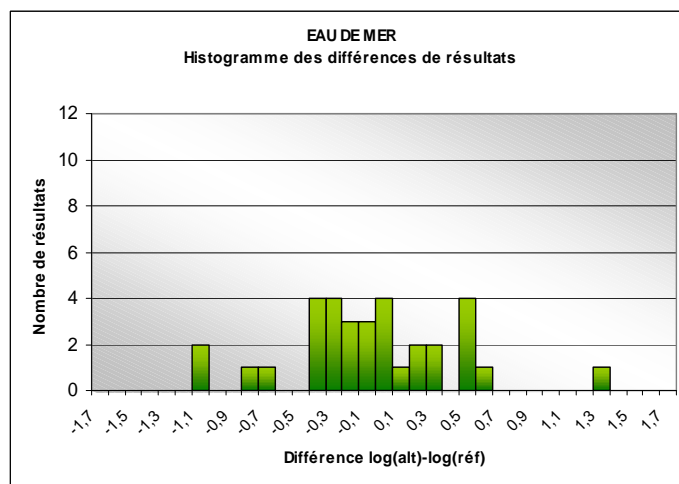
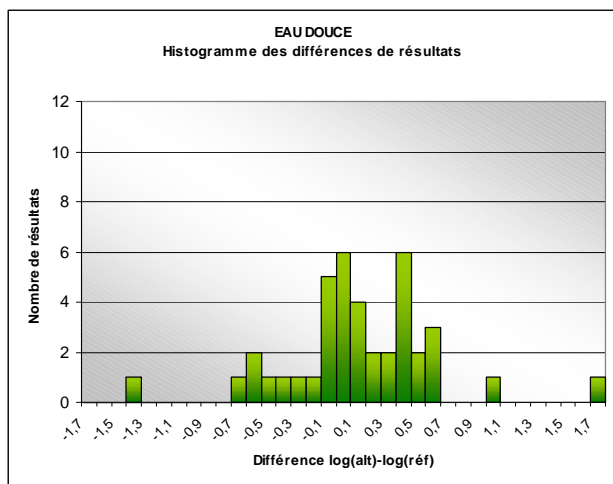
Les **graphiques n°3, 4, et 5** ci-après permettent de visualiser les données obtenues (en bleu les points obtenus sur échantillons naturels, en vert les points obtenus sur échantillons dopés avec eau de STEP, en noir la relation linéaire observée entre les 2 méthodes, en rouge la droite d'équivalence des méthodes  $y = x$ ).



Graphiques n°3, n°4 et n°5 : résultats de l'étude de linéarité sur échantillons naturels

✓ Observation graphique des différences de résultats

Les différences de résultats entre méthode alternative et méthode de référence observables sont représentées dans les histogrammes ci-après (**graphiques n°6, 7 et 8**).



Graphiques n°6, n°7 et n°8 : différences de résultats obtenus sur échantillons naturels par les 2 méthodes

Sur eau douce, 78% des différences se situent entre  $-0,5 \log$  et  $+0,5 \log$  (45% entre  $-0,2 \log$  et  $+0,2 \log$ ). Quelques valeurs sont élevées ( $> |0,5| \log$ ), mais il peut arriver occasionnellement en routine d'observer de telles différences, surtout sur des eaux chargées en particules.

Les mêmes constats sont applicables aux résultats sur eaux de mer. 82% des différences se situent entre  $-0,5 \log$  et  $+0,5 \log$  (39% entre  $-0,2 \log$  et  $+0,2 \log$ ).

✓ Exploitation statistique

*Comparaison des couples de résultats*

Une comparaison des 73 couples de résultats positifs peut être réalisée avec le test de Wilcoxon (test non paramétrique pour comparaison de données appariées).

L'exploitation est réalisée par niveau de concentration. Les résultats obtenus avec la méthode de référence servent à déterminer les différents niveaux étudiés : [15 à 99 / 100 ml] et [ $>99$  / 100 ml].

Les résultats de l'exploitation sont présentés dans le **tableau n°5** ci-après.

	Niveaux de concentration en germes		
	15-99 (/ 100 ml)	> 99 (/ 100 ml)	Toutes données
Eau douce	n = 11 p > 0,05 <b>H<sub>0</sub> acceptée</b>	n = 29 p = 0,215 <b>H<sub>0</sub> acceptée</b>	n = 40 p = 0,096 <b>H<sub>0</sub> acceptée</b>
Eau de mer	n = 20 p > 0,05 <b>H<sub>0</sub> acceptée</b>	n = 13 p < 0,01 <b>H<sub>0</sub> refusée</b>	n = 33 p = 0,182 <b>H<sub>0</sub> acceptée</b>
Eau douce + eau de mer	n = 31 p = 0,032 <b>H<sub>0</sub> refusée</b>	n = 42 p = 0,163 <b>H<sub>0</sub> acceptée</b>	n = 73 p = 0,365 <b>H<sub>0</sub> acceptée</b>

avec H<sub>0</sub> = hypothèse d'équivalence des paires de résultats ( $\alpha = 0,05$ )

Tableau n°5 : résultats du test de Wilcoxon

L'exploitation des résultats avec le test de Wilcoxon permet de dire :

- Sur eau douce, les résultats obtenus par les 2 méthodes sont équivalents ( $\alpha = 0,05$ ) sur tous les niveaux de concentration.
- Sur eau de mer, les résultats sont équivalents ( $\alpha = 0,05$ ) pour les bas niveaux. Pour les hauts niveaux, les résultats obtenus avec la méthode alternative sont inférieurs à ceux obtenus avec le méthode de référence (pour  $\alpha = 0,05$  et  $\alpha = 0,01$ ). Cette information est cependant à prendre avec précaution, les résultats restant tout de même du même ordre de grandeur. Toutes données confondues, les résultats sont équivalents.
- En considérant la totalité des données, les résultats sont équivalents ( $\alpha = 0,05$ ). Sur les bas niveaux, est observée toutefois une possible sur-estimation de la méthode alternative (pour  $\alpha = 0,05$  mais pas pour  $\alpha = 0,01$ ).

### Comparaison des dispersions

A l'aide des données issues de l'analyse en duplicat des 5 échantillons dopés avec de l'eau de STEP, une comparaison des répétabilités des 2 méthodes peut être réalisée en comparant le rapport des deux variances de répétabilité aux valeurs critiques bilatérales d'une variable de Fisher. Les résultats sont présentés dans le **tableau n°6**.

Echantillon	Ecart-type de dispersion des valeurs observées par la méthode de référence ( $s_{réf}$ )	Ecart-type de dispersion des valeurs observées par la méthode alternative ( $s_{alt}$ )	Rapport salt / $s_{réf}$	Niveau de signification
1	0,16	0,34	2,1	o
2	0,07	0,19	2,6	o
3	0,12	0,17	1,4	o
4	0,04	0,01	0,3	o
5	0,05	0,01	0,3	o

Légende pour la colonne "Niveau de signification" :

"o" =  $s_{alt}$  n'est pas significativement différent de  $s_{réf}$  au risque  $\alpha$  de 5%

"<" =  $s_{alt}$  est significativement inférieur à  $s_{réf}$  au risque  $\alpha$  de 5%

">" =  $s_{alt}$  est significativement supérieur à  $s_{réf}$  au risque  $\alpha$  de 5%

Tableau n°6 : résultats du test de Fisher

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

### 3.3. EVALUATION DE LA LIMITE DE DETECTION

Le protocole de validation demande d'évaluer la limite de détection à partir de la surdispersion  $u^2$  elle même calculée par exploitation des mesures répétées de 10 séries d'analyses d'échantillons identiques dopés en germes cibles (cf. FD ENV ISO 13843 : 2001 « Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques »).

Cependant, l'exploitation selon FD ENV ISO 13843 n'est pas applicable à la méthode XplOrer64<sup>TM</sup> (mais applicable seulement aux méthodes de dénombrement de colonies sur gélose).

Quant à la limite de quantification, elle sera évaluée lors de l'étude inter-laboratoires.

### 3.4. EVALUATION DE LA PRATICABILITE

✓ Mode de conditionnement des éléments de la méthode

Les cellules de bouillon sélectif CheckN'Safe<sup>TM</sup> Enterococci sont conditionnées en carton de 120 unités prêtes à l'emploi.

✓ Volume des réactifs

Chaque cellule contient 10 ml de bouillon sélectif CheckN'Safe<sup>TM</sup> Enterococci.

✓ Conditions de stockage des éléments

Les cellules doivent être conservées entre 2°C et 8°C. La date de péremption figure sur chaque cellule ainsi que sur le carton d'emballage des 120 unités.

✓ Modalités d'utilisation après 1<sup>ère</sup> utilisation

Chaque cellule sert à une analyse unique et doit donc être éliminée après analyse.

✓ Equipements ou locaux spécifiques nécessaires

L'équipement pour filtration sur membrane est nécessaire.

✓ Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer

Il n'y a pas de réactif à rajouter dans les cellules.

✓ Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode

Pour un opérateur déjà formé à la technique de filtration sur membrane, la formation à la méthode XplOrer64<sup>TM</sup> nécessite moins d'une journée (formation à l'utilisation des différentes fonctions de l'automate : lecture des résultats, recherche des résultats anciens, etc.).

✓ Temps réel de manipulation et flexibilité de la méthode

- La durée d'un ensemencement par méthode XplOrer64<sup>TM</sup> est d'environ 2 min (temps comprenant le flamage du poste de filtration, la filtration, le rinçage de la membrane, l'incorporation de la membrane dans la cellule, la fermeture de la cellule).

