

## **MARQUE NF VALIDATION**

### **Validation AFNOR Certification de la méthode**

### **ENTEROLERT-DW / QUANTI-TRAY**

### **pour la recherche et le dénombrement des entérocoques**

*Protocole pour les eaux de consommation humaine (hors eaux embouteillées)*

## **RAPPORT DE SYNTHÈSE – NOVEMBRE 2013 – V1**

Laboratoire expert

**I. S. H. A.**  
25, avenue de la République  
91 300 MASSY  
FRANCE

Fabricant

**IDEXX Laboratories, Inc.**  
IDEXX Drive, Westbrook  
Maine 04 092  
USA

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 16 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.

## **TABLE DES MATIERES**

1. Introduction .....	3
1.1. Référentiel de validation .....	3
1.2. Méthode alternative .....	3
1.3. Domaine d'application .....	3
1.4. Méthode de référence .....	3
2. Etude comparative des méthodes .....	4
2.1. Exactitude relative .....	4
2.1.1. Nombre et nature des échantillons .....	4
2.1.2. Résultats bruts .....	4
2.1.3. Exploitation statistique .....	5
2.1.4. Conclusion .....	5
2.2. Linéarité .....	6
2.2.1. Niveaux de contamination .....	6
2.2.2. Résultats bruts .....	6
2.2.3. Exploitation statistique .....	6
2.2.4. Conclusion .....	7
2.3. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) .....	7
2.3.1. Protocole d'essai .....	7
2.3.2. Résultats .....	7
2.3.3. Conclusion .....	7
2.4. Spécificité / sélectivité .....	8
2.4.1. Protocoles d'essai .....	8
2.4.2. Résultats .....	8
2.4.3. Conclusion .....	8
2.5. Praticabilité .....	8
3. Etude interlaboratoires .....	10
3.1. Mise en œuvre de l'étude interlaboratoires .....	10
3.1.1. Laboratoires collaborateurs .....	10
3.1.2. Matrice et souche .....	10
3.1.3. Stabilité des souches dans la matrice eau .....	10
3.1.4. Préparation et inoculation des échantillons .....	10
3.1.5. Etiquetage des échantillons .....	10
3.1.6. Expédition, réception et analyse des échantillons .....	11
3.2. Résultats .....	11
3.2.1. Température et état des échantillons à réception .....	11
3.2.2. Dénombrement de la flore totale .....	11
3.2.3. Résultats des laboratoires expert et collaborateurs .....	12
3.3. Interprétation statistique .....	13
3.3.1. Calcul du biais .....	13
3.3.2. Profil d'exactitude .....	13
3. Conclusions .....	16

## **ANNEXES**

Annexe 1 : Protocole de la méthode alternative

Annexe 2 : Protocole de la méthode de référence

Annexe 3 : Souches bactériennes stressées

Annexe 4 : Résultats bruts et calculs statistiques exactitude relative

Annexe 5 : Résultats bruts et calculs statistiques linéarité

Annexe 6 : Résultats bruts et calculs statistiques LOD-LOQ

Annexe 7 : Résultats bruts sélectivité

Annexe 8 : Résultats du dénombrement des microorganismes revivifiants

Annexe 9 : Résultats des laboratoires participants

## **1. Introduction**

### **1.1. Référentiel de validation**

Ce rapport de synthèse présente les résultats de l'étude de validation sous la marque NF Validation de la méthode Enterolert-DW / Quanti-Tray développée par IDEXX pour le dénombrement des entérocoques dans les eaux de consommation humaine hors eaux embouteillées.

Cette méthode a été comparée à la méthode de référence NF EN ISO 7899-2 (août 2000) selon le protocole général d'AFNOR Certification (rév. 2 – mai 2013).

L'étude de validation a été réalisée en deux parties successives : l'étude comparative puis l'étude interlaboratoires.

L'étude préliminaire a pour but d'évaluer les performances de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence. Les caractéristiques suivantes ont été étudiées :

- l'exactitude relative,
- la linéarité,
- les limites de détection et de quantification
- la sélectivité (inclusivité et exclusivité),
- la praticabilité.

L'étude interlaboratoires a pour objectif de déterminer les performances de la méthode alternative dans plusieurs laboratoires dans les conditions réelles de son application en routine.

### **1.2. Méthode alternative**

Enterolert-DW a été conçu pour détecter les entérocoques dans des échantillons d'eau potable. Ce kit est basé sur la technologie Defined Substrate Technology (DST) brevetée d'IDEXX.

Enterolert-DW, associé au système Quanti-Tray d'IDEXX, permet d'obtenir des résultats quantitatifs et confirmés en 24 heures. Enterolert-DW utilise un nutriment, l'ortho-nitrophényl- $\beta$ -D-glucoside comme indicateur et sa formule incorpore un fond bleu spécialement conçu. Lorsque les entérocoques métabolisent le substrat, l'échantillon passe du bleu au vert indiquant ainsi qu'il est positif. Le résultat est considéré comme positif dès lors que la couleur initiale vire au vert. L'exposition aux UV n'est pas nécessaire.

Enterolert-DW détecte les entérocoques dans des échantillons d'eau potable en 24 heures.

Le protocole de la méthode alternative est présenté en annexe 1.

### **1.3. Domaine d'application**

Le domaine d'application de la méthode Enterolert-DW / Quanti-Tray concerne les eaux de consommation humaine hors eaux embouteillées.

### **1.4. Méthode de référence**

La norme ISO 7899-2 (août 2000) : « Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux – Partie 2 : méthode par filtration sur membrane » a été utilisée en tant que méthode de référence.

Le protocole de la méthode de référence est présenté en annexe 2.

## **2. Etude comparative des 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**

Une catégorie d'eaux a été testée en duplicat avec la méthode de référence et la méthode alternative.

Les différents types d'échantillons analysés sont présentés dans le tableau 1.

Dénombrement	Type d'eau	Echantillons analysés	Echantillons exploités
Entérocoques	Eaux de réseau et fontaine	56	16
	Eaux de puits, de source et de forage	22	8
	Total	78	24

**Tableau 1** : nature et nombre d'échantillons analysés

Au total, 78 échantillons ont été analysés et 24 résultats ont été exploités. Les échantillons non retenus dans l'analyse statistique correspondent à des échantillons pour lesquels des dénombrements inférieurs à 1 UFC / 100 mL ou supérieurs à 150 UFC / 100 mL ont été trouvés pour les deux réplicats des deux méthodes. Les échantillons pour lesquels un résultat inférieur à 4 UFC / 100 mL pour au moins un des réplicats est obtenu sont présentés dans les résultats bruts mais ne sont pas pris en compte dans l'exploitation statistique des résultats.

