



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

ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE D'ANALYSE

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

N° attestation : 3M 01/10 – 02/12

**Date de validation : 09.02.2012
Fin de validité : 09.02.2016**

La Société
3M Health Care
Food Safety Department
2501 Hudson Road, Building
275 5W 05
MN 55144-IWO
St Paul USA

Site de Production: 3M Health Care
3M Brookings
601 22nd Ave South
South Dakota
57006 USA

Représentée par: 3M France
Boulevard de l'Oise
95006 Cergy Cedex
France

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

3M™ Petrifilm™ Aqua CC

Dénombrement des coliformes

et de *Escherichia coli*

Référence du protocole : 34-8709-8505-7.

DOMAINE D'APPLICATION : Eaux de consommation humaine à l'exception des eaux de réseau de distribution chlorées

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : Aucune

METHODE DE REFERENCE :

Norme NF EN ISO 9308-1 (2000) : Détection et numération des *Escherichia coli* et des coliformes-Partie 1 : méthode par filtration sur membrane.


La Directrice Générale
Florence Méaux

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode 3M™ Petrifilm™ Aqua CC est un milieu gélosé prêt à l'emploi contenant des agents sélectifs (cristal violet et sels biliaires), un agent gélifiant et un indicateur au tétrazolium pour faciliter le dénombrement des colonies. Les colonies rouges avec gaz sont des coliformes confirmés. Les colonies rouges sans gaz sont des coliformes présumés. Pour la numération des *E. coli* ainsi que pour la confirmation des coliformes présumés (colonies rouges sans gaz), les colonies rouges avec ou sans gaz ayant poussé sur le test Petrifilm doivent être confirmées. La confirmation des colonies caractéristiques, rouges présentes avec ou sans gaz, peut se faire soit :

- Par le protocole de confirmation avec les tests biochimiques de la méthode de référence (détermination de l'activité oxydase et production d'indole)
- Par isolement sur test Petrifilm *E. coli* / coliformes:

LINEARITE et EXACTITUDE relative

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

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2011. L'exploitation statistique a porté sur 44 résultats exploitables pour le paramètre « coliformes » et 40 résultats exploitables pour le paramètre « *E. coli* », provenant de 94 échantillons, appartenant aux catégories d'eaux suivantes :

- Eaux embouteillées
- Eaux de fontaine
- Eaux de puits
- Eaux de forage

Aucun échantillon naturellement contaminé n'a été analysé du fait de la faible prévalence d'échantillons naturellement contaminés. Les échantillons ont donc été artificiellement contaminés avec des souches cibles stressées. Le domaine d'application de la méthode ne concerne que des eaux non traitées chimiquement, seuls des stress thermiques (chauds et/ou froids) ont été pratiqués.

Les taux de contamination couvrent l'ensemble de la gamme de mesure de la méthode alternative.

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

L'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence a été établie pour chaque couple matrice / souche, sur le modèle $y = bx + a$, y représentant la méthode alternative (Alt) et x la méthode de référence (Ref).

Le **biais (D)** entre les deux méthodes (alternative – référence) a été calculé en prenant la médiane des valeurs de différence par niveau. Les résultats obtenus sont les suivants :

Couple matrice/souche	Biais (D) médian (UFC)	Droite de régression Alt = b.Ref + a
Coliformes / eaux embouteillées	-0.500	Alt = 1,048 Ref - 1.936
<i>E. coli</i> / eaux embouteillées	0.500	Alt= 1.028 Ref +0.331
Coliformes / eaux non embouteillées	0.750	Alt = 0,975 Ref +1.541
<i>E. coli</i> / eaux non embouteillées	-0.500	Alt = 0.957 Ref + 1.408

Conclusion pour l'exactitude

L'hypothèse $[a=0 \text{ et } b=1]$ est acceptée pour toutes les catégories de couples matrice / souche. Les biais entre les deux méthodes sont compris entre -0,500 et 0,500 UFC/250mL pour les eaux embouteillées et entre -0,500 et 0,750 UFC/100 mL pour les eaux non embouteillées.

L'exactitude relative entre les deux méthodes est satisfaisante.

