

ETUDE DE LA VALIDATION
DE LA METHODE COLILERT[®]-18/QUANTI-TRAY[®]
POUR LE DENOMBREMENT
DES ESCHERICHIA COLI ET DES COLIFORMES
DANS L'EAU DE CONSOMMATION HUMAINE

RAPPORT DE SYNTHESE

METHODE COLILERT[®]-18 / QUANTI-TRAY[®] - R.S. (V0) – MARS 2010



Accréditation N° 1-1759
Portée sur www.cofrac.fr

Ce rapport d'analyse ne concerne que les objets soumis aux analyses. Sa reproduction n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral. Il comporte 15 pages (hors annexes). Seuls certains essais rapportés dans ce document sont couverts par l'accréditation de la Section Laboratoire du COFRAC. Ils sont identifiés par le symbole (*).

Essais réalisés à l'ISHA : 25, avenue de la République 91300 Massy

Fabricant: **IDEXX Laboratories, Inc.**
IDEXX Drive
Westbrook
Maine 04092
USA

Laboratoire expert : **I. S. H. A.**
25, avenue de la République
91300 MASSY
FRANCE

En vue de la validation AFNOR Certification du test COLILERT®-18 / QUANTI-TRAY® pour le dénombrement des *Escherichia coli* et des Coliformes selon le protocole général (rév .0 – 28/07/2008)

SOMMAIRE

<u>1. Introduction</u>	4
<u>1.1. Référentiel de validation</u>	4
<u>1.2. Méthode alternative</u>	4
<u>1.3. Domaine d'application</u>	4
<u>1.4. Méthode de référence (*)</u>	4
<u>2. Etude comparative des deux méthodes</u>	4
<u>2.1. Exactitude relative</u>	4
<u>2.1.1. Nombre et nature des échantillons</u>	4
<u>2.1.2. Résultats bruts</u>	4
<u>2.1.3. Exploitation statistique</u>	5
<u>2.1.4. Conclusion</u>	6
<u>2.2. Linéarité</u>	7
<u>2.2.1. Niveaux de contamination</u>	7
<u>2.2.2. Résultats bruts</u>	7
<u>2.2.3. Exploitation statistique</u>	7
<u>2.2.4. Conclusion</u>	8
<u>2.3. Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ)</u>	8
<u>2.3.1. Protocole d'essais</u>	8
<u>2.3.2. Résultats</u>	8
<u>2.3.3. Conclusion</u>	9
<u>2.4. Spécificité / sélectivité</u>	9
<u>2.4.1. Protocole d'essais</u>	9
<u>2.4.2. Résultats</u>	9
<u>2.4.3. Conclusion</u>	10
<u>2.5. Praticabilité</u>	10
<u>2.6. Conclusions de l'étude comparative des méthodes</u>	10
<u>3. Etude collaborative</u>	11
<u>3.1. Mise en œuvre de l'étude collaborative</u>	11
<u>3.1.1. Laboratoires collaborateurs</u>	11
<u>3.1.2. Vérification de l'absence de coliformes dans la matrice</u>	11
<u>3.1.3. Stabilité des souches dans la matrice eau</u>	11
<u>3.1.4. Préparation et inoculation des échantillons</u>	11
<u>3.1.5. Etiquetage des échantillons</u>	11
<u>3.1.6. Expédition des échantillons</u>	12
<u>3.1.7. Réception et analyse des échantillons</u>	12
<u>3.2. Résultats</u>	12
<u>3.2.1. Température et état des échantillons à réception</u>	12
<u>3.2.2. Dénombrement de la flore totale</u>	13
<u>3.2.3. Résultats des laboratoires expert et collaborateurs</u>	13
<u>3.3. Interprétation statistique</u>	13
<u>3.3.1. Calcul du biais</u>	13
<u>3.3.2. Profils d'exactitude</u>	14
<u>3.4. Conclusion</u>	15

1. Introduction

1.1. Référentiel de validation

L'étude préliminaire a pour but d'évaluer les performances de la méthode Colilert® -18 / Quanti-Tray® pour le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes dans les eaux de consommation humaine par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 (Sept. 2000).

1.2. Méthode alternative

Colilert®-18 avec Quanti-Tray® est une méthode colorimétrique pour la détection et la numération dans les eaux de boissons des *Escherichia coli* à β -glucuronidase positive et des coliformes à β -galactosidase positive. Le protocole de la méthode alternative est présenté en annexe 2. Les numéros des notices Colilert-18 et Quanti-Tray utilisés pour l'étude de validation étaient respectivement : 06-02027-11 et 06-02030-12. Les versions révisées (Colilert-18 : 06-02027-15 et Quanti-Tray : 06-02030-13, apportant des précisions, sont en cours d'édition au moment de la publication du rapport.

1.3. Domaine d'application

Eau de consommation humaine.

1.4. Méthode de référence (*)

La norme NF ISO 9308-1 (sept 2000) : détection et numération des *Escherichia coli* et des coliformes - Partie 1 : méthode par filtration sur membrane. Deux temps d'incubation ont été testés : 24 heures et 48 heures.

Le protocole de la méthode de référence est présenté en annexe 3.

2. Etude comparative des deux méthodes

2.1. Exactitude relative

L'exactitude relative est définie comme l'écart de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

2.1.1. Nombre et nature des échantillons

Deux catégories d'eaux ont été testées en parallèle (analyse en double) avec la méthode de référence et la méthode alternative : les eaux de distribution et les eaux de fontaine. Les différents types d'échantillons analysés sont présentés dans le tableau 1.