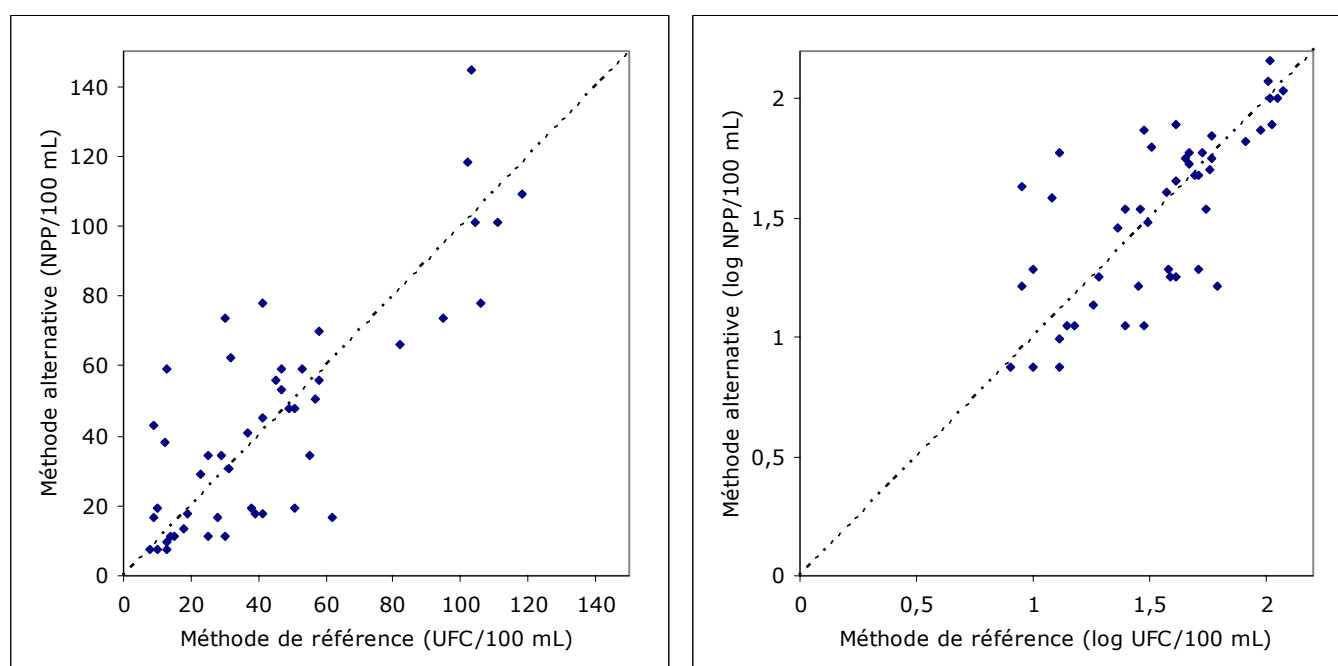
Aucun échantillon naturellement contaminé n'a été analysé. Les échantillons ont donc été artificiellement contaminés.

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

Les stress appliqués et les souches utilisées sont présentés en annexe 3.

#### **2.1.2. Résultats bruts**

Les résultats bruts et les calculs statistiques sont résumés dans les tableaux 2 et 3 et en annexe 4. La figure 1 représente les graphiques bidimensionnels pour la catégorie testée. L'axe y est réservé à la méthode alternative et l'axe x à la méthode de référence. La représentation d'une droite d'équation «  $y=x$  » figure en pointillés sur les figures.



**Figure 1** : graphiques bidimensionnels représentant les résultats bruts de l'étude de justesse (en UFC / 100 mL et en log UFC / 100 mL)

### 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.

Données	Rob.R	Régression utilisée	T critique	a	t(a)	b	t(b)	Probabilités (%)	
								Ordonnée à 0	Pente à 1
Brutes	0,892	GMFR	2,064	-1,770	0,717	1,059	0,650	36,5	45,7
Log	1,319	GMFR	2,064	-0,118	0,735	1,073	0,645	34,0	46,4

**Tableau 2 :** données statistiques pour le dénombrement des entérocoques dans la catégorie « eaux de consommation humaine »

Données	Biais (D)		Répétabilité			
	Moyen	Médian	r		rob. r	
			MR	MA	MR	MA
Brutes	0,798	1,900	20,508	28,425	19,080	17,025
Log	-0,007	0,014	0,315	0,250	0,207	0,274

**Tableau 3 :** biais et répétabilité des deux méthodes

### 2.1.4. Conclusion

L'équation de la droite de régression du couple « entérocoques – eaux de consommation humaine » est la suivante :  $Alt = 1,059 \text{ Réf} - 1,770$  ou  $\log Alt = 1,073 \log \text{ Réf} - 0,118$

L'hypothèse [ $a=0$  et  $b=1$ ] est acceptée pour la catégorie testée. Le biais entre les deux méthodes est de 1,900 pour les données brutes ou de 0,014 en log.

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**

Le couple matrice / souche est présenté dans le tableau 4. Pour ce couple, quatre niveaux de contaminations ont été testés en double par la méthode de référence et la méthode alternative.

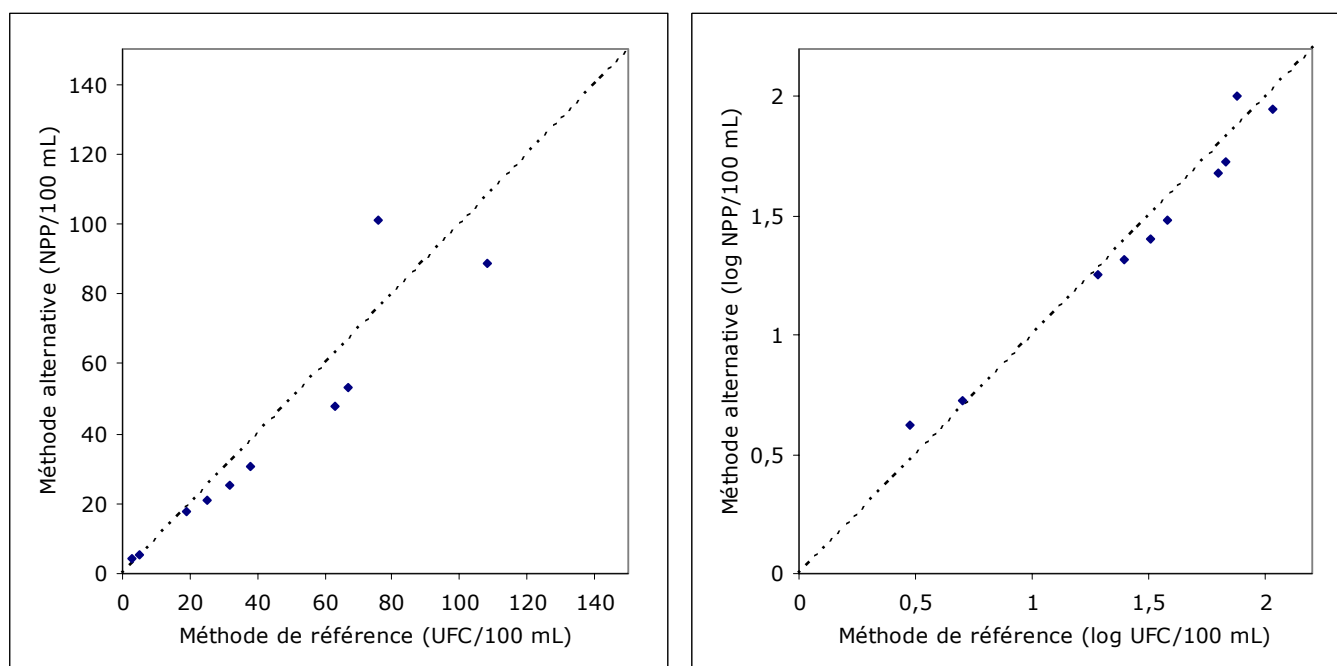
<b>Souche</b>	<b>Matrice</b>	<b>Taux de contamination cible (UFC/100 ou 250 mL)</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> ENTC.1.4 (eau de rivière)	Eau de distribution	10- 30- 50- 100

**Tableau 4** : couples souche / matrice analysés

### **2.2.2. Résultats bruts**

Les résultats bruts et les calculs statistiques sont résumés en annexe 5. Les graphiques de la figure 2 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.

La représentation d'une droite d'équation «  $y=x$  » figure en pointillés sur les figures.



**Figure 2** : graphiques bidimensionnels représentant les résultats bruts de l'étude de linéarité (en UFC / 100 mL et en log UFC / 100 mL)

### **2.2.3. Exploitation statistique**

Les interprétations statistiques sont réalisées conformément aux exigences de la norme NF ISO 16140 (cf. tableau 5).