- La durée d'un ensemencement par méthode NF EN ISO 7899-1 est d'environ 3 minutes (temps comprenant la préparation des dilutions, l'ensemencement des puits, la pose du film plastique).

- Le temps de lecture par méthode XplOrer64<sup>TM</sup> est négligeable puisque les résultats sont consultables sur l'écran du PC relié à l'automate.

- Le temps de lecture par méthode NF EN ISO 7899-1 est variable selon les résultats : durée négligeable en cas de résultat négatif, durée de plus d'1 minute en cas de nombreux puits positifs à compter.

- La durée d'ensemencement d'1 échantillon par méthode XplOrer64™ ne varie pas selon le nombre d'échantillons. Le gain de temps se fait au niveau des lectures : 1 automate peut accueillir 31 cellules, et donc donner sur l'écran 31 résultats simultanément.

✓ Délai d'obtention des résultats

Le cycle d'incubation avec mesures toutes les 10 min dure 12,5 heures après 1h de pré-chauffage. Les résultats supérieurs à 1000 ufc / 100 ml sont donnés en environ moins de 9h après début du cycle de mesures.

✓ Type de qualification de l'opérateur

Un même niveau que celui requis pour la méthode de référence est nécessaire.

✓ Etapes communes avec la méthode de référence

Aucune.

✓ Moyens de traçabilité des résultats d'analyse pour l'utilisateur

Les noms des différents opérateurs peuvent être enregistrés dans l'appareil et sélectionnés selon la personne réalisant l'analyse. Les informations relatives à l'échantillon (n° d'échantillon, origine, etc.) peuvent être enregistrées dans l'appareil. Ce dernier enregistre de lui même toutes les données utiles (date et heure d'analyse, résultats) qui peuvent être consultées à n'importe quel moment ultérieurement.

✓ Obligations de maintenance d'un appareillage spécifique pour l'utilisateur

Non précisé.

## 4. ETUDE INTERLABORATOIRE

### 4.1. ORGANISATION DE L'ETUDE INTERLABORATOIRE

#### 4.1.1. Planning

Douze laboratoires sollicités par Bio-Rad ont participé à l'étude. Les laboratoires ont reçu par mail un formulaire de consignes et de résultats de la part du laboratoire expert une dizaine de jours avant envoi des échantillons (en version anglaise pour les laboratoires étrangers).

L'ensemble des laboratoires, participants et expert, ont utilisé des consommables de même lot transmis par Bio-Rad avant essai.

Les échantillons ont été préparés par le laboratoire expert le lundi 5 octobre 2009. Quinze colis contenant des échantillons identiques et des réfrigérants ont été préparés le jour même. Un colis a été envoyé à chacun des 12 participants, les 3 derniers colis étant gardés par le laboratoire expert pour analyses de contrôle de lot. Les participants ont reçu leur colis le 6 ou 7 octobre. Tous les laboratoires devaient lancer les analyses impérativement la journée du 7 octobre. Seul le laboratoire n°12, ayant reçu son colis assez tard le 7 octobre, a réalisé les analyses le 8 octobre.

#### 4.1.2. Préparation des échantillons

La matrice utilisée était de l'eau de mer prélevée à Gravelines (59).

A partir de cette matrice, 4 batchs, nommés I, II, III et IV, ont été créés successivement :

- **Batch I non dopé** constitué de 150 litres d'eau de mer placée dans une cuve en polyéthylène équipée d'un bras agitateur mécanique (100 t/min). Après 10 minutes d'agitation, ont été soutirés, sans interruption et sous agitation, 15 flacons notés **X** et 15 flacons notés **Y**.
- **Batch II** constitué du restant du batch I dopé à **environ 10<sup>2</sup> entérocoques / 100 ml**. Après 10 minutes d'agitation, ont été soutirés, sans interruption et sous agitation, 15 flacons notés **A** et 15 flacons notés **B**, préalablement mélangés entre eux et pris aléatoirement.
- **Batch III** constitué du restant du batch II dopé à **environ 10<sup>3</sup> entérocoques / 100 ml**. Après 10 minutes d'agitation, ont été soutirés, sans interruption et sous agitation, 15 flacons notés **C** et 15 flacons notés **D**, préalablement mélangés entre eux et pris aléatoirement.
- **Batch IV** constitué du restant du batch I.I dopé à **environ 10<sup>4</sup> entérocoques / 100 ml**. Après 10 minutes d'agitation, ont été soutirés, sans interruption et sous agitation, 15 flacons notés **E** et 15 flacons notés **F**, préalablement mélangés entre eux et pris aléatoirement.

La souche d'entérocoque utilisée pour les dopages est une souche d'*Enterococcus faecium* isolée de l'environnement (plage centrale de Dunkerque (59)). Les dopages ont été réalisés avec une suspension diluée de germes cultivés en bouillon non sélectif pendant 24h.

Après soutirage, les échantillons sont restés à température ambiante pendant 1h puis mis en colis, les flacons étant répartis de manière aléatoire dans les colis. Un thermo-bouton a été placé dans chaque flacon noté X avant mise en colis. Quinze colis ont ainsi été constitués, contenant chacun des réfrigérants et 8 échantillons :

- échantillons A, B, C, D, E et F pour dénombrement des *E. coli* et entérocoques intestinaux en duplicats par chaque méthode,
  - échantillon X pour mesure de la température,
- échantillon Y pour dénombrement des germes revivifiables à 22°C et 36°C.

## 4.2. RESULTATS

### 4.2.1. Etat et température des échantillons à réception

Dix laboratoires ont réceptionné leur colis le 6 octobre et deux le 7 octobre. Tous les colis sont arrivés en bon état et tous les participants ont mesuré une température dans le flacon X à réception comprise entre 1°C et 7°C. Tous les thermo-boutons ont bien été renvoyés et les relevés de températures enregistrées confirment que les échantillons sont restés à température réfrigérée pendant le transport .

### 4.2.2. Dénombrement des germes revivifiables

La concentration moyenne observée en germes revivifiables à 22°C dans les échantillons sur

Marine Agar est d'environ 4800 / ml, celle en germes revivifiables à 36°C d'environ 2900 / ml.

#### 4.2.3. Analyses de contrôle de lot

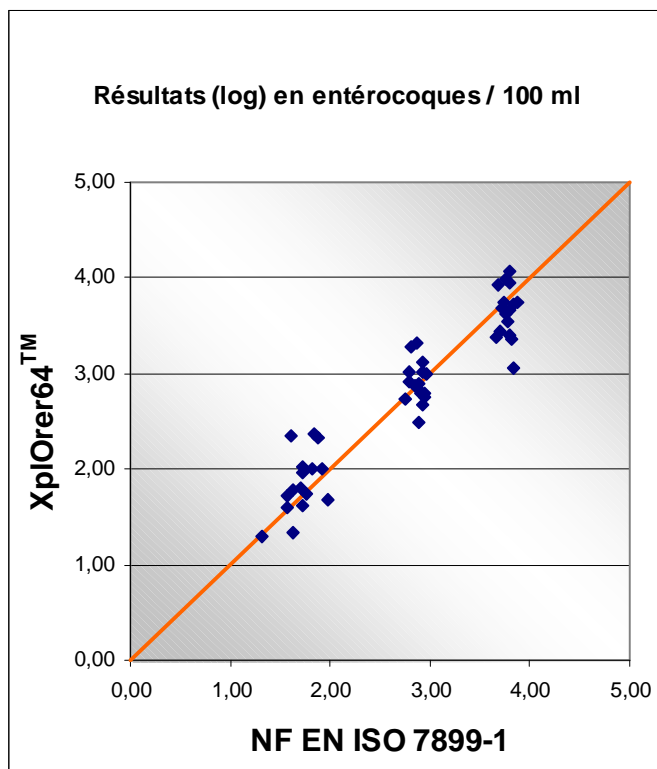
Le laboratoire expert a conservé 3 colis de composition identique à ceux envoyés aux participants pour vérification de l'homogénéité des lots d'échantillons préparés par analyses selon NF EN ISO 7899-1 en duplicat des échantillons A, B, C, D, E et F contenus dans chaque colis.. L'exploitation des résultats ne révèle pas d'anomalie, les échantillons préparés étaient de qualité suffisante pour être utilisés dans le cadre de cette étude interlaboratoire.

#### 4.2.4. Résultats des participants

Les résultats finaux obtenus par les participants par la méthode XplOrer64 ont été recalculés par le laboratoire expert à l'aide d'une nouvelle équation de calibration optimisée, transmise par le fabricant, en utilisant les temps de détection (DT) observés par les participants (ces DT étaient à renseigner par les participant dans le formulaire de résultats).

Les résultats des participants n°9, 10, 11 et 12 n'ont pas été exploités. En effet le participant n°9 a rencontré un problème de logiciel lors de l'analyse par méthode alternative, le participant n°10 rend des résultats aberrants par méthode alternative et les laboratoires n°11 et 12 des résultats anormaux par méthode normalisée. Les résultats des 8 autres laboratoires ont bien pu être exploités en revanche.

Le **graphique n°10** ci-après permet de visualiser les données obtenues (moyennes des répliquats par flacon).



Graphique n°10 : résultats en entérocoques obtenus par les participants (moyenne des répliquats par échantillon)

Le **tableau n°7** ci-dessous mentionne les critères de fidélité et justesse de la méthode alternative calculés par niveau.