Etude de linéarité

Des essais ont été effectués en 2011 sur les couples matrice/souche figurant dans le tableau ci-dessous. Pour chaque couple matrice/souche, les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes** (référence et alternative), aux 4 niveaux de contamination artificielle suivants :

Souche	Matrice	Taux de contamination cible (UFC/100mL ou/250mL pour les eaux embouteillées)
<i>Citrobacter freundii</i> CIT.1.4	Eau minérale	10-30-50-100
<i>Escherichia coli</i> ESC.1.112	Eau de source	
<i>Citrobacter freundii</i> CIT.1.4	Eau de fontaine	
<i>Escherichia coli</i> ESC.1.112	Eau de puits	

Les résultats obtenus sont les suivants :

Couple matrice/souche	Droite de régression	r
Coliformes / Eau minérale	Alt = 0,937 Ref + 10.079	0,998
<i>E. coli</i> / Eau de source	Alt = 1,063 Ref + 2.260	0,998
Coliformes / Eau de fontaine	Alt = 0,915 Ref + 9.826	0,997
<i>E. coli</i> / Eau de puits	Alt = 1,053 Ref -2.087	1,000

Conclusion pour la linéarité

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

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

Mise en œuvre de la méthode alternative seule

Une culture pure d'une souche d'*E. coli* ESC1.120 et une culture pure de la souche *Citrobacter freundii* CIT.1.5 ont été analysées par la méthode alternative, à quatre niveaux de contamination, avec six répétitions pour chaque niveau, dans de l'eau stérilisée.

Les valeurs obtenues sont les suivantes:

Formule	<i>E. coli</i>	Coliformes
	UFC/100 mL	UFC/100 mL
$1,65s_0 + x_0$ pour $\alpha = 5\%$ (et $1 - \beta = 50\%$)	1.33	1.85
$3,3s_0 + x_0$ pour $\alpha = 5\%$ (et $1 - \beta = 95\%$)	2.15	2.70
$10s_0 + x_0$	5.50	6.16

Où :

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

Conclusion

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

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en œuvre de la méthode alternative seule

Tests d'inclusivité

Les tests ont porté sur 50 souches cibles, dont **20 souches d'*E. coli*** et **30 souches de coliformes (non *E. coli*)**.

- Les 20 souches d'*E. coli* testées ont été détectées par la méthode alternative.
- Les 30 souches de coliformes ont été détectées par la méthode alternative

Tests d'exclusivité

- Sur les 30 souches non coliformes testées, 26 n'ont pas montré de réactions croisées avec la méthode alternative. Des réactions croisées ont été observées :
 - avec une souche de *Providencia stuartii* dont la confirmation est également positive par la méthode de référence. Sur milieu gélosé TCC-Tergitol, cette souche présente des colonies orange foncé sans décoloration du milieu, donc non caractéristiques.
 - Avec 3 souches d'entérobactéries (*Shigella flexneri*, *Salmonella diarizonae* et *Proteus mirabilis*) qui ont montré des colonies caractéristiques sur Petrifilm AQCC (rouges sans gaz), confirmées avec les deux méthodes. Ces souches ont un profil non caractéristique sur milieu TTC-Tergitol (colonies orange à rouge sans décoloration du milieu). Une autre souche de *Shigella* et trois autres souches de *Salmonella* ont été testées selon le même protocole et un résultat similaire a été obtenu.

Du fait du principe utilisé, la méthode met en évidence des bactéries lactose négatives mais β -galactosidase positives.

Les résultats d'essais supplémentaires avec des souches sauvages de *Proteus* et de *Providencia*, confirment que des souches d'entérobactéries ne fermentant pas le lactose et ne possédant pas de β -galactosidase peuvent être dénombrées en tant que coliformes.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seule

- Délai d'obtention des résultats :

	Méthode alternative	Méthode de référence
Dénombrement	22 +/- 2h	24h
Confirmation	24h ou 48h en fonction de la modalité choisie	24h voire 72h lorsque les colonies sont douteuses après 24 heures d'incubation

ETUDE INTERLABORATOIRES

Une étude interlaboratoires a été réalisée en 2012, avec 13 laboratoires collaborateurs. La matrice utilisée était de l'eau minérale embouteillée, contaminée artificiellement avec une souche de *E. coli* ESC 1.131, issue d'un environnement aquatique, aux 4 taux de contamination suivants : 0, 1 à 10, 10 à 50, et 50 à 150 UFC/250mL.

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

Les données de 4 laboratoires ont été exclues de l'interprétation finale en raison de problèmes de manipulation, de non respect du protocole ou de valeurs aberrantes.

Calcul des écarts-types de fidélité par niveau de concentration

Pour chaque niveau de concentration, les écarts-types de répétabilité, inter-séries et de reproductibilité ont été calculés à partir des répétitions de la méthode alternative, selon le principe de la norme ISO 5725-2.