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.

Données	Rob. R	Régression utilisée	F critique	Rob. F	P (Rob.F)	Coefficient de corrélation (r)	Droite de régression
Brutes	0,867	GMFR	5,41	9,737	0,016	0,981	Alt = 0,981 IRéf - 3,315
Log	0,550	GMFR	5,41	4,887	0,060	0,991	log Alt = 0,909 log Réf + 0,100

**Tableau 5** : données statistiques du couple souche / matrice (données brutes et logarithmiques)

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

- si Rob.F > F critique
- ou
- si P(Rob.F) <  $\alpha$  (=0,05)

#### **2.2.4. Conclusion**

La relation entre les deux méthodes n'est pas linéaire lorsque les calculs sont effectués à partir des données brutes. Le coefficient de corrélation du couple et l'équation de la droite de régression sont cependant satisfaisants. Quand les données sont exprimées en logarithme, la relation entre les méthodes devient linéaire.

La linéarité de la méthode alternative est satisfaisante.

### **2.3. Limites 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'essai**

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées en analysant une culture pure de la souche d'*Enterococcus faecalis* ENTC.1.5 isolée d'une eau de surface 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**

Les résultats bruts sont présentés dans l'annexe 6 et la synthèse dans les tableaux suivants.

Niveau (UFC/100mL)	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type (So)	Biais (Xo)
0,000	0	0,000	0,000
0,233	1	0,408	0,000
0,500	2	0,837	0,000
0,967	5	0,753	1,000
1,700	4	1,577	1,000
3,467	6	2,279	4,750

**Tableau 6** : données ( $S_0$  et  $X_0$ ) pour le dénombrement des entérocoques

Paramètre	Formules	Valeur obtenue
Niveau critique (LC)	$1,65 S_0 + X_0$	2,24
Limite de détection (LOD)	$3,3 S_0 + X_0$	3,48
Limite de quantification (LOQ)	$10 S_0 + X_0$	8,53

**Tableau 7** : valeurs obtenues pour le dénombrement des entérocoques

#### **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. Protocoles d'essai**

Trente souches cibles 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  $10^3$  à  $10^5$  fois supérieur au taux de détection de la méthode alternative (environ  $10^4$  UFC / 100 mL) en ce qui concerne l'exclusivité.

### **2.4.2. Résultats**

Les résultats sont présentés en annexe 7.

Les trente souches d'entérocoques testées sont détectées par la méthode alternative.

Aucune souche non cible n'a montré de réaction croisée avec la méthode alternative.

### **2.4.3. Conclusion**

La sélectivité de la méthode est satisfaisante.

## **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 Enterolert-DW est conditionné en capsules individuelles hermétiques.

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

Les produits ont une DLC de 12 mois.

### **2- Volume des réactifs**

Plusieurs formats sont disponibles (par 20 tests, 100 tests ou 200 tests).

### **3- Conditions de stockage des éléments**

La température de stockage des Enterolert-DW est comprise entre 2 et 25 °C.

La température de stockage des Quanti-Tray<sup>®</sup> est comprise entre 4 et 30°C.

### **4- Modalités d'utilisation après première utilisation**

Chaque Quanti-Tray et chaque capsule d'Enterolert-DW sert à une analyse unique et ne doit pas être réutilisé.

### **5- Equipements ou locaux spécifiques nécessaires**

Un Quanti-Tray<sup>®</sup> Sealer model 2X est nécessaire.

### **6- Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer**

Il n'y a pas de réactif à reconstituer.

Les réactifs de la méthode alternative ne contiennent pas de substances toxiques contrairement à la méthode de référence où l'étape de confirmation nécessite l'utilisation de l'azide de sodium (toxique).

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

L'utilisation de la méthode Enterolert-DW / 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 7899-2 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 Enterolert-DW / Quanti-Tray est d'environ 2 min (temps comprenant : le temps d'attente de dissolution de l'Enterolert-DW et le temps pour sceller le Quanti-Tray).

La méthode alternative ne nécessite pas d'étape de confirmation contrairement à la méthode de référence.

#### 9- Délai d'obtention des résultats

Le délai d'obtention des résultats pour la méthode Enterolert-DW / Quanti-Tray est de 24 heures.

Le délai d'obtention des résultats pour la méthode NF EN ISO 7899-2 est de 48 heures (dénombrement : 44 heures et confirmation : 4 heures).

#### 10- Type de qualification de l'opérateur

Niveau inférieur à celui nécessaire pour la méthode de référence du fait d'une lecture des Quanti-Tray plus facile que le comptage des colonies.

#### 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.

### **3. Etude interlaboratoires**

#### **3.1. Mise en œuvre de l'étude interlaboratoires**

##### **3.1.1. Laboratoires collaborateurs**

L'étude interlaboratoires a été réalisée par le laboratoire expert et treize laboratoires collaborateurs.

##### **3.1.2. Matrice et souche**

Une eau de réseau déchlorée a été utilisée comme matrice d'essai. Elle a été contaminée avec une souche d'*Enterococcus faecalis* (codée ENTC.1.10) issue d'une eau de rivière. L'absence d'entérocoques dans cette matrice avant la contamination artificielle a été vérifiée en utilisant la méthode de référence.

##### **3.1.3. Stabilité des souches dans la matrice eau**

La stabilité de la souche d'*Enterococcus faecalis* dans l'eau réseau déchlorée a été évaluée sur 3 jours à 5±3 °C. Les résultats des dénombrements sont présentés dans le tableau 8.

	<b>Niveau 1</b>	<b>Niveau 2</b>	<b>Niveau 3</b>
<b>J0</b>	28	91	130
<b>J1</b>	35	76	143
<b>J2</b>	33	82	139

**Tableau 8 :** résultats des dénombrements en UFC/100 mL de la souche d'*Enterococcus faecalis* ENTC.1.10 dans de l'eau de réseau déchlorée entre J0 et J2 par la méthode de référence

La souche testée paraît stable à 5±3 °C dans la matrice utilisée.

##### **3.1.4. Préparation et inoculation des échantillons**

La matrice a été répartie à raison de 100 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.

Quatre niveaux de contamination ont été testés :

- 0 UFC/250 mL,
- de 1 à 20 UFC/100 mL,
- de 20 à 80 UFC/100 mL,
- de 80 à 150 UFC/100 mL.

Chaque laboratoire a donc 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 9.

<b>Niveau</b>	<b>Flore totale (UFC/mL)</b>		<b><i>Enterococcus faecalis</i> ENTC.1.10 (UFC / 100 mL)</b>	
	<b>22°C</b>	<b>36°C</b>	<b>Taux cible</b>	<b>Taux réel à J0</b>
0	15	32	0	0
1			1 à 20	21
2			20 à 80	71
3			80 à 150	113

**Tableau 9 :** dénombrements de la flore totale et des inoculés d'ENTC.1.10 (moyenne de 10 dénombrements en TSA) dans une eau de réseau déchlorée

##### **3.1.5. Etiquetage des échantillons**

L'étiquetage des flacons a été réalisé de la façon suivante :

- un code permettant d'identifier le laboratoire : A à M,
- un code permettant d'identifier chaque échantillon, connu uniquement du laboratoire expert.

Le codage est présenté dans le tableau 10.

Les échantillons et les témoins température (échantillon d'eau contenant un thermobouton) ont été stockés à 5°C avant expédition.

Taux (UFC / 100 mL)	Code échantillon
0	1 / 8
1 à 20	2 / 5
20 à 80	4 / 7
80 à 150	3 / 6

**Tableau 10** : Codes échantillon attribués à chaque niveau de contamination

### **3.1.6. Expédition, réception et analyse des échantillons**

Les échantillons ont été expédiés dans un kit froid le 10 juin 2013.