Niveaux	Bas	Moyen	Haut
<b>Concentration cible théorique moyenne</b>	<b>1,72</b>	<b>2,89</b>	<b>3,79</b>
<b>Concentration retrouvée moyenne</b>	<b>1,86</b>	<b>2,91</b>	<b>3,63</b>
Ecart-type de répétabilité	0,15	0,27	0,14
Ecart-type inter-séries	0,32	0,10	0,25
<b>Ecart-type de fidélité</b>	<b>0,35</b>	<b>0,29</b>	<b>0,28</b>
Biais relatif	8,04%	0,54%	-4,21%
<b>Biais</b>	<b>0,14</b>	<b>0,02</b>	<b>-0,16</b>

Tableau n°7 : critères de fidélité et justesse (en LOG) de la méthode XplOrer64<sup>TM</sup>

On note que les moyennes obtenues par méthode de référence et alternative sont très proches pour les 3 niveaux.

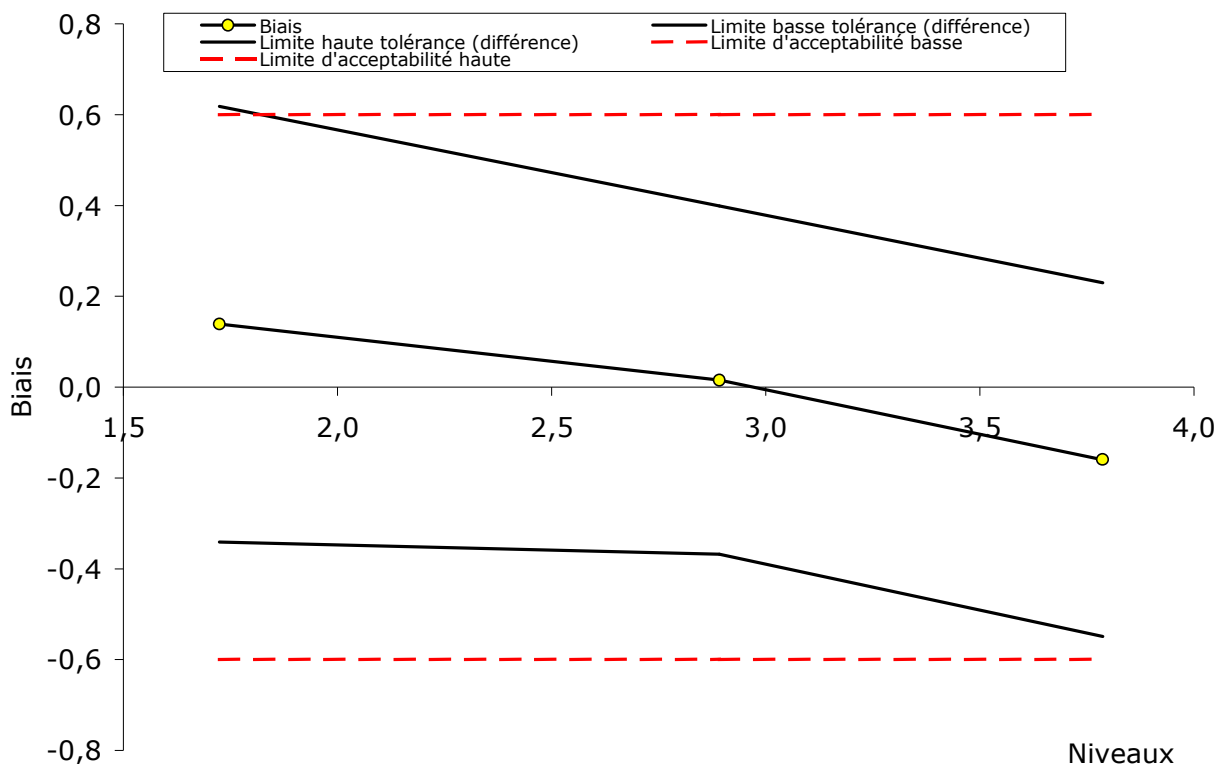
Le **tableau n°8** ci-après récapitule les limites de tolérance basses et hautes par niveaux calculées avec des valeurs de probabilité de tolérance  $\beta$  de **80% et 90%**.

	Niveaux	Bas	Moyen	Haut
	Concentration cible théorique moyenne (x)	1,72	2,89	3,79
<b><math>\beta = 80\%</math></b>	Limite de tolérance basse (b)	1,38	2,52	3,24
	Limite de tolérance haute (h)	2,34	3,29	4,02
	<b>Limite de tolérance basse différentielle (b-x)</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,37</b>	<b>-0,55</b>
	<b>Limite de tolérance haute différentielle (h-x)</b>	<b>0,62</b>	<b>0,40</b>	<b>0,23</b>
<b><math>\beta = 90\%</math></b>	Limite de tolérance basse (b)	1,24	2,41	3,12
	Limite de tolérance haute (h)	2,49	3,40	4,13
	<b>Limite de tolérance basse différentielle (b-x)</b>	<b>-0,49</b>	<b>-0,48</b>	<b>-0,67</b>
	<b>Limite de tolérance haute différentielle (h-x)</b>	<b>0,76</b>	<b>0,51</b>	<b>0,35</b>

Tableau n°8 : limites des intervalles de tolérance par niveau (en LOG) de la méthode XplOrer64<sup>TM</sup>

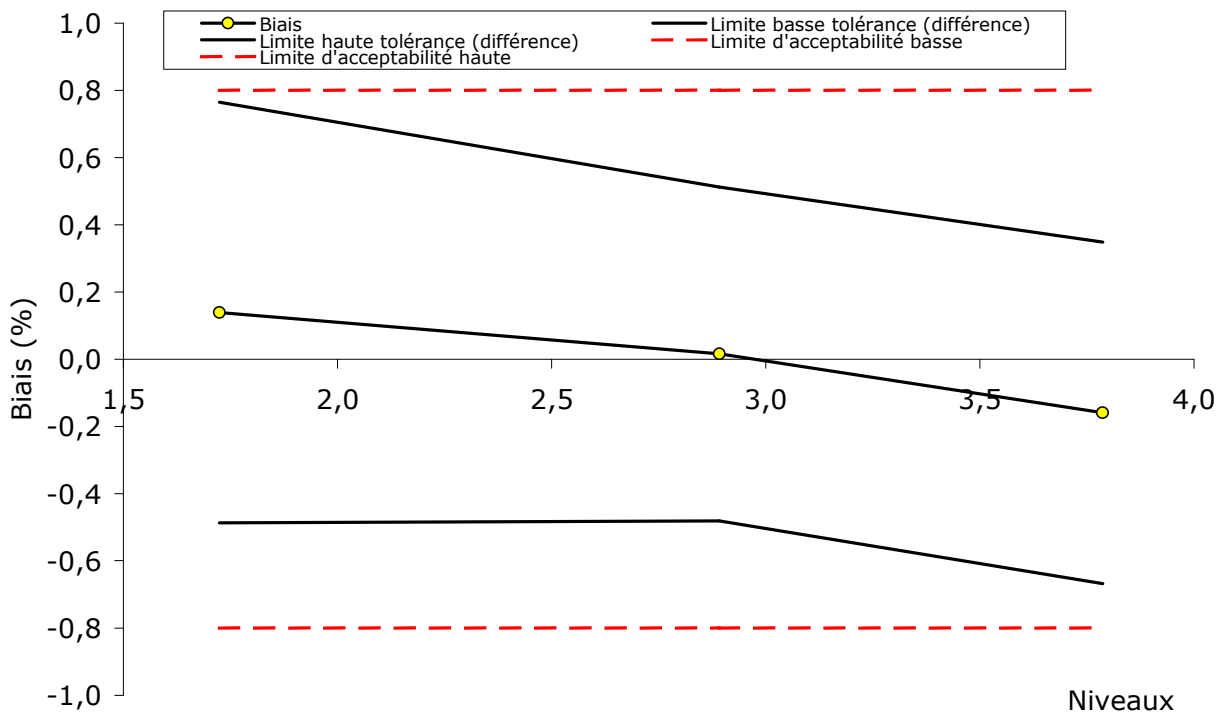
Les bornes de l'intervalle de tolérance les plus élevées en valeur absolue sont la limite haute à bas niveau (0,62 pour  $\beta$  fixé à 80% ; 0,76 pour  $\beta$  à 90%) et la limite basse à haut niveau (-0,55 pour  $\beta$  fixé à 80% ; -0,67 pour  $\beta$  fixé à 90%).

Les **graphiques n°11** (avec  $\beta$  à 80%) et **n°12** (avec  $\beta$  à 90%) ci-après représentent les **profils d'exactitude** obtenus (avec en pointillés rouges, la valeur de critère d'acceptabilité  $\lambda$  la plus proche pour encadrer les limites de tolérance différentielles extrêmes).



Graphique n°11 : profil d'exactitude de la méthode XplOrer64<sup>TM</sup> ( $\beta$  fixé à 80%,  $\lambda$  à 0,6 ici en pointillés rouges)

Graphique n°12 : profil d'exactitude de la méthode XplOrer64<sup>TM</sup> ( $\beta$  fixé à 90%,  $\lambda$  à 0,8 ici en pointillés rouges)



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). Toujours avec  $\beta$  à 80% mais en considérant  $\lambda$  à 0,7, elle passe à 1,29 (soit 19 germes / 100 ml).