Les critères de fidélité et de justesse par niveau figurent dans le tableau suivant. Les résultats sont exprimés en UFC/250mL :

Niveau de concentration	Bas	Moyen	Haut
Concentration cible théorique moyenne	15	67.500	97.00
Concentration retrouvée moyenne	14.444	62.500	93.944
Écart-type de fidélité	2.055	12.818	17.346
Coefficient intermédiaire	1.027	1.033	1.045
Nombre de degrés de liberté	16.941	15.737	11.206
Biais relatif	-0.037	-0.074	-0.32
Biais	0.963	0.926	0.968

Calcul de l'intervalle de tolérance

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

La méthode proposée par Mee [Mee, 1984] a été choisie pour ce protocole. Le calcul se fait à partir des données obtenues avec la méthode alternative pour chaque niveau de concentration. La valeur choisie pour β doit être au moins de 90%.

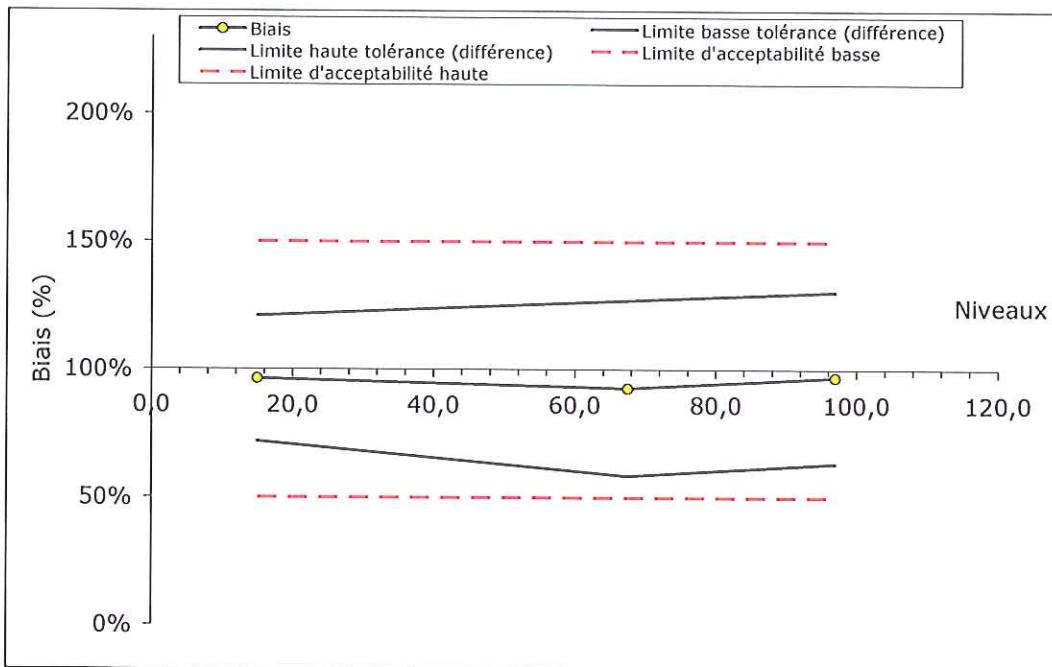
Le tableau suivant rassemble les calculs des limites des intervalles de tolérance par niveau, pour une probabilité de tolérance $\beta=90\%$ et une valeur de limite d'acceptabilité de 50% (correspondant à 0,3 en log)

Niveaux	Bas	Moyen	Haut
Valeur basse tolérance	10.771	39.347	61.439
Valeur haute tolérance	18.118	85.653	126.450
Limite basse tolérance (différence)	72%	58%	63%
Limite haute tolérance (différence)	121%	127%	130%