Les colis ont été livrés en 24 heures pour 10 laboratoires et en 48 heures pour 3 laboratoires. La température du pot témoin a été prise dès réception du colis et la sonde expédiée au laboratoire expert pour la lecture des données. Les échantillons ont été stockés à (5±3)°C jusqu'au moment de l'analyse le 12 juin 2013. 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 avaient reçu avant les échantillons des instructions détaillées concernant la mise en œuvre des analyses.

Le laboratoire E a annulé sa participation à l'étude interlaboratoires après réception des échantillons. Les analyses ont donc été réalisées par 12 laboratoires.

## **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 11 pour les 12 laboratoires ayant participé à l'analyse.

Laboratoire	Température	Etat des échantillons	Température sonde	
			Moyenne	Ecart-type
A	5,6°C	Bon	3,45°C	1,76°C
B	6,1°C	Bon	3,68°C	0,47°C
C	5,1°C	Bon	2,10°C	0,35°C
D	3,5°C	Bon	3,43°C	0,31°C
E	/	/	5,67°C	0,78°C
F	8,8°C	Bon	5,57°C	0,68°C
G	5,8°C	Bon	2,69°C	0,42°C
H	2,8°C	Bon	4,68°C	1,37°C
I	6,8°C	Bon	3,51°C	0,53°C
J	10,5°C	Bon	2,25°C	0,25°C
K	7,4°C	Bon	6,51°C	0,49°C
L	10,1°C	Bon	3,49°C	1,18°C
M	9,9°C	Bon	3,89°C	0,60°C

**Tableau 11** : température et état des échantillons lors de la réception par les laboratoires et données des sondes de température pour la durée de transport des échantillons (/ : non-participation du laboratoire à l'étude)

Les relevés de température sont corrects pour huit laboratoires. Les laboratoires F, J, L et M ont relevé des températures supérieures à 8°C. L'analyse des profils thermiques des sondes de température montre cependant que le transport des échantillons s'est déroulé à une température correcte, avec des températures moyennes comprises entre 2,10°C et 6,51°C.

### **3.2.2. Dénombrement des microorganismes revivifiables**

Pour l'ensemble des laboratoires, les dénombrements des microorganismes revivifiables indiquent des valeurs comprises entre 79 UFC/mL et 145 UFC/mL à 22°C et entre <1 UFC/mL et 30 UFC/mL à 36°C. Les résultats des dénombrements sont présentés en annexe 8.

### 3.2.3. Résultats des laboratoires expert et collaborateurs

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 12. Les résultats bruts sont présentés en annexe 9. Les résultats de douze laboratoires pour les niveaux 1, 2 et 3 sont présentés dans le tableau 12.

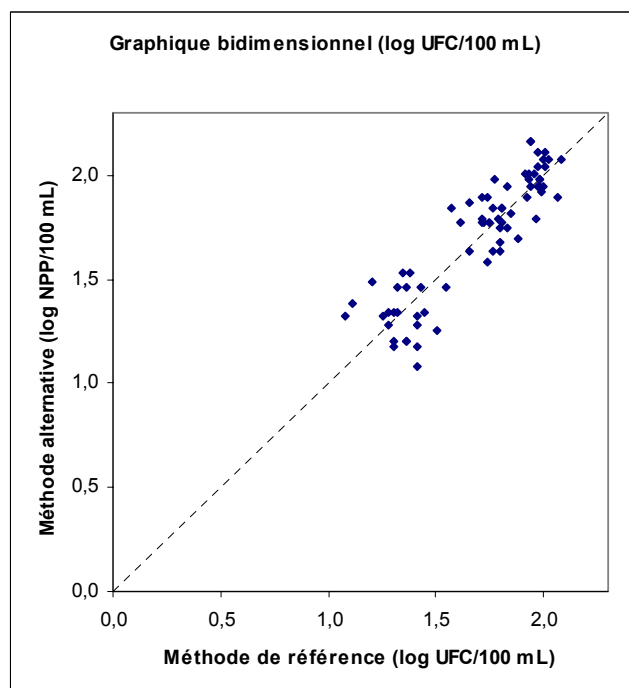
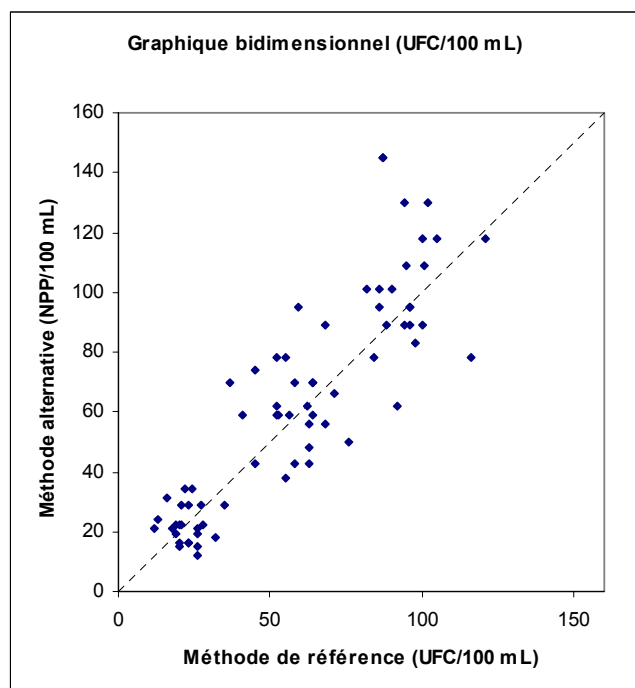
Labo- ratoire	Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3			
	MR (UFC/100 mL)		MA (NPP/100 mL)		MR (UFC/100 mL)		MA (NPP/100 mL)		MR (UFC/100 mL)		MA (NPP/100 mL)	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
A	26	23	12	16	55	56	38	59	100	90	89	101
B	16	23	31	16	37	41	70	59	59	88	95	89
C	20	20	16	22	52	64	62	59	86	82	101	101
D	24	19	34	19	52	64	59	70	102	121	130	118
F	27	18	29	21	76	71	50	66	116	95	78	109
G	22	13	34	24	52	45	78	74	101	105	109	118
H	32	20	18	15	62	68	62	56	92	87	62	145
I	23	21	29	22	53	55	59	78	86	96	95	95
J	26	28	15	22	64	68	70	89	94	94	89	130
K	26	12	21	21	63	63	48	43	96	87	95	145
L	19	21	22	29	45	58	43	43	84	98	78	83
M	26	35	19	29	63	58	56	70	96	100	89	118
Expert	18	17	22	22	57	55	56	59	108	96	145	95

**Tableau 12** : Résultats des laboratoires participants et du laboratoire expert

En ce qui concerne le niveau 0, tous les résultats obtenus étaient  $<1$  UFC/100 mL pour les deux méthodes.

Le laboratoire F a toutefois signalé la présence de trois puits « très faibles douteux » pour une des répétitions du niveau 0 après 24 h d'incubation. Aucun changement de la coloration de ces puits n'était observé après 4 h d'incubation supplémentaires. Après avoir contacté le laboratoire F, il semble que ces puits présentaient une très faible variation de couleur qui ne pouvait pas être considérée comme un résultat positif.

Les données obtenues par les laboratoires collaborateurs sont présentées sous forme de graphique bidimensionnel en UFC et NPP/ 100 mL et en logarithme dans la figure 3 pour une meilleure appréciation des données (une courbe d'équation  $y=x$  figure en pointillés).



**Figure 3** : graphiques bidimensionnels

### **3.3. Interprétation statistique**

Les données présentées dans les paragraphes suivants ont été calculées à partir des résultats en logarithme NPP/100 mL.