Celle calculée avec  $\beta$  à 90% et  $\lambda$  à 0,8 est de 1,54 (soit 34 germes / 100 ml)

### 4.3. CONCLUSION

Les résultats de 8 laboratoires participants ont pu être exploités dans le cadre de cette étude interlaboratoire.

**L'étude du profil d'exactitude obtenu révèle que la méthode alternative XplOrer64<sup>TM</sup> est valide pour tous les niveaux** (intervalle de tolérance compris entre les limites d'acceptabilité) **pour une valeur de critère d'acceptabilité  $\lambda$  fixée à 0,6** (avec une valeur de probabilité de tolérance  $\beta$  fixée à 80%, valeur la plus généralement utilisée). Pour des valeurs de  $\lambda$  moins élevées, la limite haute de l'intervalle de tolérance à bas niveau et la limite basse à haut niveau sont les premières bornes à sortir des limites d'acceptabilité (dès  $\lambda$  fixée à 0,5).

Lille, le 23 novembre 2009



J.-S. Pharamond  
Chargé d'études en microbiologie

## ANNEXE 1

### DESCRIPTION DES METHODES

#### Méthode alternative XplOrer64™



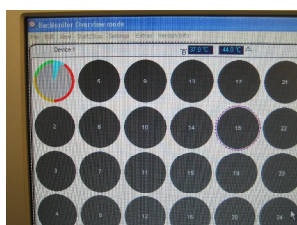
Filtration de 100 ml d'échantillon sur membrane 0,45 µm, puis rinçage avec 50 ml d'eau distillée stérile



Pliage de la membrane



Transfert de la membrane dans la cellule de mesure contenant le milieu liquide CheckN'Safe™ Enterococci



Lecture des résultats en germes / 100 ml sur l'écran du PC relié à l'automate

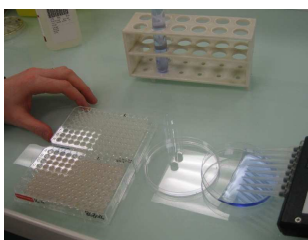


Transfert de la cellule dans l'automate, incubation à 37°C. Lecture automatisée des cellules en continu, à intervalle de 10 min

#### Méthode de référence NF EN ISO 7899-1



Préparation des dilutions de l'échantillon (1/2 et 1/20 pour les eaux de baignade)



Transfert de l'échantillon dilué dans une boîte de Pétri pour prise d'essai par pipette multicanaux



Répartition de 200 µl dans chaque puits de la microplaque contenant le milieu MUD/SF (64 puitsensemencés avec l'échantillon dilué au 1/2 et 32 avec l'échantillon dilué au 1/20)



Pose d'une bande adhésive stérile et incubation à (44 ± 0,5)°C pendant 36h à 72h.

Dénombrement des puits positifs (fluorescents) sous UV et rendu des résultats en NPP / 100 ml

## **ANNEXE 2**

### **NOTICE D'UTILISATION DE LA METHODE XPLOERER64**

# CheckN'Safe™ *Enterococci*

Code 54701

Notice - Version 2.2

Test automatisé pour la détection et la quantification des  
*Enterococci* intestinaux, en temps réel et en continu  
dans les Eaux de Baignades naturelles

120 tests

## TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION
  2. PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE CHECKN'SAFE™
  3. CERTIFICATION AFNOR VALIDATION
  4. REFERENCES NORMATIVES
  5. PRESENTATION
  6. CONSERVATION ET VALIDITE
  7. EQUIPEMENTS ET MATERIELS NECESSAIRES (NON FOURNIS)
    - A. EQUIPEMENT NECESSAIRE
    - B. AUTRE PRODUIT NECESSAIRE
  8. PRECAUTIONS
  9. ECHANTILLONNAGE
  10. PROTOCOLE
    - A. OPERATIONS PRELIMINAIRES
    - B. PARAMETRAGES
    - C. PREPARATION DE L'ECHANTILLON
    - D. ANALYSE DES RESULTATS
    - E. CONFIRMATION DES RESULTATS
  11. CONTROLES QUALITE DU FABRICANT
- ANNEXE A : SCHEMA DU PLIAGE DE LA MEMBRANE
- ANNEXE B : CONFIRMATION GRAPHIQUE DES ECHANTILLONS POSITIFS

## 1. INTRODUCTION

---

Les méthodes microbiologiques conventionnelles permettant la quantification des Entérocoques intestinaux dans les échantillons d'eau de baignades demandent 2 à 3 jours suivant le référentiel suivi. Dans les méthodes par filtration sur membrane, 24 heures supplémentaires sont nécessaires pour réaliser des tests de confirmation, qui sont particulièrement fastidieux.

Réduit à une simple étape de filtration, le **test CheckN'Safe™ Enterococci** est une méthode simple à mettre en œuvre, pour un résultat quantitatif en temps réel, spécifique des *Enterococci* rencontrés dans l'eau de mer et l'eau douce de surface (tels que *E. fecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae*...). Ce test fonctionne avec le Système XplOrer64™ (Bio-Rad), basé sur une technologie d'impédancemétrie en mesure continue, qui permet d'analyser simultanément jusqu'à 64 échantillons en chargement continu.

Plus la concentration bactérienne dans l'échantillon d'eau analysé est importante, plus le signal positif de détection est précoce et détermine la concentration des *Enterococci* de l'échantillon, constituant un réel outil de gestion active du contrôle sanitaire des eaux.

Le Système XplOrer64™ combiné aux réactifs CheckN'Safe™ constituent une approche proactive pour : l'information du public sur la qualité de l'eau, la prévention de la santé du public, et la protection des eaux littorales et des eaux douces des événements de pollution.

## 2. PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE CHECKN'SAFE™

---

Le test CheckN'Safe *Enterococci* est basé sur une croissance bactérienne en milieu de culture, dans lequel s'effectue une mesure d'impédance. Chaque cellule de mesure contient un milieu de culture sélectif en bouillon, qui permet la croissance spécifique des souches environnementales des Entérocoques intestinaux. Il comporte 2 électrodes mesurant la variation du signal d'impédance pendant leur croissance. La détection et l'analyse des données sont optimisées pour une utilisation avec le Système XplOrer64™ (Bio-Rad).

Ce test permet la détection **en moins de 10 hrs de 100 Enterococci / 100 ml d'eau de baignades** (eau douce ou eau de mer).

## 3. CERTIFICATION AFNOR VALIDATION

---

La méthode **CheckN'Safe Enterococci** (dénombrement des *Enterococci* intestinaux à 37°C) est **en cours de certification AFNOR Validation**, en qualité de méthode alternative à la méthode de référence NF EN ISO 7899-1, pour la détection et la quantification des *Enterococci* en méthode miniaturisée (Nombre le Plus Probable), dans les eaux de baignades (eau de mer littorale, eau douce de surface), selon le Protocole AFNOR pour la « Validation d'une méthode commerciale versus une méthode de référence dans le domaine de la microbiologie de l'eau ».

## 4. REFERENCES NORMATIVES

---

- **NF EN ISO 7899-1 (Nov. 1998)** : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des Entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et les eaux résiduaires. Partie 1 : Méthode miniaturisée (Nombre le Plus Probable) par inoculation en milieu liquide.
- **Conseil des Communautés Européennes** : Qualité des eaux de baignades. Nouvelle Directive 2006/7/CE publiée au Journal Officiel des CE le 4 Mars 2006 (Révision de la Directive 76/160/CE du 8 Déc. 1975).
- **NF T90-461/A2 (Mai 2007)**: Qualité de l'eau - Microbiologie - Contrôle qualité des milieux de culture.

## 5. PRESENTATION

---

Chaque kit contient 120 tests prêts à l'emploi, contenant 9 ml de bouillon de culture sélectif pour *Enterococci*.

---

## 6. CONSERVATION ET VALIDITE

---

Dès réception, **le kit doit être conservé à +2-8°C**. La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement et sur chacun des tests.

Il est recommandé de **placer les réactifs nécessaires aux analyses à température ambiante, 1 heure avant usage**.

---

## 7. EQUIPEMENTS ET MATERIELS NECESSAIRES (NON FOURNIS)

---

### A. EQUIPEMENT NECESSAIRE

- Equipement pour la filtration sur membrane, en accord avec les exigences de la norme ISO 8199 :
  - Appareil de filtration (monté soit sur une pompe à vide, soit sur une fiole à vide) dans un environnement stérile, par exemple à proximité d'un bec Bunsen allumé.
  - Entonnoirs stériles à usage unique de 250 ml.
  - Membranes filtrantes en esters de cellulose, de 47 mm or 50 mm de diamètre, présentant des caractéristiques de filtration équivalentes à une porosité nominale 0,45 µm. (Les membranes doivent être exemptes de propriétés susceptibles d'inhiber ou au contraire de favoriser la croissance bactérienne. Il convient de tester chaque lot de membranes conformément à la norme ISO 7704 quant à son aptitude au test).
  - Deux pinces métalliques en inox à bouts ronds, stériles, pour manipuler les membranes.
- Portoirs CheckN'Safe™ (Bio-Rad, **code 93455**, 4 unités sont fournies avec le Système XplOrer64).
- Bouchons pour tests CheckN'Safe™, 40 unités stériles x 1 sachet (Bio-Rad, **code 93457**).

### B. AUTRE PRODUIT NECESSAIRE

- Eau distillée stérile ou déionisée : **50 à 100 ml par échantillon** à analyser.