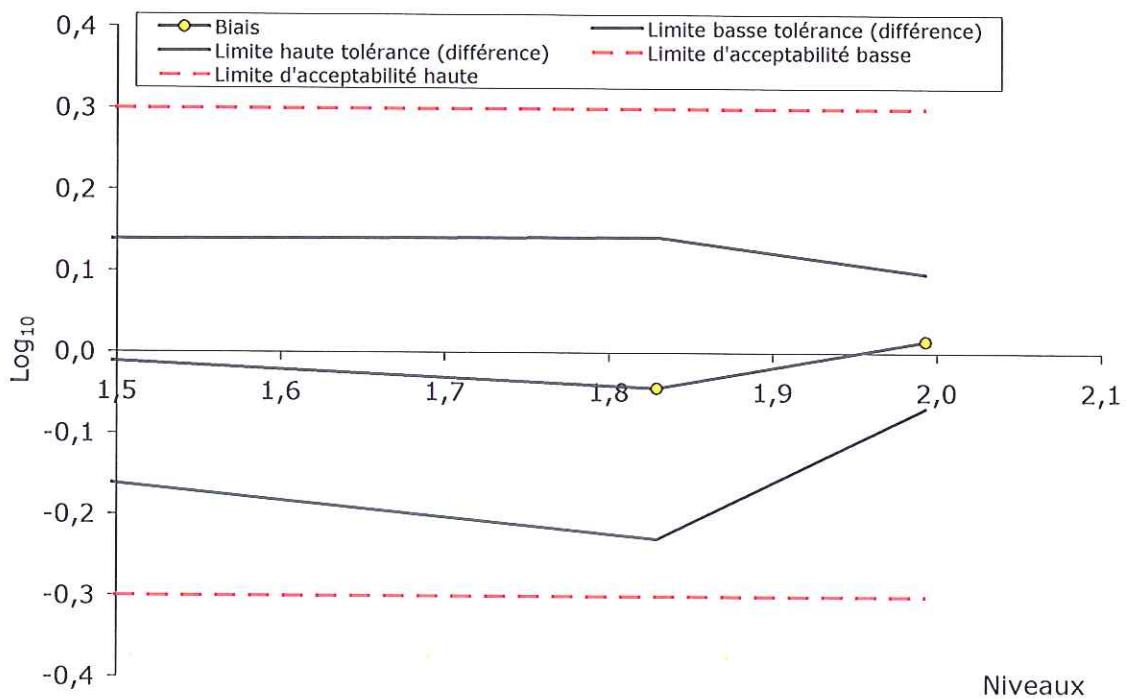
Limite d'acceptabilité basse	50%	50%	50%
Limite d'acceptabilité haute	150%	150%	150%

Construction du profil d'exactitude

Les données sélectionnées dans les tableaux précédents ont été reportées sur un graphique pour construire le profil d'exactitude suivant :



Une autre représentation graphique du profil avec des valeurs transformées en log est présentée ci-dessous.



Interprétation des résultats

L'axe horizontal du graphique représente la concentration théorique des niveaux, exprimé en UFC dans le premier graphique et log (UFC) pour le deuxième. L'axe vertical représente la différence entre la concentration théorique et la concentration retrouvée, soit le biais absolu. Cette valeur est exprimée en % d'UFC dans le premier graphique et en log (UFC) dans le second.

Les limites des intervalles de tolérance définissent un domaine où se situe une proportion $\beta=90\%$ de futurs résultats.

Ensuite, le profil d'exactitude peut être comparé à un **intervalle d'acceptabilité**, défini en fonction de l'objectif de la méthode. Les limites des intervalles d'acceptabilité, notées $\pm\lambda$, sont ici de 50% (correspondant à 0,3 en log). La limite d'acceptabilité λ dépend du contexte d'utilisation de la méthode et de la proportion β choisie.

Dans le domaine délimité par les traits horizontaux discontinus (λ), la méthode est capable de produire une proportion β de résultats compris entre les limites d'acceptabilité. La méthode alternative est dite valide dans tout le domaine où l'intervalle de tolérance est compris entre les limites d'acceptabilité.

Le domaine d'application représente le domaine initialement choisi pour conduire la validation.

La **limite de quantification** est définie comme le point où l'intervalle de tolérance coupe une des deux limites d'acceptabilité. C'est la limite au-delà de laquelle, le microbiologiste ne peut plus garantir un pourcentage β de résultats obtenus par la méthode alternative qui soient acceptables. Aucune limite de quantification n'a été mise en évidence dans le domaine de contamination étudié. Pour tous les niveaux de contamination, les limites de tolérance sont, en effet, comprises entre les limites d'acceptabilité, ce qui signifie qu'au moins 90% des résultats obtenus seront compris entre les limites d'acceptabilité définies de 50% (correspondant à 0,3 en log)

Conclusion

L'intervalle de tolérance est compris entre les limites d'acceptabilité pour $\lambda = 50\%$ (correspondant à 0,3 en log). La méthode alternative est valide pour tous les niveaux.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire sur le site www.afnor-validation.org