#### **3.3.1. Calcul du biais**

Le tableau 13 représente la valeur cible, la moyenne, l'écart-type de fidélité, le biais relatif et le biais de chaque niveau de contamination.

Valeurs	NPP/100 mL			log NPP/100 mL		
	1 - Bas	2 - Moyen	3 - Haut	1 - Bas	2 - Moyen	3 - Haut
Valeur cible	21,5	58,0	94,5	1,352	1,763	1,975
Moyenne niveau	22,3	60,9	102,6	1,332	1,775	2,002
Biais relatif	0,039	0,050	0,086	-1,46%	0,65%	1,37%
Biais	1,039	1,050	1,086	-0,020	0,012	0,027

**Tableau 13** : calculs du biais de la méthode alternative

La justesse est estimée par le biais qui varie entre -0,020 log NPP/100 mL (1,039 NPP/100 mL) et 0,027 log NPP/100 mL (1,086 NPP/100 mL).

Le biais calculé dans le rapport d'étude préliminaire était de 0,014 log NPP/100 mL (1,900 NPP/100 mL) pour les eaux de consommation humaine hors eaux embouteillées.

#### **3.3.2. Profil d'exactitude**

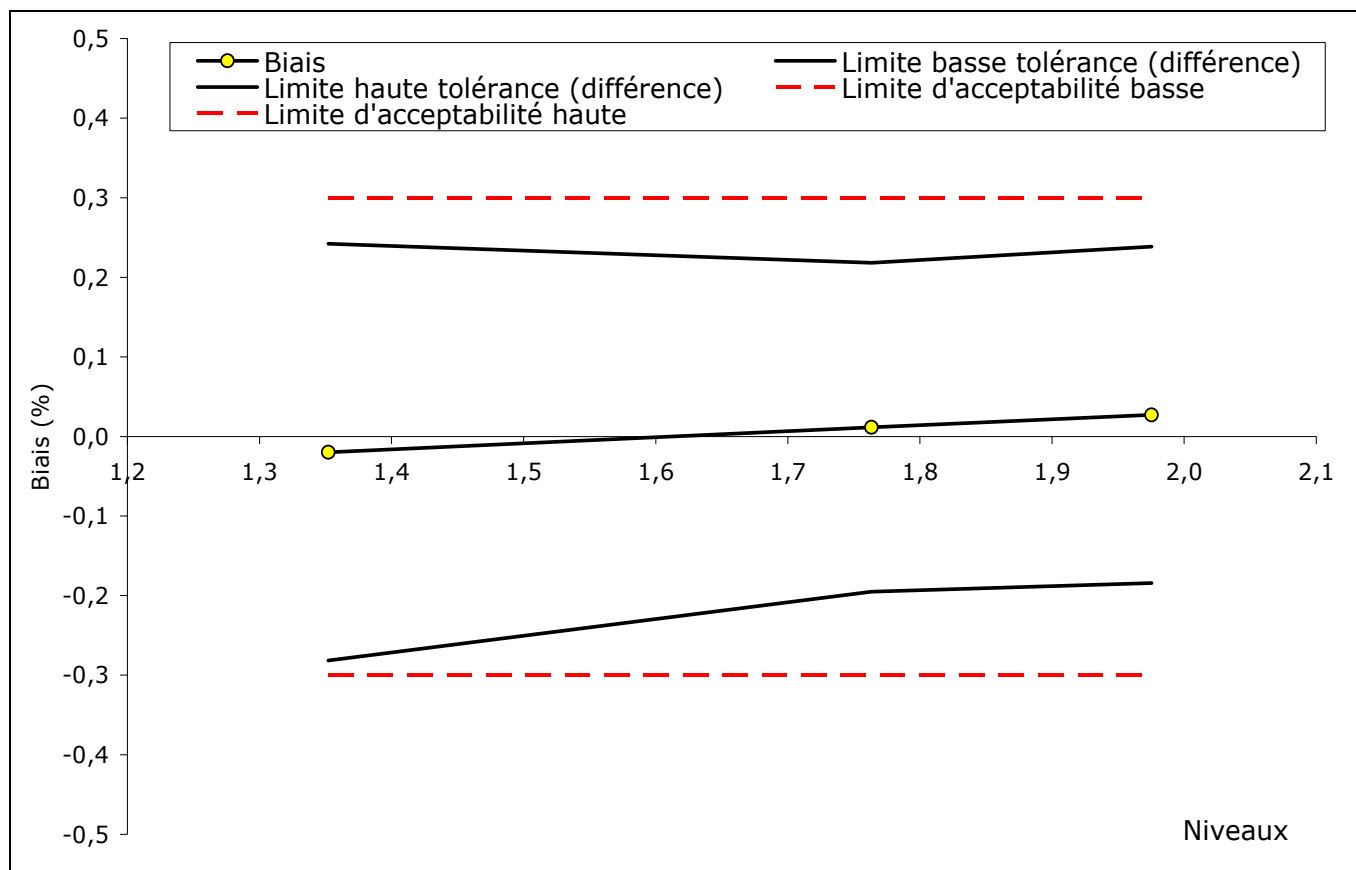
Le tableau 14 présente les valeurs de tolérance et les limites de tolérance de la méthode alternative pour différentes valeurs de probabilité de tolérance et de limites d'acceptabilité.

Les données sont présentées en NPP/100 mL et en log NPP/100 mL.

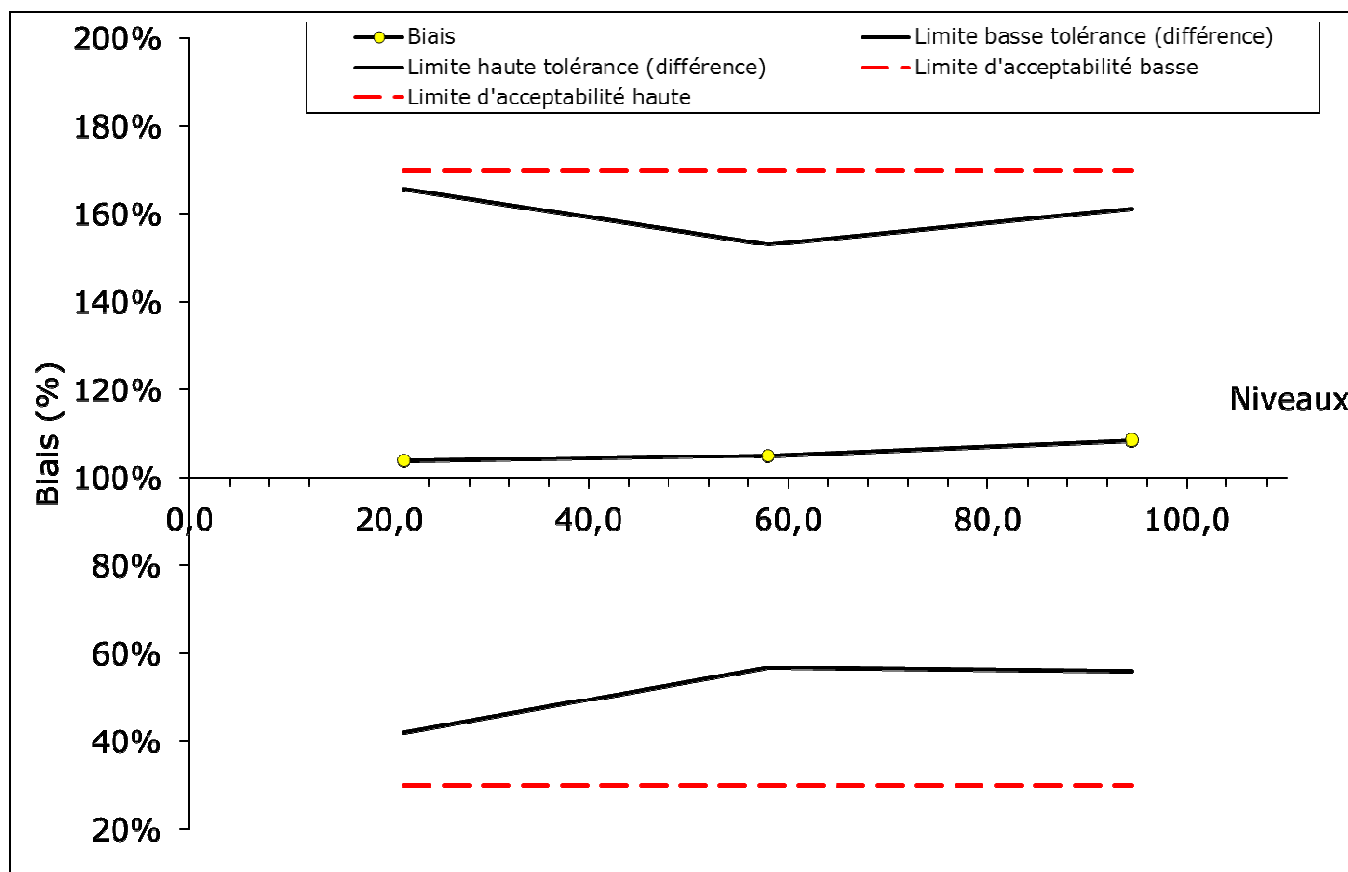
Probabilité de tolérance	Niveaux	NPP/100 mL			log NPP/100 mL		
		Bas	Moyen	Haut	Bas	Moyen	Haut
95%	Limite basse tolérance (différence)	42%	57%	53%	-0,282	-0,195	-0,184
	Limite haute tolérance (différence)	166%	153%	161%	0,242	0,218	0,238
	Limite d'acceptabilité basse	30%	30%	30%	-0,300	-0,300	-0,300
	Limite d'acceptabilité haute	170%	170%	170%	0,300	0,300	0,300