---

## 8. PRECAUTIONS

---

- Ce test doit être réalisé par des personnes ayant reçu une formation adéquate.
- Les échantillons d'eau analysés doivent être manipulés et éliminés comme des matières potentiellement infectieuses.
- Tout matériel potentiellement infectieux doit être autoclavé avant d'être éliminé.
- La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des Bonnes Pratiques de Laboratoires.

---

## 9. ECHANTILLONNAGE

---

Les échantillons d'eau doivent être prélevés et livrés au laboratoire conformément aux normes générales pour la qualité de l'eau, pour la détection et la quantification bactérienne par méthode culturale (voir les normes ISO 8199 et ISO 5667-1, ISO 5667-2 et ISO 5667-3).

Les échantillons doivent être livrés au laboratoire le plus rapidement possible et leur analyse doit débiter le plus rapidement possible. Si les échantillons sont conservés à température ambiante (à l'obscurité, sans dépasser 25°C), alors les analyses peuvent être effectuées dans les 6 heures qui suivent la prise d'échantillon.

En circonstances exceptionnelles, les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C pendant 24 hrs avant d'effectuer l'analyse.

---

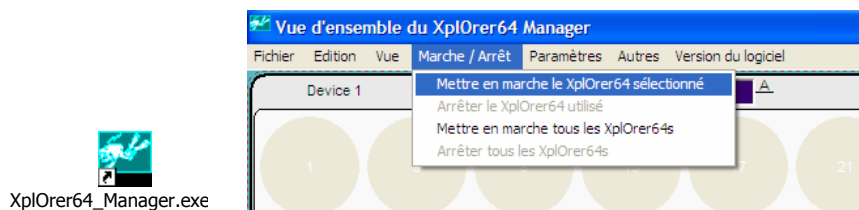
## 10. PROTOCOLE

---

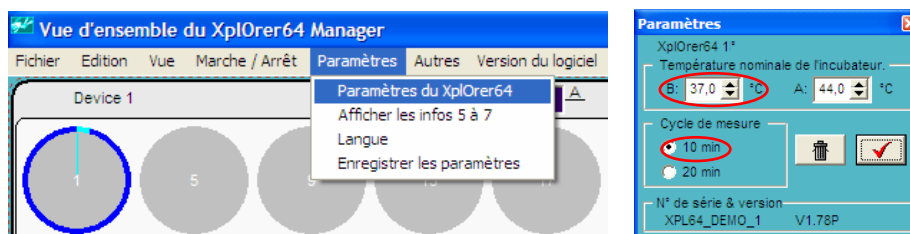
Il est fortement recommandé de **lire l'intégralité de ce protocole avant de commencer l'analyse**. Pour de plus amples précisions sur les instructions de paramétrages du logiciel, consulter le Manuel Utilisateur du Système XplOrer64.

## A. OPERATIONS PRELIMINAIRES

- Mettre sous tension dans l'ordre : l'onduleur (UPS), l'ordinateur (et son imprimante) et terminer par le Système XplOrer64.
- Démarrer le logiciel XplOrer64 Manager en cliquant sur l'icône de raccourci. Dans la « Vue d'ensemble de l'XplOrer64 Manager », mettre en marche l'unité d'XplOrer64. Le sport en haut à droite de l'écran tourne alors au vert.



- Dans le menu « Paramètres », « Paramètres de l'XplOrer64 », choisir la température à **37.0°C** le(s) incubateur(s) défini(s) pour réaliser les analyses *Enterococci* (**préchauffer au moins 30 minutes avant de débuter une analyse**), et paramétrer le **cycle de mesure sur 10 minutes**.



- Préparer le nombre de réactifs CheckN'Safe nécessaires dans un/plusieurs portoir(s) et **conserver-les à température ambiante**.
- Préparer bouchons stériles et système de filtration sur membrane.

## B. PARAMETRAGES

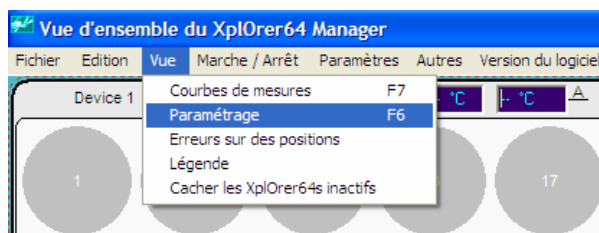
Pour réaliser les analyses, les paramétrages suivants doivent être réalisés dans le(s) incubateur(s) et les positions de l'XplOrer64 :

### Remarques importantes :

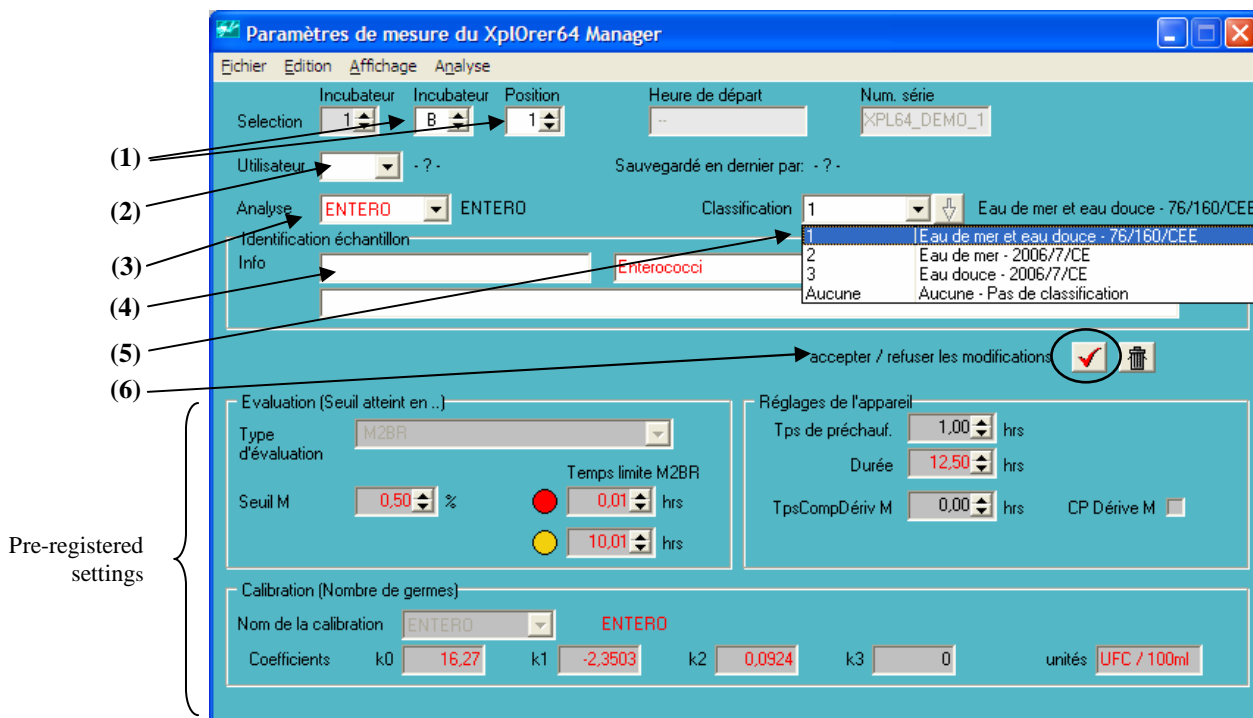


- Si ces paramétrages ne sont pas réalisés avant le début des mesures ou jusqu'à la fin de période de préchauffage, **le Système XplOrer64 utilisera par défaut les paramètres précédemment enregistrés dans la/les position(s) utilisés.**
- En dehors de la période de mesure, le changement de paramétrages des cellules CheckN'Safe déjà insérées dans l'incubateur sera limité à l'étape de préchauffage.
- Si une nouvelle cellule est introduite dans un incubateur vide sans changer les paramètres de l'analyse, **les mesures s'effectueront en utilisant les « anciens » paramètres enregistrés** pour les mesures précédentes. Dans ce cas, il est possible de changer les paramètres alors même que la période de préchauffage est terminée.

B.1. Dans la fenêtre principale « Vue d'ensemble de l'XplOrer64 Manager », ouvrir l'option « Vue » et « Paramétrage » :



B.2. Entrer/Vérifier les paramètres *Enterococci* suivants :



- (1) Sélectionner l'incubateur "B" et le spot "Position 1".  
(NB : il est recommandé de fixer la température la plus basse dans l'incubateur inférieur).
- (2) Sélectionner le **nom utilisateur** à l'aide du menu déroulant.
- (3) Sélectionner l'analyse "Entero" dans le menu déroulant **et valider en cliquant sur la flèche bleue**. Tous les paramètres préenregistrés (mode d'évaluation, seuils, pré-incubation, durée et calibration) sont alors automatiquement implémentés dans la partie inférieure de la fenêtre (champs à fond grisé).
- (4) Entrer les **informations d'identification de l'échantillon**. Il est recommandé d'utiliser le premier champ pour le numéro de l'échantillon.  
(NB: Cette étape peut être réalisée ultérieurement et ce jusqu'à la fin du cycle de l'analyse, mais dans tous les cas avant de retirer les cellules de l'incubateur. Dans le cas contraire, il serait alors impossible d'identifier l'échantillon dans la base de données).
- (5) **Sélectionner la classification des résultats souhaitée**, en fonction de l'origine de l'échantillon (eau de mer ou eau douce) et de la Directive à suivre :
  1. Eau de mer et eau douce - 76/160/CEE,
  2. Eau de mer - 2006/7/CE,
  3. Eau douce - 2006/7/CE,
  - Aucune - Pas de classification.