Dénombrement	Type d'eau	Echantillons analysés	Echantillons exploités
<i>Coliformes</i>	Eau de distribution	31	25
	Eau de fontaine	29	25
<i>Escherichia coli</i>	Eau de distribution	36	30
	Eau de fontaine	34	28
Total		130	108

Tableau 1 : nature et nombre d'échantillons analysés

Au total, 130 échantillons ont été analysés et 108 résultats ont été exploités. Aucun échantillon naturellement contaminé n'a été analysé. Les échantillons ont donc été artificiellement contaminés. Les taux de contaminations employés couvrent l'ensemble de la gamme de mesure de la méthode alternative.

2.1.2. Résultats bruts

Les figures 1 et 2 représentent les graphiques bidimensionnels pour les 4 couples matrice/souche. L'axe y est réservé à la méthode alternative et l'axe x à la méthode de référence.

Les calculs statistiques et les représentations graphiques ont été établis à partir des dénombrements réalisés après 48 heures d'incubation pour la méthode de référence. La représentation d'une droite d'équation « $y=x$ » figure en pointillés sur les figures ci-dessous.

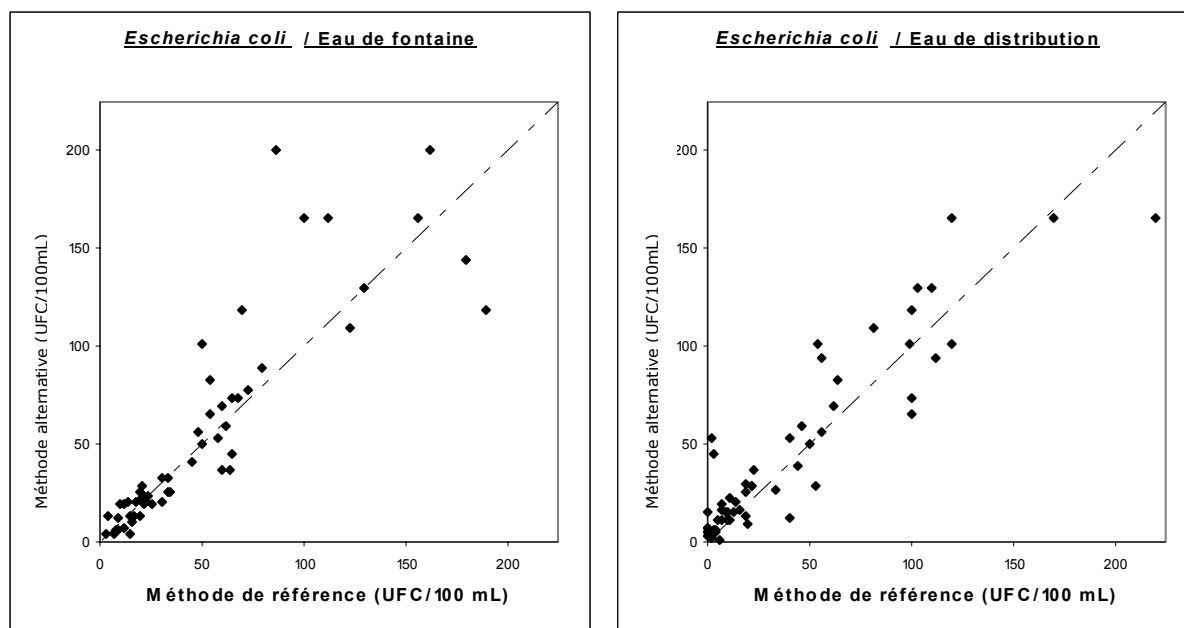


Figure 1 : graphiques bidimensionnels pour les contaminations par *Escherichia coli*.