**Tableau 14** : valeurs de tolérance de la méthode alternative en log (NPP/100 mL)

Les figures 4 et 5 représentent les profils d'exactitude correspondants.



**Figure 4** : profil d'exactitude pour une probabilité de tolérance de 95% et une limite de tolérance de 0,3 log



**Figure 5** : profil d'exactitude pour une probabilité de tolérance de 95% et une limite de tolérance de 70%

- Commentaires :

Le biais de la méthode alternative augmente du faible niveau de contamination au fort niveau de contamination.

Pour tous les niveaux de contamination, l'intervalle de tolérance est compris dans l'intervalle d'acceptabilité pour une probabilité de tolérance de 95% et une limite de 0,3 log NPP/100 mL ou de 70% en NPP/100 mL.

### **3. Conclusions**

- Etude comparative des méthodes

La linéarité et l'exactitude relative de la méthode Enterolert-DW / Quanti-Tray pour le dénombrement des entérocoques dans les eaux de consommation humaine (hors eaux embouteillées) sont satisfaisantes.

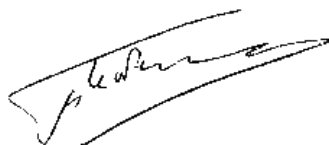
Le biais entre les deux méthodes est acceptable. Les limites de détection et de quantification de la méthode sont satisfaisantes.

La méthode Enterolert-DW / Quanti-Tray pour le dénombrement des entérocoques est spécifique et sélective.

- Etude interlaboratoires

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 Enterolert / Quanti-Tray pour le dénombrement des entérocoques dans les eaux de consommation humaine hors eaux embouteillées est acceptable.

Les limites de tolérance de la méthode alternative sont comprises dans l'intervalle d'acceptabilité pour une probabilité de tolérance de 95% et une limite d'acceptabilité de 0,3 log NPP/100 mL ou de 70% en NPP/100 mL.



Fait à Massy, le 7 novembre 2013  
François Le Nestour  
Responsable de l'Unité Innovation Biologie



## **ANNEXE 1**

# **PROTOCOLE DE LA METHODE ALTERNATIVE**

## **PROTOCOLE DE LA METHODE ALTERNATIVE**

### **Etape 1**

Ajouter le réactif Enterolert-DW à un échantillon d'eau de 100 mL à température ambiante

Agiter jusqu'à dissolution du réactif  
Verser le mélange dans un Quanti-Tray<sup>®</sup>

### **Etape 2**

Sceller à l'aide du Quanti-Tray<sup>®</sup> Sealer

### **Etape 3**

Incuber à  $41 \pm 0,5$  °C pendant 24 à 28 heures

### **Etape 4**

Compter le nombre de puits bleus puis se reporter à la table des NPP pour le dénombrement des entérocoques

### **Etape 5**

Expression des résultats :  
Nombre d'entérocoques / 100 mL d'eau

## **ANNEXE 2**

### **PROTOCOLE DE LA METHODE DE REFERENCE**

## **PROTOCOLE NORME ISO 7899-2**

### **Filtration sur membrane et incubation**

Filtrer 100 mL d'échantillon sur membrane stérile  
Placer la membrane sur milieu Slanetz et Bartley  
Incuber à  $36 \pm 2$  °C pendant  $44 \pm 4$  heures

### **Lecture**

Après incubation, considérer comme typiques toutes les colonies bombées montrant une couleur rouge, marron ou rose, soit au centre soit sur l'ensemble de la colonie.

### **Confirmation**

S'il y a des colonies typiques, transférer la membrane et les colonies, au moyen de pinces stériles, sans retournement, sur une boîte de gélose bile-esculine-azoture qui a été préchauffée à 44 °C.

Faire incuber à  $44 \pm 0,5$  °C pendant 2 h.

Lire la boîte sans délai.

Considérer toutes les colonies typiques montrant une couleur brune à noire dans le milieu environnant comme donnant une réaction positive, et les compter comme entérocoques intestinaux.

### **Expression des résultats :**

Nombres d'entérocoques / 100 mL d'échantillon

**ANNEXE 3**

**SOUCHES BACTERIENNES STRESSEES**

**STRESS APPLIQUES ET SOUCHES UTILISEES**  
**POUR LES CONTAMINATIONS ARTIFICIELLES**

<b>Code</b>	<b>Souches</b>	<b>Origine</b>	<b>Stress appliqué</b>	<b>log MNS-log MS</b>
ENTC.3.1	<i>E. hirae</i>	CIP 58.55	2 mois à 5°C	0,9
ENTC.1.4	<i>E. faecalis</i>	Eau de rivière	30 min à 56°C	0,6
ENTC.1.10	<i>E. faecalis</i>	Eau de rivière	15 min à 60°C	1,4
ENTC.2.10	<i>E. faecium</i>	Eau de rivière	15 min à 60°C	0,6
ENTC.2.9	<i>E. faecium</i>	Eau de rivière	35 min à 60°C	1,6
ENTC.3.2	<i>E. hirae</i>	Eau de rivière	2 mois à 5°C	0,6
ENTC.1.12	<i>E. faecalis</i>	Eau de rivière	15 min à 60°C	0,6
ENTC.7.4	<i>E. casseliflavus</i>	Eau de rivière	15 min à 60°C + 25 min à 50°C	0,6
ENTC.5.2	<i>E. gallinarum</i>	Eau de rivière	15 min à 60°C	1,0
ENTC.1.15	<i>E. faecalis</i>	Eau de rivière	2 min hypochlorite de sodium dilué au 1/10000 <sup>ème</sup>	0,7
ENTC.7.3	<i>E. casseliflavus</i>	Eau de rivière	2 cycles congélation-décongélation	0,5
ENTC.7.2	<i>E. casseliflavus</i>	Eau de rivière	2 cycles congélation-décongélation	0,7
ENTC.6.1	<i>E. durans</i>	Eau de rivière	2 mois à 5°C	0,9
ENTC.2.4	<i>E. faecium</i>	Eau de surface	15 min à 60°C	1,0
ENTC.2.5	<i>E. faecium</i>	Eau de surface	2 min hypochlorite de sodium dilué au 1/10000 <sup>ème</sup>	1,3
ENTC.2.6	<i>E. faecium</i>	Eau de surface	3 min ammonium quaternaire dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	0,8
ENTC.1.5	<i>E. faecalis</i>	Eau de surface	2 mois à 5°C	0,7
ENTC.1.7	<i>E. faecalis</i>	Eau de surface	1 min hypochlorite de sodium dilué au 1/10000 <sup>ème</sup>	1,3
ENTC.2.8	<i>E. faecium</i>	Eau de rivière	15 min à 60°C	2,1
ENTC.1.8	<i>E. faecalis</i>	Eau de rivière	3 cycles congélation-décongélation	0,9
ENTC.1.9	<i>E. faecalis</i>	Eau de rivière	15 min à 60°C	1,8
ENTC.1.11	<i>E. faecalis</i>	Eau de rivière	3 cycles congélation-décongélation	0,8