Ce paramétrage implémente alors automatiquement la valeur impérative correspondante (Limite 1) et la valeur guide (Limite 2), en attribuant au spot une couleur, en fonction du délai de détection du signal, comme le décrit le tableau 1 en page suivante. Si aucune classification n'est renseignée, aucune limite ne sera affichée.

Directive Eau de Baignade	<i>Enterococci</i> testing (limits in CFU/100ml) Origin of water analysed	Limite 2		Limite 1
		≥ Limite 1	[Limite 2-Limite 1]	< Limite 2
		Rouge	Jaune	Vert
76/160/ CEE	Eau côtière & intérieure	-	≥ 100	< 100
2006/7/CE	Eau côtière	≥ 250	[250 – 100]	< 100
	Eau intérieure	≥ 400	[400 - 420]	< 200

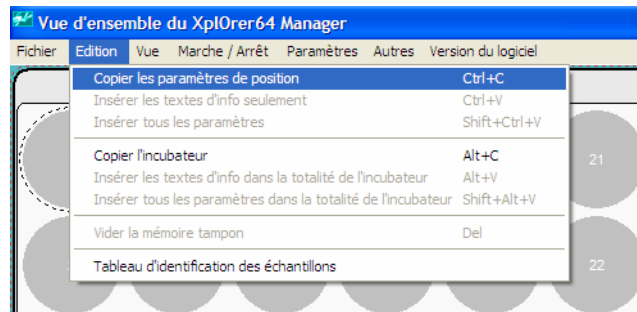
Tableau 1: Limites de classification des échantillons

- (6) **Confirmer les nouveaux paramètres** en cliquant de nouveau sur la **flèche bleue** (tous les textes des champs renseignés s'affichent alors en caractères noirs). Fermer cette fenêtre et confirmer par « Oui ».

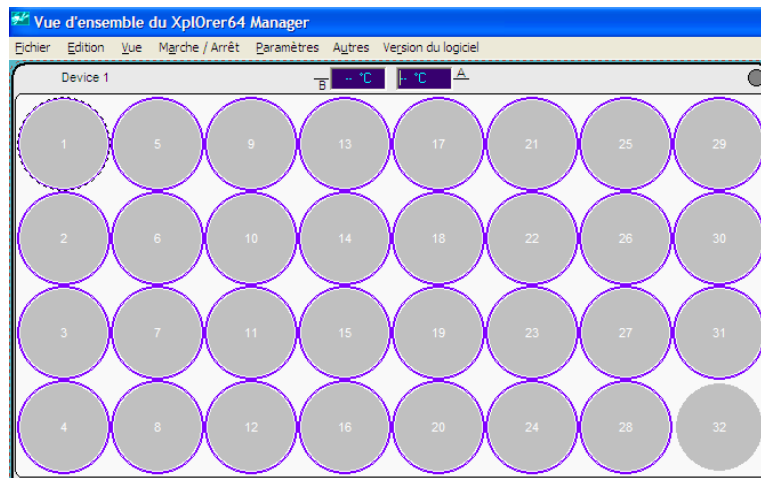
B.3. A cette étape, seule une position (la Position 1) a été correctement paramétrée dans l'incubateur. Dans la fenêtre « Vue d'ensemble de l'XplOrer Manager », suivre les instructions suivantes :



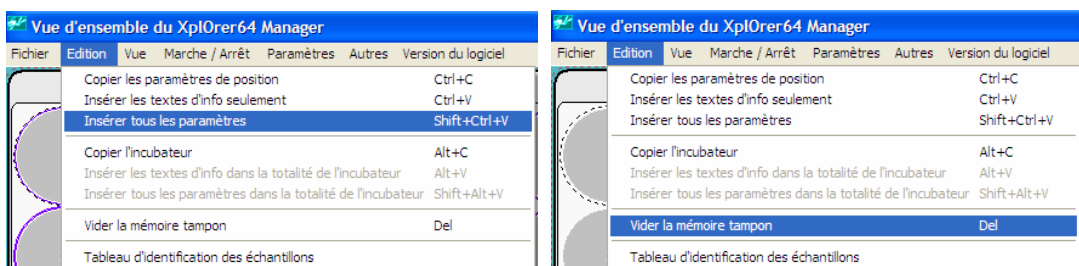
- Cliquer dans le **spot 1** avec la souris (le pourtour du cercle s'affiche alors sous forme de tirets noirs statiques).
- Dans le menu, sélectionner **“Edition”** et **“Copier les paramètres de position”** (les tirets noirs tournent alors tout autour du spot ; la copie est activée).



- Presser simultanément le **bouton shift** sur le clavier de l'ordinateur **en cliquant à l'intérieur du spot 31** avec la souris: les cercles de tous les spots sélectionnés deviennent alors violets. (NB: par défaut, le spot 32 sera réservé à la cellule de contrôle interne de la température. Si cette cellule de contrôle n'est pas utilisé, sélectionner alors les 32 positions).



- Dans le menu, sélectionner **“Edition”** et **“Insérer tous les paramètres”**: le cercle des spots vont alors redevenir gris un à un, comme en situation initiale. Le collage des informations s'est effectué avec succès. Sélectionner à nouveau **“Edition”** et **“Vider la mémoire tampon”** pour vider la mémoire tampon.



B.5. Maintenant, l'incubateur sélectionné est paramétré. Les paramètres doivent désormais être réalisés de même dans le second incubateur, avec la même procédure s'il s'agit d'analyses *Enterococci* ou suivant les paramètres adéquats s'il s'agit d'une autre analyse bactérienne.



### C. PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON

**Note :** Dans la mesure du possible, il est recommandé de ne pas dépasser un maximum de 10 minutes entre l'insertion de la membrane dans une cellule et son transfert dans un incubateur du Système. Une série d'environ 6 échantillons à la fois répond à ce critère.

- Disposer les tests CheckN'Safe *E. coli* dans leur portoir. Pré-ouvrir les opercules de chaque test en le remplaçant aussitôt afin d'éviter toutes contaminations aériennes ou externes. Préparer les bouchons stériles et un stylo indélébile, afin d'y inscrire le numéro d'échantillon.
- **Filtrer 100 ml** d'échantillon d'eau sur une membrane.
- Rincer cette membrane avec au moins **50 ml** d'eau distillée ou déionisée stérile.
- A l'aide de deux pinces stériles, plier la membrane en deux puis encore en deux, pour obtenir un cône (voir Annexe A). Soulever l'opercule d'une cellule pré-ouverte et inoculer la membrane dans le bouillon de culture, **pointe du cône vers le bas**. Refermer l'opercule et ajouter un bouchon stérile par-dessus. A cette étape, il faut **s'assurer que l'intégralité de la membrane est parfaitement immergée**. Si nécessaire, homogénéiser par légère rotation de la cellule en évitant la formation de mousse.
- Vérifier que la température de l'incubateur est bien stabilisée à  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (dans le cas contraire, attendre que le préchauffage s'achève). Introduire alors chaque série de cellules CheckN'Safe inoculées dans les positions de l'incubateur paramétré tel que décrit en partie A et B. **Vérifier que chaque cellule est correctement connectée au fond de chaque position**.
- La pré-incubation d'1 heure débute alors pour les échantillons introduits.



### D. ANALYSE DES RESULTATS

- Dès la fin de la période de pré-incubation d'1 heure, les échantillons sont analysés toutes les 10 minutes dans chaque position des deux incubateurs, en construisant ainsi la courbe d'impédance individuelle de chaque échantillon. Sont présentés ci-dessous les Temps de Détection moyens observés pour une population naturelle d'*Enterococci* (provenant d'eau de mer et d'eau douce) :

<i>Enterococci</i> / 100ml	Temps de Détection
< 20	≥ 12.5 h / <b>12h30min</b>
100	10.01 h / <b>10h01min</b>
200	9.46 h / <b>9h28min</b>
250	9.31 h / <b>9h18min</b>
400	9.0 h / <b>9h00min</b>

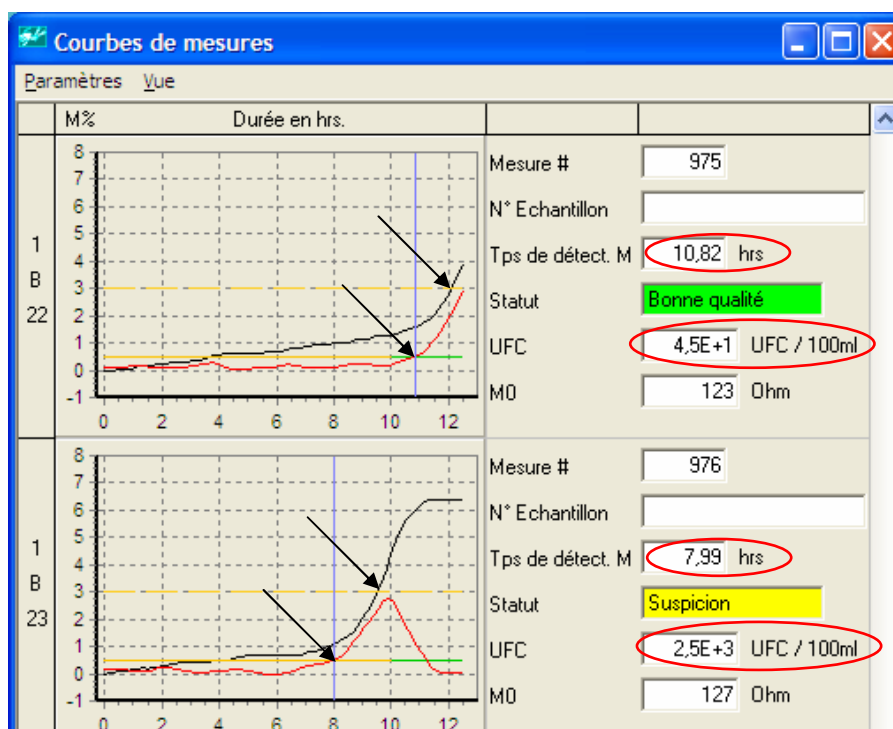
- La progression de l'analyse peut être suivie en temps réel à **n'importe quel moment au cours des 12,5 hrs** du cycle d'analyse, dans le XplOrer64 Manager, en **observant simplement les spots** dans la fenêtre du menu principal : voir tableau page suivante...