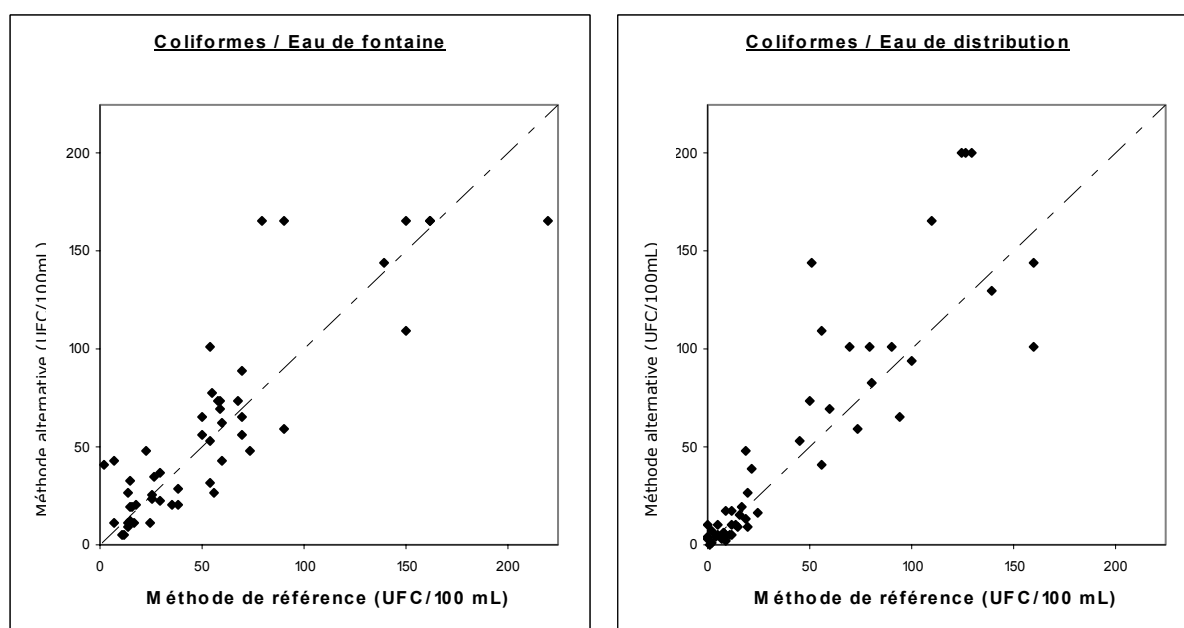


Figure 2 : graphiques bidimensionnels pour les contaminations par Coliformes

2.1.3. Exploitation statistique

La relation d'exactitude relative entre la méthode de référence et la méthode alternative est évaluée avec le modèle linéaire : « $y = a + bx$ ». Cette formule correspond à l'équation de la droite de régression linéaire tracée à partir des résultats bruts obtenus par l'expérimentation, y représentant la méthode alternative et x la méthode de référence. Il y a une exactitude idéale (ou il n'y a pas de biais systématique) entre les deux méthodes si cette équation est égale à l'équation théorique « $y=x$ », qui s'applique dans le modèle idéal où les deux méthodes se comportent de la même façon.

L'intercept « a » est théoriquement nul dans ce modèle idéal (hypothèse [a=0]). L'intercept estimé obtenu avec les deux méthodes est vérifié à l'aide de $p\{a=0\}$. Si la méthode alternative présente un biais systématique par rapport à la méthode de référence, la probabilité $p\{a=0\}$ est inférieure à $\alpha=0,05$.

La pente « b » est théoriquement égale à 1 dans le modèle idéal (hypothèse [b=1]). La pente estimée obtenue avec les deux méthodes doit se vérifier par $p\{b=1\}$. Statistiquement, si la méthode alternative ne donne pas les mêmes valeurs que la méthode de référence, la probabilité $p\{b=1\}$ est inférieure à $\alpha=0,05$.

Le choix de la méthode de régression linéaire se fait par rapport à la valeur de la robustesse du rapport R des écart-types de répétabilité globale :

- si $Rob.R > 2$, une régression linéaire par les moindres carrés (OLS 1) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode de référence,
- si $Rob.R < 0,5$, une régression linéaire par les moindres carrés (OLS 2) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode alternative,
- si $0,5 < Rob.R < 2$, une régression orthogonale (GMFR) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode de référence.

Couple Souche / matrice	Rob. R	Régression utilisée	T critique	a	t(a)	b	t(b)	Probabilités (%)	
								Ordonnée à 0	Pente à 1
<i>E. coli</i> / Eau de fontaine	1,182	GMFR	2,048	-3,392	0,542	1,155	1,667	59,0	10,1
<i>E. coli</i> / Eau de distribution	1,513	GMFR	2,042	6,091	1,628	0,971	0,473	10,9	63,8
Coliformes / Eau de fontaine	1,920	GMFR	2,060	1,749	0,304	1,031	0,389	76,2	69,9
Coliformes / Eau de distribution	1,100	GMFR	2,060	-3,008	0,513	1,256	2,767	61,0	0,8

Tableau 2 : données statistiques

Couple Souche / matrice	Biais (D)		Répétabilité			
	Moyen	Médian	r		Rob.r	
			MR	MA	MR	MA
<i>E. coli</i> / Eau de fontaine	4,391	2,150	18,23	54,94	16,14	19,08
<i>E. coli</i> / Eau de distribution	4,955	4,425	25,75	28,02	11,74	17,76
Coliformes / Eau de fontaine	3,448	1,050	50,15	33,42	14,68	28,18
Coliformes / Eau de distribution	8,082	-1,000	41,03	45,99	8,81	9,69

Tableau 3 : biais et répétabilité des 2 méthodes

2.1.4. Conclusion

Les équations des droites de régression pour les différents couples sont les suivantes :

- E. coli* / Eau de fontaine : Alt. = 1,155 Réf. - 3,392
- E. coli* / Eau de distribution : Alt. = 0,971 Réf. - 6,091
- Coliformes / Eau de fontaine : Alt. = 1,031 Réf. + 1,749
- Coliformes / Eau de distribution : Alt. = 1,256 Réf. - 3,008

L'hypothèse [a=0 et b=1] est acceptée pour tous les catégories de couples matrice / souche à l'exception du couple Coliformes / Eau de distribution. Pour ce couple, les résultats obtenus concernant la droite de régression sont corrects :

Coefficient de corrélation : $r = 0,936$

Equation de la droite de régression : Alt. = 1,256 Réf. - 3,008

Les biais entre les deux méthodes sont compris entre -1,000 et 4,425 UFC /100mL.

L'exactitude relative de la méthode alternative est satisfaisante.

2.2. Linéarité

La linéarité est définie comme l'aptitude de la méthode à fournir des résultats proportionnels à la quantité de microorganismes présents dans l'échantillon, c'est-à-dire qu'à une augmentation de l'analyte correspond une augmentation linéaire ou proportionnelle des résultats.

2.2.1. Niveaux de contamination

Les couples matrice / souche sont présentés dans le tableau 4. Pour chaque couple, quatre niveaux de contaminations ont été testés en double par la méthode de référence et la méthode alternative.

Souche	Matrice	Taux de contamination cible (UFC/100mL)
<i>Escherichia coli</i> ESC.1.112	Eau de distribution	10- 30- 50- 100
<i>Citrobacter freundii</i> CIT.1.4	Eau de fontaine	

Tableau 4 : couples souche / matrice analysés

2.2.2. Résultats bruts

Les graphiques de la figure 3 présentent les valeurs de chaque échantillon obtenues par la méthode alternative et la méthode de référence. L'axe y est réservé à la méthode alternative et l'axe x à la méthode de référence.