**ANNEXE 4**

**EXACTITUDE RELATIVE**  
**DONNEES BRUTES ET CALCULS STATISTIQUES**

## Exactitude relative - Résultats bruts

au moins 1 résultat <4 UFC/100 mL pour un réplicat de la MR (présence non quantifiable)

N° d'échantillon	Matrice	Souche	Espèce	Taux de contamination (UFC/100 mL)	Méthode de référence						Méthode alternative					
					R1			R2			R1			R2		
					Nombre de colonies sur Slanetz et Bartlev	Nombre de colonies esculine + sur BFA	log	Nombre de colonies sur Slanetz et Bartlev	Nombre de colonies esculine + sur BFA	log	Nombre puits jaunes	NPP / 100 mL	log	Nombre puits jaunes	NPP / 100 mL	log
7	Eau réseau Rosny sous Bois	ENTC.3.1	<i>E. hirae</i>	119	2	2	0,301	3	3	0,477	2	2,0	0,301	1	1,0	0,000
8	Eau réseau Massy	ENTC.3.1	<i>E. hirae</i>	119	2	2	0,301	3	3	0,477	1	1,0	0,000	1	1,0	0,000
12	Eau fontaine Massy	ENTC.1.4	<i>E. faecalis</i>	400	2	2	0,301	8	8	0,903	2	2,0	0,301	1	1,0	0,000
13	Eau réseau Bordeaux	ENTC.3.1	<i>E. hirae</i>	412	4	4	0,602	3	3	0,477	7	7,5	0,875	6	6,4	0,806
23	Eau fontaine Lisses	ENTC.1.10	<i>E. faecalis</i>	68	14	13	1,114	12	12	1,079	35	59,1	1,772	27	38,4	1,584
25	Eau réseau Montreuil-sous-Bois	ENTC.2.10	<i>E. faecium</i>	63	62	62	1,792	52	51	1,708	14	16,4	1,215	16	19,2	1,283
28	Eau réseau Paris	ENTC.1.10	<i>E. faecalis</i>	202	23	23	1,362	25	25	1,398	22	28,8	1,459	25	34,4	1,537
31	Eau réseau Paris 16ème	ENTC.2.9	<i>E. faecium</i>	10	37	37	1,568	47	45	1,653	28	40,6	1,609	34	56,0	1,748
33	Eau réseau Paris 20ème	ENTC.3.2	<i>E. hirae</i>	20	13	13	1,114	17	15	1,176	7	7,5	0,875	10	11,1	1,045
35	Eau réseau La Ville du Bois	ENTC.1.12	<i>E. faecalis</i>	20	29	28	1,447	27	25	1,398	14	16,4	1,215	10	11,1	1,045
36	Eau source Lozère	ENTC.7.4	<i>E. casseliflavus</i>	30	30	30	1,477	42	41	1,613	39	73,8	1,868	40	78,2	1,893
38	Eau réseau Orly	ENTC.5.2	<i>E. gallinarum</i>	40	131	111	2,045	107	102	2,009	44	101,3	2,006	46	118,4	2,073
43	Eau réseau Clamart	ENTC.1.15	<i>E. faecalis</i>	90	42	41	1,613	39	39	1,591	15	17,8	1,250	15	17,8	1,250
46	Eau réseau Meudon la Forêt	ENTC.7.3	<i>E. casseliflavus</i>	120	31	31	1,491	52	51	1,708	23	30,6	1,486	31	47,8	1,679
47	Eau réseau Saint Chéron	ENTC.7.2	<i>E. casseliflavus</i>	10	104	104	2,017	108	103	2,013	44	101,1	2,005	48	144,5	2,160
49	Eau réseau Rosny sous Bois	ENTC.1.15	<i>E. faecalis</i>	30	12	10	1,000	13	13	1,114	16	19,2	1,283	9	9,9	0,996
50	Eau forage Mitry Mory	ENTC.2.4	<i>E. faecium</i>	10	8	5	0,699	6	4	0,602	1	1,0	0,000	5	5,3	0,724
51	Eau réseau Maisons Alfort	ENTC.2.5	<i>E. faecium</i>	50	58	58	1,763	58	58	1,763	38	69,7	1,843	34	56,0	1,748
52	Eau de source Nantes	ENTC.2.6	<i>E. faecium</i>	60	47	47	1,672	47	47	1,672	33	53,1	1,725	35	59,1	1,772
54	Eau de source Le Mont-Dore	ENTC.1.5	<i>E. faecalis</i>	80	56	55	1,740	57	57	1,756	25	34,4	1,537	32	50,4	1,702
58	Eau réseau Clermont-Ferrand	ENTC.1.7	<i>E. faecalis</i>	10	8	8	0,903	10	10	1,000	7	7,5	0,875	7	7,5	0,875
62	Eau de source Royat	ENTC.6.1	<i>E. durans</i>	80	6	5	0,699	4	4	0,602	1	1,0	0,000	3	3,1	0,491
65	Eau réseau Nantes	ENTC.2.4	<i>E. faecium</i>	110	106	106	2,025	118	118	2,072	40	78,2	1,893	45	109,1	2,038
66	Eau réseau Elancourt	ENTC.2.4	<i>E. faecium</i>	20	28	19	1,279	42	38	1,580	15	17,8	1,250	16	19,2	1,283
68	Eau réseau Argenteuil	ENTC.2.8	<i>E. faecium</i>	10	30	30	1,477	18	18	1,255	10	11,1	1,045	12	13,7	1,137
69	Eau de source Clermont-Ferrand	ENTC.1.8	<i>E. faecalis</i>	15	9	9	0,954	29	29	1,462	29	42,9	1,632	25	34,4	1,537
70	Eau de source Volvic	ENTC.5.2	<i>E. gallinarum</i>	20	9	9	0,954	14	14	1,146	14	16,4	1,215	10	11,1	1,045
71	Eau de forage Loire	ENTC.2.10	<i>E. faecium</i>	30	41	41	1,613	49	49	1,690	30	45,3	1,656	31	47,8	1,679
72	Eau de forage région parisienne 1	ENTC.1.9	<i>E. faecalis</i>	35	33	32	1,505	53	53	1,724	36	62,4	1,795	35	59,1	1,772
76	Eau de forage région parisienne 1	ENTC.1.11	<i>E. faecalis</i>	100	84	82	1,914	98	95	1,978	37	65,9	1,819	39	73,8	1,868