Analyse en temps réel	Encore en cours...	Echantillons positifs			Echantillon négatif
Apparence du spot, avec la classification de la <u>2006/7/CE</u>					
Apparence du spot, avec la classification de la <u>76/160/CEE</u>		Non applicable*			
Interprétation du résultat	Pas encore déterminé...	Eau polluée	Suspicion de pollution	Bonne qualité de l'eau	Excellente qualité de l'eau
Concentration en Enterococci /100ml d'eau	Pas encore déterminé...	≥ Limite 1	] Limite 1; Limite 2 [	≤ Limite 2	< Limite de Détection

Limites établies selon les « critères de classification » (\* Cf. Tableau 1 page 5)

- Pour obtenir précisément les résultats quantitatifs, il suffit de cliquer sur le pourtour du spot correspondant à l'échantillon d'intérêt. Une fenêtre s'ouvre alors et affiche le graphique correspondant à cet échantillon, sa concentration déterminée en Enterococci /100 ml, ainsi que son statut.

Exemples d'échantillons d'eau de bonne qualité et de suspicion de pollution :



- L'intégralité des données enregistrées peuvent également être analysées dans le logiciel XplOrer64™ Smart View (consulter le Manuel Utilisateur de l'XplOrer64 pour plus d'informations).

## E. CONFIRMATION DES RESULTATS

Selon le type de classification choisi (selon le tableau 1 page 5), les résultats des échantillons déclarés « pollués » avec la Directive de 2006 (spot rouge) ou « suspicieux » avec la Directive de 1976 (spot jaune) ou encore « positifs » sans classification (spot bleu foncé) nécessitent une confirmation visuelle avant de conclure.

Il s'agit d'une analyse graphique rapide qui consiste à vérifier l'aspect des courbes d'impédance, soit dans la fenêtre de « **Courbes de mesures** » dans l'XplOrer64 Manager, soit dans l'XplOrer64 Smart View. Les caractéristiques de confirmation sont détaillées dans le Manuel Utilisateur de l'XplOrer64 (V2.0 daté de Juin 2009) dans les chapitres 8.7 et 8.8. Toutefois, l'Annexe B présentée en fin de notice, présente une synthèse de l'allure des courbes.

## 11. CONTROLES QUALITE DU FABRICANT

---

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

-----

## ANNEXE A: Schéma du pliage de la membrane



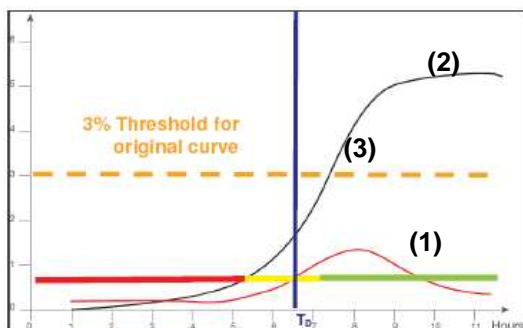
A l'aide de deux pinces métalliques à bouts ronds stériles, plier la membrane en 2 à trois reprises, afin d'obtenir un cône.



Introduire alors le cône, pointe vers le bas, dans un bouillon CheckN'Safe.

## ANNEXE B: Confirmation graphique des échantillons positifs

### Règles pour confirmer un signal positif :



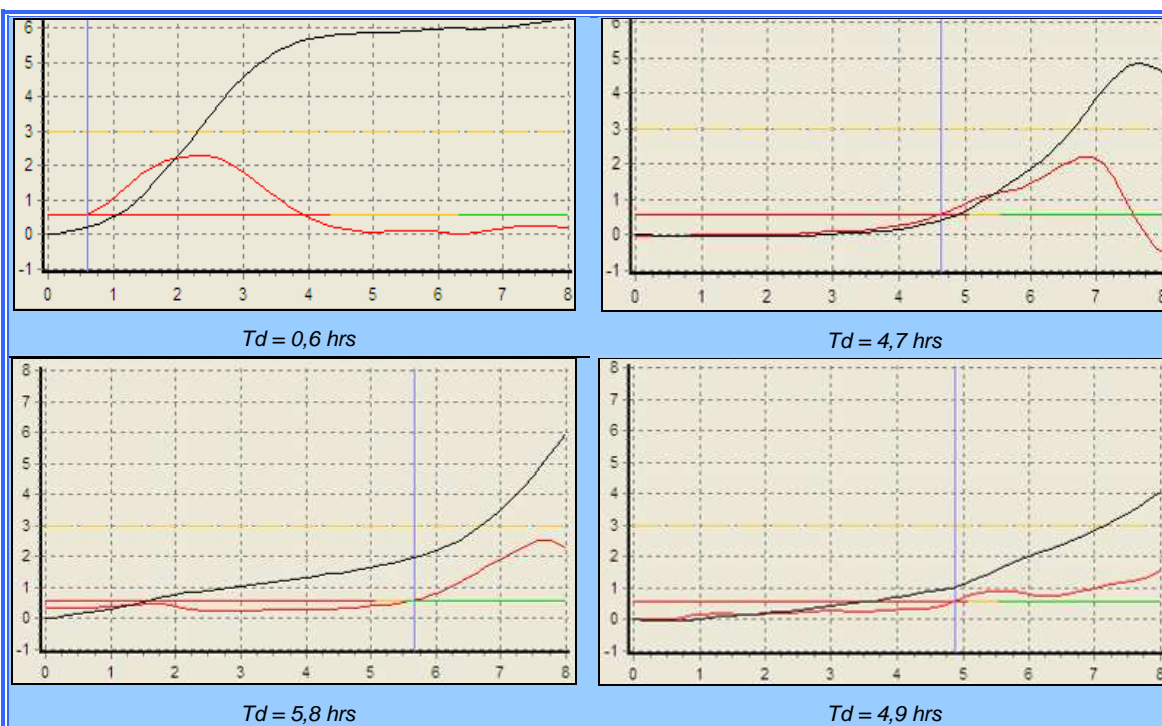
*Courbes positives théoriques*

(1) Le temps de détection ( $T_d$ ) est déterminé à l'aide de la courbe dérivée (rouge) au moment précis où elle atteint le seuil son seuil de 0.5%. Le profil typique de cette courbe est une « courbe en cloche » quelle que soit son amplitude.

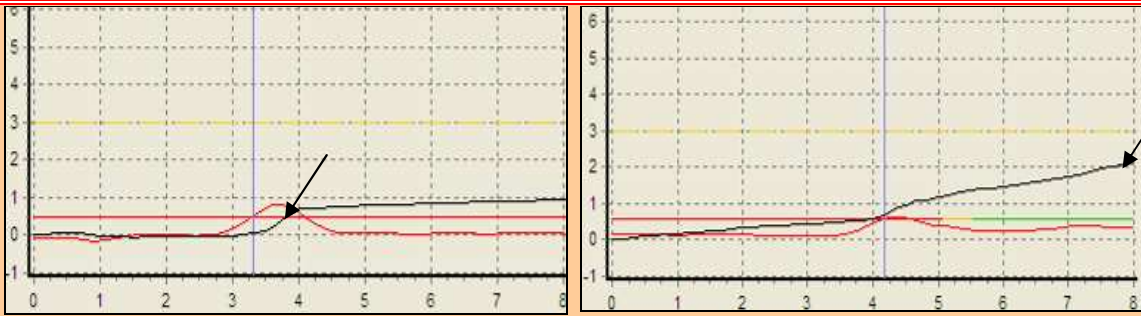
(2) Le profil typique de la courbe d'origine (en noir) doit ressembler à une **courbe typique de croissance microbologique (une sigmoïde)**, et ne doit pas décroître avant d'avoir atteint la phase « stationnaire ».

(3) Si le  **$T_d$  est déterminé dans les 3 premières heures du cycle**, la courbe d'origine doit atteindre son seuil de 3% (ligne jaune discontinue) **en moins de 5 hrs**, sinon le logiciel supprime automatiquement l'affichage des points mesurés avant 3 heures, et le résultat est considéré comme négatif.