Les calculs statistiques et les représentations graphiques ont été établis à partir des dénombrements réalisés après 48 heures d'incubation pour la méthode de référence. La représentation d'une droite d'équation « $y=x$ » figure en pointillés sur les figures.

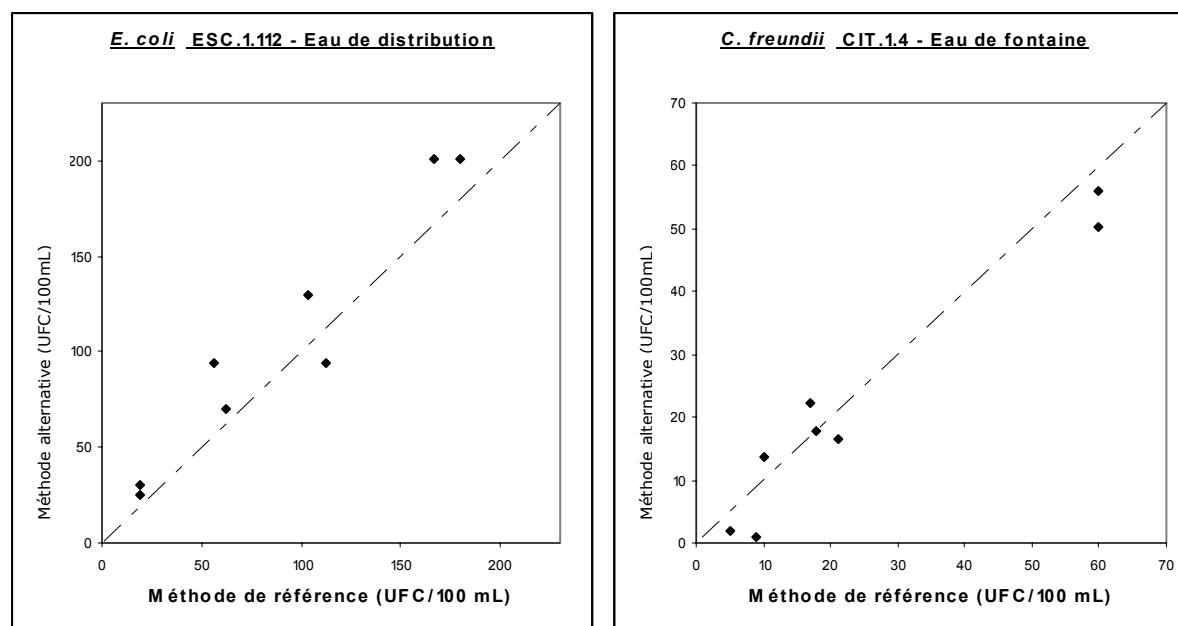


Figure 3 : graphiques bidimensionnels pour la linéarité avec les couples *Escherichia coli* ESC.1.112 / Eau de distribution et *Citrobacter freundii* CIT.1.4 / eau de fontaine

2.2.3. Exploitation statistique

Les interprétations statistiques sont réalisées conformément aux exigences de la norme NF ISO 16140.

Le choix de la méthode de régression linéaire se fait par rapport à la valeur de la robustesse du rapport R des écart-types de répétabilité globale :

-si $Rob.R > 2$, une régression linéaire par les moindres carrés (OLS 1) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode de référence,

- si Rob.R <0,5, une régression linéaire par les moindres carrés (OLS 2) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode alternative,
- si $0,5 < \text{Rob.R} < 2$, une régression orthogonale (GMFR) est utilisée avec l'axe des x pour la méthode de référence.

Couple Souche / matrice	Rob. R	Régression utilisée	F critique	Rob. F	P (Rob.F)	Coefficient de corrélation (r)	Droite de régression
<i>E. coli</i> / Eau de distribution	2,565	GMFR	6,94	2,755	0,177	0,991	Alt.= 1,099 Réf. + 6,935
Coliformes / Eau de fontaine	0,929	GMFR	6,94	3,976	0,112	0,987	Alt.= 0,919 Réf. - 0,529

Tableau 5 : données statistiques des couple souche / matrice

La relation entre les 2 méthodes n'est pas linéaire :

- si Rob.F > F critique
- ou
- si $P(\text{Rob.F}) < \alpha (=0.05)$

2.2.4. Conclusion

La relation entre les deux méthodes, pour les couples matrices / souches testés, est linéaire. Les coefficients de corrélation sont également satisfaisants. La linéarité de la méthode alternative est satisfaisante.

2.3. Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

Le niveau critique est défini comme la plus petite quantité qui peut être détectée (non nulle), mais non quantifiée comme une valeur exacte.

La limite de détection est définie comme le niveau supérieur au niveau critique.

La limite de quantification est définie comme la plus petite quantité d'analyte qui peut être mesurée et quantifiée avec une exactitude et une fidélité définies dans les conditions expérimentales.

2.3.1. Protocole d'essais

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées en analysant une culture pure de la souche d'*Escherichia coli* ESC.1.112 et une culture pure de la souche de *Citrobacter freundii* CIT.2.2 par la méthode alternative.

Quatre niveaux de contamination, avec six répétitions pour chaque niveau, ont été étudiés dans de l'eau stérilisée.

2.3.2. Résultats

La synthèse des résultats est présentée dans les tableaux suivants. La limite critique (LC), la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été calculées à partir des valeurs obtenues pour le niveau 0,5. Les valeurs S_0 et X_0 représentent le biais de la méthode.

Niveau (UFC/100mL)	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type (S_0)	Biais (X_0)
0	0	0	0
0,25	0	0	0
0,5	2	0,516	0
1	6	0,516	1

Tableau 8 : données (S_0 et X_0) pour le dénombrement d'*Escherichia coli*.

	Formules	Valeur obtenue
Niveau critique (LC)	$1,65 S_0 + X_0$	0,85
Limite de détection (LOD)	$3,30 S_0 + X_0$	1,70
Limite de quantification (LOQ)	$10,00 S_0 + X_0$	5,16

Tableau 9 : valeurs obtenues pour le dénombrement d'*Escherichia coli*

Niveau (UFC/100mL)	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type (S₀)	Biais (X₀)
0	0	0	0
0,25	0	0	0
0,5	3	0,548	0,5
1	6	0,516	1

Tableau 10 : données (S₀ et X₀) pour le dénombrement des coliformes.

	Formules	Valeur obtenue
Niveau critique (LC)	$1,65 S_0 + X_0$	1,40
Limite de détection (LOD)	$3,30 S_0 + X_0$	2,31
Limite de quantification (LOQ)	$10,00 S_0 + X_0$	5,98

Tableau 11 : valeurs obtenues pour le dénombrement des coliformes.

2.3.3. Conclusion

La limite de détection et la limite de quantification de la méthode alternative sont satisfaisantes.

2.4. Spécificité / sélectivité

La spécificité est définie comme la capacité de la méthode à mesurer avec exactitude un analyte donné, ou sa quantité dans l'échantillon sans interférences avec les composants non cibles. La sélectivité est définie comme la capacité de la méthode à mesurer l'analyte recherché exclusivement.

2.4.1. Protocole d'essais

Cinquante souches cibles (dont vingt souches d'*Escherichia coli*) et trente souches non cibles (provenant des collections nationale, internationale et interne à l'ISHA) ont été analysées. Les essais ont été réalisés selon le protocole de la méthode alternative.

Les taux de contaminations utilisés pour l'inclusivité sont compris entre 30 et 100 UFC/100mL et sont 10³ à 10⁵ fois supérieur au taux de détection de la méthode alternative (environ 10⁴ UFC/ 100mL) en ce qui concerne l'exclusivité.

2.4.2. Résultats

Sur les trente souches de coliformes testés, vingt-cinq sont détectées par la méthode alternative.

Les cinq souches de coliformes non détectées par la méthode alternative ne sont pas détectées ou ne sont pas caractéristiques sur le milieu de la méthode de référence (milieu TTC-Tergitol).

Une seule souche d'*Escherichia coli* sur les vingt testées n'est pas détectée par la méthode alternative. Toutefois cette souche n'est également pas détectée par la méthode de référence.

Les identifications réalisées sur les souches ayant donné un résultat discordant confirment l'identité des espèces testées.

Sur les trente souches non cibles testées, aucune réaction croisée n'a été observée avec la méthode alternative.

2.4.3. Conclusion

La spécificité et la sélectivité de la méthode alternative sont satisfaisantes.

2.5. Praticabilité

La praticabilité est étudiée en renseignant les 13 critères définis par le Bureau Technique.

1- Mode de conditionnement des éléments de la méthode

Le réactif Colilert[®]-18 est conditionné en capsules individuelles hermétiques.

Le Quanti-Tray[®] est conditionné par 10 en sac plastique stérile.

2- Volume des réactifs

Les cartons de Colilert[®]-18 sont conditionnés par 20 ou 200 capsules de réactif.

3- Conditions de stockage des éléments

La température de stockage des Colilert[®]-18 est comprise entre 2 et 25 °C.

La température de stockage des Quanti-Tray[®] est comprise entre 4 et 30°C.

4- Modalités d'utilisation après première utilisation

Chaque Quanti-Tray[®] et chaque capsule de Colilert[®]-18 sert à une analyse unique et ne doit pas être réutilisé.

5- Equipements ou locaux spécifiques nécessaires

Un Quanti-Tray[®] Sealer model 2X et une lampe à UV de 365 nm de longueur d'onde sont nécessaires.

6- Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer

Il n'y a pas de réactif à reconstituer.

7- Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode

L'utilisation de la méthode Colilert[®]-18/Quanti-Tray[®] ne nécessite pas de formation spécifique. La durée de formation est estimée à une 1 heure.

8- Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique

La durée d'une filtration par la méthode NF EN ISO 9308-1 est d'environ 1,5 min en utilisant des unités de filtration jetables et de 3,5 min en utilisant des unités de filtration non jetables.

La durée d'utilisation de la méthode Colilert[®] -18 / Quanti-Tray[®] est d'environ 2 min (temps comprenant : le temps d'attente de dissolution du Colilert[®] -18 et le temps pour sceller les Quanti-Tray[®]).

9- Délai d'obtention des résultats

Le délai d'obtention des résultats pour la méthode Colilert[®] -18 / Quanti-Tray[®] est de 22 heures.

Le délai d'obtention des résultats pour la méthode NF EN ISO 9308-1 est de 48 heures (dénombrement : 24 heures et confirmation : 24 heures), voire 72 heures lorsque les colonies sont douteuses après 24 heures d'incubation.

10- Type de qualification de l'opérateur

Niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence.

11- Etapes communes avec la méthode de référence

Aucune.

12- Traçabilité des résultats d'analyse

Aucune procédure de traçabilité n'est proposée. Le laboratoire doit utiliser ses procédures internes.

13- Maintenance par le laboratoire

Sans objet.

2.6. Conclusions de l'étude comparative des méthodes

La linéarité et l'exactitude relative de la méthode Colilert[®] -18 / Quanti-Tray[®] pour le dénombrement des *Escherichia coli* à β -D-glucuronidase positive et des coliformes à β -galactosidase positive sont satisfaisantes.