### Exemples de vue générale de courbes positives CONFIRMÉES :

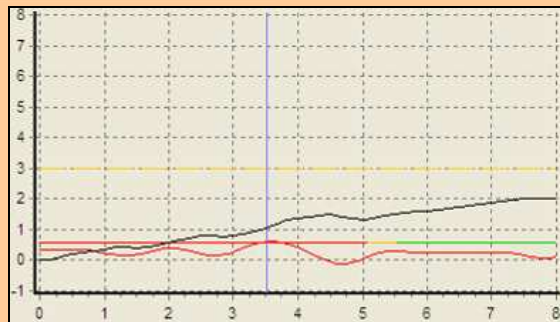


**Exemples de courbes négatives donnant une interprétation automatisée FAUSSEMENT positive avec le logiciel :**



a) La courbe d'origine présente un artéfact aux environs de 3 hrs et reste ensuite stable tout le reste du cycle d'analyse.

b) La courbe d'origine ne présente pas une courbe sigmoïdale caractéristique et elle n'atteint jamais son seuil de 3%.



c) Courbes de meures instables ; la courbe d'origine n'atteint jamais son seuil de 3%.

-----

## ANNEXE 3

(étude préliminaire)

### ÉVALUATION DE LA SELECTIVITE (GERMES CIBLES)

#### Liste des 30 souches d'entérocoques intestinaux testées et résultats obtenus

	Espèce	Origine		1er essai		2ème essai si besoin			
				Résultats en entérocoques (prises d'essai de même volume)		Résultats en entérocoques (prises d'essai de même volume)			
				Méthode XplOrer64™	Méthode par incorporation	Méthode XplOrer64™	Méthode par incorporation	Méthode NF EN ISO 7899-1	
1	<i>Enterococcus avium</i>	IPL	eau douce (puits)	Lille (59)	<1 (non détecté)	2,5E+01	<1 (non détecté)	5,3E+01	<15
2	<i>Enterococcus durans</i>	IPL	eau douce (puits)	Lille (59)	2,7E+01	2,4E+01			
3	<i>Enterococcus durans</i>	IPL	eau douce (surface)	Etang du Parc Barbieux, Croix (59)	1,4E+02	8,1E+01			
4	<i>Enterococcus durans</i>	IPL	eau de mer	Plage sud, Oyes-Plage (62)	3,4E+02	7,7E+01			
5	<i>Enterococcus durans</i>	IPL	eau de mer	Plage de Wissant (62)	3,5E+02	4,8E+01			
6	<i>Enterococcus durans</i>	IPL	eau de mer	Plage du Chatelet, Tardinghen (62)	2,6E+02	5,9E+01			
7	<i>Enterococcus faecalis</i>	collection (CCM 2541 = CIP 106877)			1,0E+02	2,6E+01			
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	IPL	eau de mer	Plage sud, Audresselles (62)	<1 (non détecté)	7,7E+01	<1 (non détecté)	1,7E+02	1,6E+02
9	<i>Enterococcus faecalis</i>	IPL	eau de mer	Plage des Dunes de la Slack, Ambleuse (62)	1,03E+02	1,1E+02			
10	<i>Enterococcus faecium</i>	collection (RIVM WR63 = CIP 106876)			1,1E+02	1,7E+01			
11	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau douce (surface)	Port de Plaisance, Fort-Philippe (59)	3,5E+01	4,6E+01			
12	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau douce (surface)	Etang du Parc d'Immercourt, Athies (62)	3,6E+01	5,9E+01			
13	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau douce (surface)	Rivière, Roeux (62)	5,3E+01	4,5E+01			
14	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau douce (surface)	Lac de Waziers (59)	8,9E+01	2,1E+01			
15	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau douce (surface)	Rivière, Lambres-Lez-Douai (59)	2,9E+01	3,5E+01			
16	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau douce (surface)	Lac de Brunemont (59)	4,1E+01	8,1E+01			
17	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau douce (surface)	Canal de la Sensée, Arleux (59)	8,9E+01	4,2E+01			
18	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau saumâtre	Estuaire de l'Aa, Gravelines (59)	2,3E+01	5,2E+01			
19	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau saumâtre	Canal de Bourbourg, Dunkerque (59)	2,6E+02	5,2E+01			
20	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau de mer	Plage Centrale, Dunkerque (59)	1,4E+02	3,6E+01			
21	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau de mer	Plage centrale, Gravelines (59)	5,5E+02	6,4E+01			
22	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau de mer	Plage de Fort-Vert, Hemmes de Marck (62)	8,5E+01	3,2E+01			
23	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau de mer	Plage centrale, Sangatte (62)	2,1E+02	6,3E+01			
24	<i>Enterococcus faecium</i>	IPL	eau de mer	Plage du Cap Gris-Nez (62)	1,3E+02	4,6E+01			
25	<i>Enterococcus gallinarum</i>	IPL	eau douce (surface)	Douves, Gravelines (59)	4,6E+01	5,3E+01			
26	<i>Enterococcus gallinarum</i>	IPL	eau douce (surface)	Lac du Héron, Villeneuve d'Asq (59)	4,4E+01	5,0E+01			
27	<i>Enterococcus gallinarum</i>	IPL	eau douce (surface)	Rivière, Armentières (59)	3,9E+01	3,3E+01			
28	<i>Enterococcus gallinarum</i>	IPL	eau douce (surface)	Etang Loispirc, Aubigny-au-Bac (59)	5,1E+01	4,8E+01			
29	<i>Enterococcus gallinarum</i>	IPL	eau de mer	Plage du Cap Blanc-Nez (62)	2,1E+01	2,0E+01			
30	<i>Enterococcus hirae</i>	collection (CCM 2423 = CIP 82.112)			3,5E+01	1,2E+02			

(IPL : souche isolée de l'environnement)

## ANNEXE 4

(étude préliminaire)

### ÉVALUATION DE LA SELECTIVITE (GERMES INTERFERENTS)

#### Liste des 30 souches interférentes testées et résultats obtenus

	Espèce	Origine	1er essai		2ème essai si besoin		
			Résultats en entérocoques (ramenés au même volume de prise d'essai)		Résultats en entérocoques (ramenés au même volume de prise d'essai)		
1	<i>Aerococcus viridans</i>	collection (CIP 54.145T = ATCC 11563)	<1 (non détecté)	4,4E+03			
2	<i>Aerococcus viridans</i>	IPL, eau douce (réseau)	<1 (non détecté)	3,4E+04			
3	<i>Lactococcus cremoris</i>	IPL, eau douce (réseau)	<1 (non détecté)	2,6E+04			
4	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	collection (CIP 70.56T = ATCC 19435)	<1 (non détecté)	6,0E+04			
5	<i>Micrococcus luteus</i>	collection (CIP 53.45 = ATCC 9341)	<1 (non détecté)	8,0E+04			
6	<i>Micrococcus (Kocuria) varians</i>	collection (CIP 81.73T = ATCC 15306)	<1 (non détecté)	8,0E+04			
7	<i>Pediococcus damnosus</i>	collection (CIP 102264T = ATCC 29358)	<1 (non détecté)	1,8E+04			
9	<i>Pediococcus (Tetragenococcus) halophilus</i>	collection (CIP 102263T = ATCC 33315)	<1 (non détecté)	2,0E+04			
10	<i>Pediococcus inopinatus</i>	collection (CIP 102406T = CCM3451)	<1 (non détecté)	5,4E+04			
11	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	collection (CIP 10260T = ATCC 33316)	<1 (non détecté)	8,0E+04			
8	<i>Planococcus citreus</i>	collection (CIP 81.74T = ATCC 14404)	<1 (non détecté)	1,5E+05			
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	collection (CIP 53.154 = ATCC 9144)	<1 (non détecté)	1,2E+04			
13	<i>Staphylococcus capitis</i>	IPL, eau douce (piscine)	<1 (non détecté)	3,4E+03			
14	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	IPL, eau douce (piscine)	<1 (non détecté)	2,5E+04			
15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	collection (CIP 68.21 = ATCC 12228)	<1 (non détecté)	2,4E+05			
16	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	IPL, eau douce (réseau)	<1 (non détecté)	1,9E+04			
17	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	IPL, eau douce (thermes)	<1 (non détecté)	2,5E+04			
18	<i>Staphylococcus xylosus</i>	IPL, eau douce (réseau)	<1 (non détecté)	2,3E+04			
19	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	collection (CIP 64.6T = ATCC 17909)	<1 (non détecté)	3,1E+04			
20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	IPL, eau douce (forage)	<1 (non détecté)	2,5E+05			
21	<i>Bacillus cereus</i>	collection (CIP 64.52 = ATCC 11778)	<1 (non détecté)	3,0E+05			
22	<i>Bacillus subtilis</i>	collection (CIP 52.62 = ATCC 6633)	<1 (non détecté)	2,5E+05			
23	<i>Corynebacterium propinquum</i>	IPL, eau douce (réseau)	<1 (non détecté)	1,9E+03			
24	<i>Enterobacter cloacae</i>	IPL, eau douce (piscine)	<1 (non détecté)	1,2E+04			
25	<i>Proteus mirabilis</i>	IPL, eau douce (rivière)	<1 (non détecté)	8,8E+03			
26	<i>Proteus vulgaris</i>	IPL, eau douce (rivière)	<1 (non détecté)	6,8E+03			
27	<i>Providencia stuartii</i>	IPL, eau douce (rivière)	7,4E+01	6,5E+03	<1 (non détecté)	2,3E+03	<15
28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPL, eau douce (thermes)	<1 (non détecté)	4,6E+03			
29	<i>Vibrio fluvialis</i>	IPL, eau douce (rivière)	<1 (non détecté)	9,0E+03			
30	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	IPL, eau douce (réseau)	<1 (non détecté)	9,6E+04			

(IPL : souche isolée de l'environnement)