Le biais entre les deux méthodes est acceptable. Les limites de détection et de quantification de la méthode sont satisfaisantes.

La méthode Colilert[®] -18 / Quanti-Tray[®] pour le dénombrement des *Escherichia coli* à β -D-glucuronidase positive et des coliformes à β -galactosidase positive est spécifique et sélective.

3. Etude collaborative

3.1. Mise en œuvre de l'étude collaborative

3.1.1. Laboratoires collaborateurs

L'étude collaborative a été réalisée par treize laboratoires collaborateurs.

3.1.2. Vérification de l'absence de coliformes dans la matrice

L'absence de coliformes avant la contamination artificielle a été vérifiée dans l'eau utilisée en utilisant la méthode de référence.

3.1.3. Stabilité des souches dans la matrice eau

La stabilité d'une souche d'*Escherichia coli* dans l'eau de distribution a été évaluée sur 3 jours à $(4\pm 2)^\circ\text{C}$. Cette souche (codée ESC.1.131) est issue d'un environnement aquatique. Les résultats des dénombrements sur milieu TTC-tergitol après filtration de 100 mL d'eau contaminée sur membrane sont présentés dans le tableau 12.

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
J0	2	64	100
J1	12	65	120
J2	8	66	100

Tableau 12 : résultats des dénombrements en UFC/100 mL des souches d'*Escherichia coli* dans l'eau entre J0 et J2 par la méthode de référence

3.1.4. Préparation et inoculation des échantillons

La matrice est inoculée avec la souche choisie selon le protocole des petits nombres. Quatre niveaux de contamination ont été testés :

- niveau 0 : 0 UFC / 100 mL,
- niveau 1 : de 1 à 10 UFC / 100 mL,
- niveau 2 : de 10 à 50 UFC / 100 mL,
- niveau 3 : de 50 à 200 UFC / 100 mL

La matrice a été répartie à raison de 220 mL dans des flacons stériles à capuchon étanche. Chaque flacon a été inoculé individuellement et homogénéisé. Huit échantillons par laboratoire ont été préparés, répartis en 4 niveaux de contamination, avec 2 échantillons par niveau. Chaque laboratoire a reçu 8 échantillons à tester et un échantillon pour quantifier la flore endogène de la matrice.

Les taux de contamination théoriques et réels sont présentés dans le tableau 13.

Niveau	Flore totale (UFC/mL)	<i>Escherichia coli</i> ESC.1.131 (UFC/100 mL)	
		Taux cible	Taux réel
0	<1	0	0
1		1 à 10	12
2		10 à 50	64
3		50 à 200	120

Tableau 13 : dénombrements des inoculi d'ESC.1.131 dans l'eau de distribution et de la flore totale

Des tests d'homogénéité ont été réalisés sur dix échantillons pour les taux 1, 2 et 3 à J0 et à J1. Le coefficient de variation calculé est inférieur à 15% pour chaque taux.

3.1.5. Etiquetage des échantillons

L'étiquetage des flacons comportait un code permettant d'identifier le laboratoire (de A à M) et un code permettant d'identifier chaque échantillon, connu uniquement du laboratoire expert. Le codage est présenté dans le tableau 14. Les échantillons et les témoins température ont été stockés à 4°C avant expédition.

Taux (UFC / 100 mL)	Code échantillon
0	3 / 4
1 - 10	1 / 8
10 - 50	2 / 5
50 - 200	6 / 7

Tableau 14 : Codes échantillon attribués à chaque niveau de contamination

3.1.6. Expédition des échantillons

Les échantillons ont été expédiés dans un kit froid le 14 septembre 2009.

3.1.7. Réception et analyse des échantillons

Les colis ont été livrés en moins de 24 heures pour les 13 laboratoires collaborateurs.

La température du pot témoin a été prise dès réception du colis et le thermobouton expédié au laboratoire expert pour la lecture des données. Les échantillons ont été analysés dans la journée (15 septembre 2009). Le laboratoire expert a analysé, en parallèle, une série d'échantillons dans les mêmes conditions avec la méthode alternative et la méthode de référence. Les laboratoires ont reçu une semaine avant les échantillons des instructions détaillées concernant la mise en œuvre des analyses.

3.2. Résultats

3.2.1. Température et état des échantillons à réception

Les relevés de température et l'état des échantillons à réception sont consignés dans le tableau 15.

Laboratoire	Température	Etat des échantillons
A	8,2°C	Bon
B	6,5°C	Bon
C	3,5°C	Bon
D	3,0°C	Bon
E	3,1°C	Bon
F	3,3°C	Bon
G	6,0°C	Bon
H	4,4°C	Bon
I	5,4°C	Bon
J	3,9°C	Bon
K	11,9°C	Bon
L	3,5°C	Bon
M	5,2°C	Bon

Tableau 15 : température et état des échantillons lors de la réception par les laboratoires

Les relevés de température sont inférieurs à 8,4°C pour tous les laboratoires à l'exception du laboratoire K pour lequel la mesure de la température est de 11,9°C à réception du colis. Cependant la sonde de température indique une température moyenne de 3,0°C entre l'envoi et l'ouverture du colis. Les données de ce laboratoire sont donc prises en compte dans l'analyse des résultats.

L'analyse des profils thermiques des thermoboutons est présentée dans le tableau 16.

Laboratoire		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Température (°C)	Moyenne	3,0	2,3	2,9	2,5	3,5	3,2	2,8	3,3	2,9	3,4	3,0	3,3	2,8
	Ecart-type	0,7	1,2	0,6	0,5	0,5	0,7	0,7	0,5	0,6	0,3	0,5	0,8	0,8

Tableau 16 : données des thermoboutons pour la durée de transport des échantillons

L'analyse des profils thermiques des thermoboutons montre pour l'ensemble des laboratoires des températures moyennes comprises entre 2,3 et 3,5°C.

3.2.2. Dénombrement de la flore totale

Pour l'ensemble des laboratoires, les dénombrements des microorganismes revivifiables à 22°C indiquent des résultats inférieurs à 1 UFC/mL et ceux des microorganismes revivifiables à 36°C varient entre <1 et 1 UFC/mL.

3.2.3. Résultats des laboratoires expert et collaborateurs

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 17. Les résultats de la méthode de référence sont présentés pour une lecture des boîtes de Petri après 48 heures d'incubation à (37±1)°C.

La lecture des puits de la méthode alternative a montré une équivalence du nombre de puits jaune et fluorescents pour chaque échantillon.

Les résultats de la méthode alternative sont donc présentés pour une lecture des puits jaunes et fluorescents après une incubation de 18 heures à (37±1)°C.

Les données des laboratoires A et G ont été exclues de l'analyse finale des résultats :

- pour le laboratoire A, les résultats de la lecture des puits fluorescents n'ont pas été reportés sur la feuille de résultats.
- pour le laboratoire G, les boîtes de TTC-tergitol supérieures à 100 UFC n'ont pas été dénombrées.

Dans les deux cas, les laboratoires ont été contactés dès la réception de leurs résultats pour une deuxième lecture, mais les boîtes de Petri et les Quanti-Tray avaient déjà été éliminés.

Laboratoire	Niveau 0				Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3			
	MR		MA		MR		MA		MR		MA		MR		MA	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
A*	<1	<1	0	0	8	12	12	16	32	40	41	89	130	110	165	>201
B	<1	<1	0	0	5	10	9	10	39	29	53	36	110	110	>201	130
C	<1	<1	0	0	19	10	18	14	72	52	62	53	140	140	145	118
D	<1	<1	0	0	10	8	14	11	65	64	95	78	110	120	201	145
E	<1	<1	0	0	14	12	10	14	67	66	48	78	150	120	201	201
F	<1	<1	0	0	14	11	15	11	52	56	34	50	80	78	50	50
G	<1	<1	0	0	11	8	14	11	66	65	62	59	>100	>100	144	130
H	<1	<1	0	0	9	6	8	3	30	50	62	89	70	90	130	130
I	<1	<1	0	0	9	13	12	9	55	51	56	59	130	140	145	130
J	<1	<1	0	0	4	11	15	8	33	44	89	50	89	90	130	201
K	<1	<1	0	0	9	12	18	11	53	54	66	62	130	130	118	>201
L	<1	<1	0	0	13	9	9	8	46	65	59	74	130	110	>201	130
M	<1	<1	0	0	15	8	9	12	45	52	59	48	90	74	118	165
Expert	<1	<1	0	0	5	12	11	8	69	60	74	83	130	100	201	165

Tableau 17 : résultats des dénombrements en UFC/100 mL (MR) et NPP/100 mL (MA) des *Escherichia coli* (MR : méthode de référence, MA : méthode alternative, R1 et R2 : répétitions 1 et 2, * : résultats des puits jaunes uniquement)

3.3. Interprétation statistique

Les données présentées dans les paragraphes suivants ont été calculées à partir des résultats en UFC/100 mL et en NPP/100 mL, de la même façon que la présentation des résultats de l'étude préliminaire.

3.3.1. Calcul du biais

Le tableau 18 représente la valeur cible, la moyenne, l'écart-type de fidélité, le biais relatif et le biais de chaque niveau de contamination.

Niveaux	Bas	Moyen	Haut
Valeur cible	10,000	52,000	112,000
Moyenne niveau	11,227	61,227	147,318
Ecart-type de fidélité (sFI)	3,634	16,974	46,112
Coefficient intermédiaire	1,028	1,030	1,031
Nombre de degrés liberté	19,182	18,125	17,643
Biais relatif	0,123	0,177	0,315
Biais	1,123	1,177	1,315

Tableau 18 : calculs du biais de la méthode alternative

La justesse est estimée par le biais qui varie entre 1,123 et 1,314 UFC/100 mL.

3.3.2. Profils d'exactitude

Le tableau 19 présente les valeurs de tolérance et les limites de tolérance de la méthode alternative pour une valeur de probabilité de tolérance de 80% et une valeur de limite d'acceptabilité de 90%. La figure 3 présente le tracé de ce profil d'exactitude.

Probabilité de tolérance	Limite d'acceptabilité	Niveaux	Bas	Moyen	Haut
80%	90%	Valeur basse tolérance	6,268	37,968	84,015
		Valeur haute tolérance	16,187	84,487	210,621
		Limite basse tolérance (différence)	63%	73%	75%
		Limite haute tolérance (différence)	162%	162%	188%
		Limite d'acceptabilité basse	10%	10%	10%
		Limite d'acceptabilité haute	190%	190%	190%

Tableau 19 : valeurs et limites de tolérances pour une probabilité de tolérance de 80% et une limite d'acceptabilité de 90%

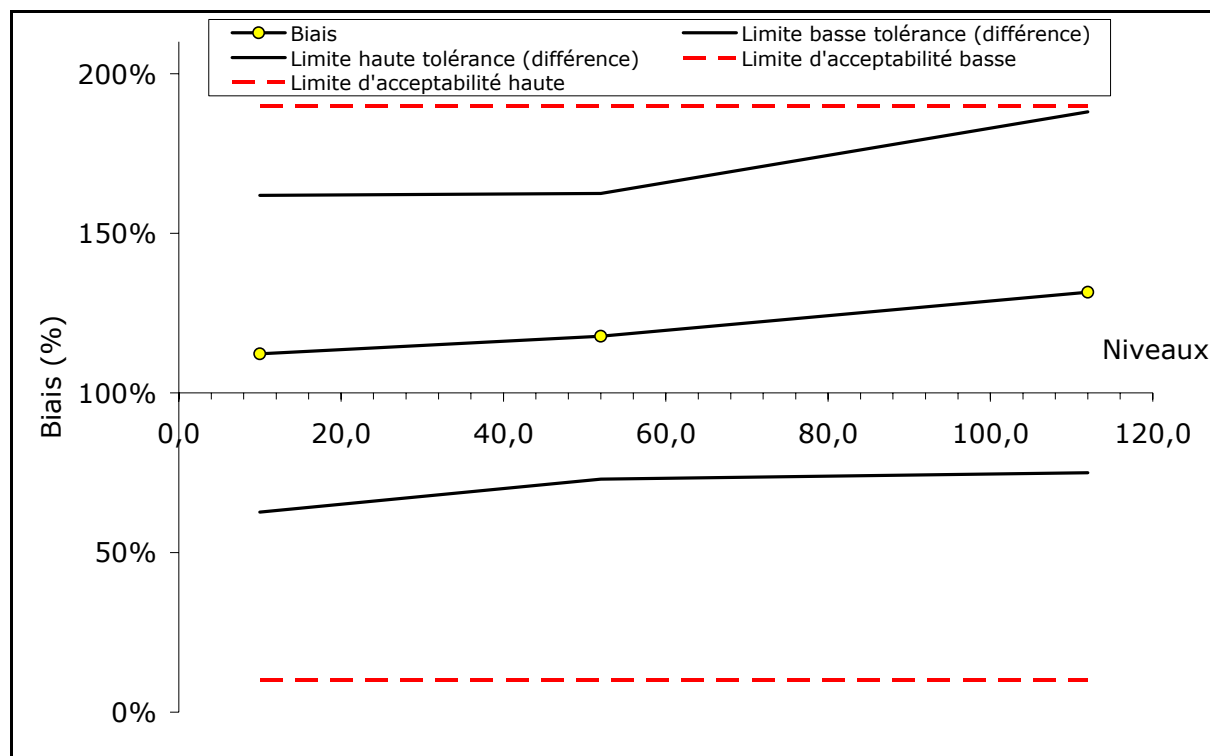


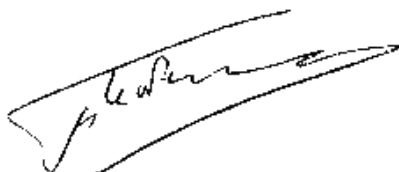
Figure 3 : profil d'exactitude de la méthode alternative avec une probabilité de tolérance (β) de 80% et une limite d'acceptabilité de 90%

Le biais de la méthode alternative augmente légèrement du faible niveau de contamination au fort niveau de contamination. Il passe en effet de 1,123 à 1,177 puis à 1,315 UFC/100 mL.

Pour tous les niveaux de contaminations, les limites de tolérance sont comprises entre les limites d'acceptabilité, ce qui signifie qu'au moins 80% des résultats obtenus seront compris entre les limites d'acceptabilité définies.

3.4. Conclusion

Le profil d'exactitude obtenu à partir des résultats de la méthode de référence et de la méthode alternative montre que le biais de la méthode Colilert®-18 avec Quanti-Tray® pour le dénombrement des *Escherichia coli* à β -glucuronidase positive et des coliformes à β -galactosidase positive dans les eaux de consommation humaine est acceptable. Les limites de tolérances de la méthode alternative pour une probabilité de tolérance de 80% sont comprises dans les limites d'acceptabilité de 90%.



Fait à Massy, le 03 mars 2010
François Le Nestour
Ingénieur de recherche

Annexe 1

Méthode alternative

Méthode alternative

Etape 1 :

Ajouter le réactif Colilert® 18 à un échantillon d'eau de 100mL à température ambiante.

Agiter jusqu'à dissolution du réactif.

Verser le mélange dans un Quanti-Tray®.

Etape 2 :

Sceller à l'aide du Quanti-Tray® Sealer.

Etape 3 :

Incuber à (36 ± 2) °C pendant 18 à 22 heures.

Etape 4 :

Compter le nombre de puits jaunes et se reporter à la table des NPP pour les coliformes.

Vérifier si les puits jaunes sont fluorescents grâce à une lampe à UV de longueur d'onde=365nm, dans une chambre noire. Compter les puits jaunes et fluorescents puis se reporter à la table des NPP pour le dénombrement des *Escherichia coli*.

Etape 5 :

Expression des résultats :

Nombres de coliformes /100mL d'eau et nombres d'*Escherichia coli* /100mL d'eau.

Annexe 2

Méthode de référence

Méthode de référence

Filtration sur membrane et incubation :

Filtrer 100mL d'échantillon sur membrane stérile
Placer la membrane sur TTC tergitol



Incuber à (36 ± 2) °C pendant (21 ± 3) heures
Et pendant (24 ± 2) heures de plus si les colonies ne sont pas
caractéristiques



Lecture et Confirmation

Les colonies caractéristiques sont les bactéries lactose positives.
A partir de 10 colonies isolées, effectuer les tests de confirmation :
Oxydase et production d'indole



Expression des résultats :

Nombres de coliformes et *Escherichia coli* / 100mL d'échantillon