**Exactitude relative - Entérocoques - Eaux de consommation humaine - Données brutes**

Méthode de référence					Méthode alternative					Différence
Echantillon	Répétition 1	Répétition 2	M	SD	Echantillon	Répétition 1	Répétition 2	M	SD	
1	13	12	12,5	0,707	1	59,1	38,4	48,75	14,637	36,250
2	62	51	56,5	7,778	2	16,4	19,2	17,80	1,980	-38,700
3	23	25	24,0	1,414	3	28,8	34,4	31,60	3,960	7,600
4	37	45	41,0	5,657	4	40,6	56,0	48,30	10,889	7,300
5	13	15	14,0	1,414	5	7,5	11,1	9,30	2,546	-4,700
6	28	25	26,5	2,121	6	16,4	11,1	13,75	3,748	-12,750
7	30	41	35,5	7,778	7	73,8	78,2	76,00	3,111	40,500
8	111	102	106,5	6,364	8	101,3	118,4	109,85	12,092	3,350
9	41	39	40,0	1,414	9	17,8	17,8	17,80	0,000	-22,200
10	31	51	41,0	14,142	10	30,6	47,8	39,20	12,162	-1,800
11	104	103	103,5	0,707	11	101,1	144,5	122,80	30,688	19,300
12	10	13	11,5	2,121	12	19,2	9,9	14,55	6,576	3,050
13	58	58	58,0	0,000	13	69,7	56,0	62,85	9,687	4,850
14	47	47	47,0	0,000	14	53,1	59,1	56,10	4,243	9,100
15	55	57	56,0	1,414	15	34,4	50,4	42,40	11,314	-13,600
16	8	10	9,0	1,414	16	7,5	7,5	7,50	0,000	-1,500
17	106	118	112,0	8,485	17	78,2	109,1	93,65	21,850	-18,350
18	19	38	28,5	13,435	18	17,8	19,2	18,50	0,990	-10,000
19	30	18	24,0	8,485	19	11,1	13,7	12,40	1,838	-11,600
20	9	29	19,0	14,142	20	42,9	34,4	38,65	6,010	19,650
21	9	14	11,5	3,536	21	16,4	11,1	13,75	3,748	2,250
22	41	49	45,0	5,657	22	45,3	47,8	46,55	1,768	1,550
23	32	53	42,5	14,849	23	62,4	59,1	60,75	2,333	18,250
24	82	95	88,5	9,192	24	65,9	73,8	69,85	5,586	-18,650

q= 24  
n= 2  
N=qn= 48

**Mx=** 43,896  
**MEDx=** 40,500  
**SDbx=** 30,834  
**MEDwx =** 4,596  
**SDwx=** 7,324  
**rob. SDwx=** 6,814

**My=** 44,694  
**MEDy=** 40,800  
**SDby=** 32,293  
**MEDwy =** 4,101  
**SDwy=** 10,152  
**rob. SDwy=** 6,080

**M=** 0,798  
**MED=** 1,900  
Biais

**Choix de la méthode**

GMFR

**R=** 1,386  
**rob. R=** 0,892

**Sx=** 30,950  
**Sy=** 32,761

**r=** 0,836  
**b=** 1,059  
**a=** -1,770

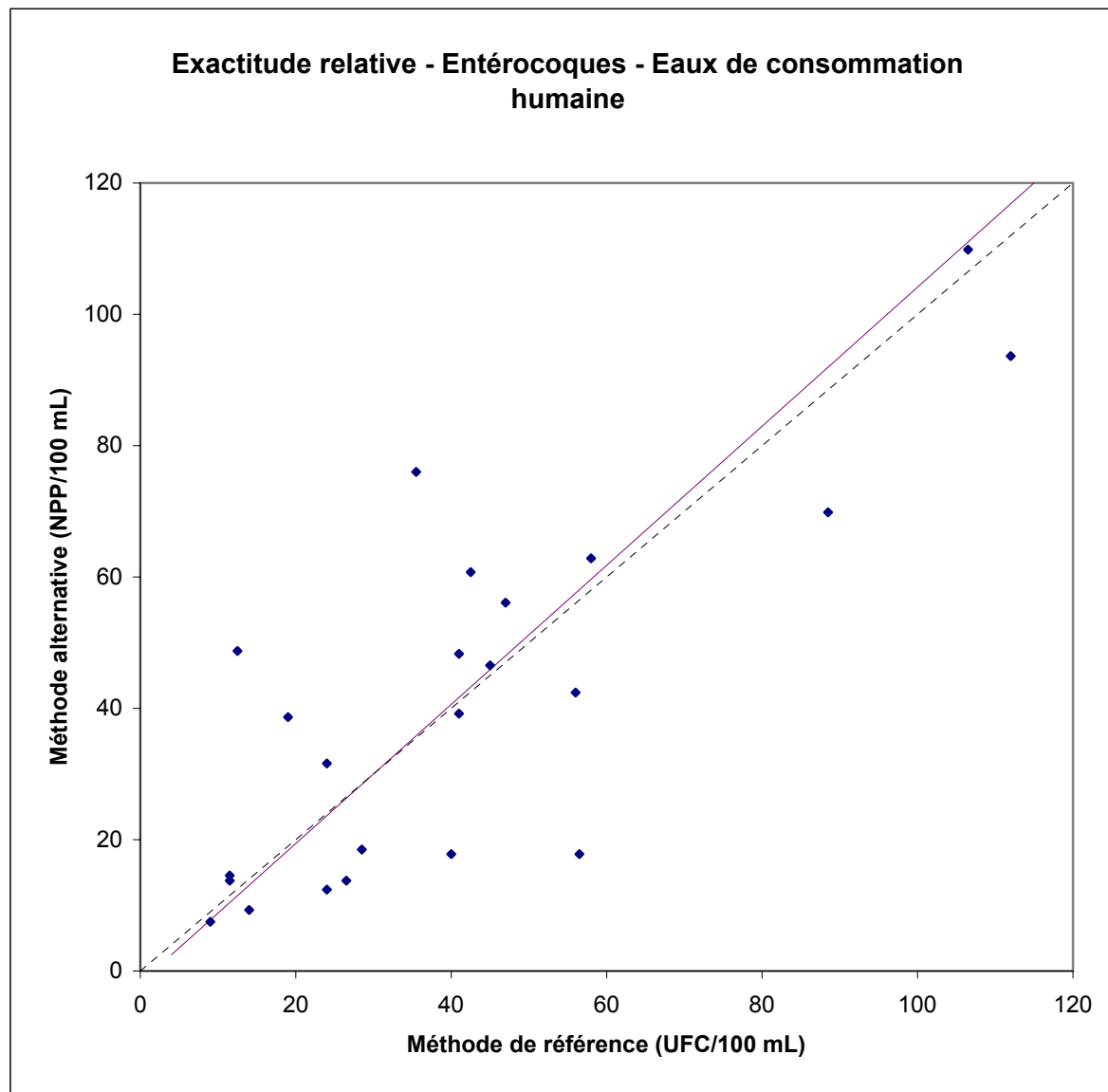
**Res. SEM=** 19,014  
**Res. SD=** 26,891

**S(b)=** 0,128      **p(t;b=1)=** 0,650      **t(b)=** 0,457  
**S(a)=** 4,847      **p(t;a=0)=** 0,717      **t(a)=** 0,365

Répétabilité	Méthode de référence	Méthode alternative
r	20,508	28,425
rob. r	19,080	17,025

Est. y	Dév.
11,461	37,289
58,035	-40,235
23,634	7,966
41,628	6,672
13,049	-3,749
26,280	-12,530
35,807	40,193
110,961	-1,111
40,570	-22,770
41,628	-2,428
107,785	15,015
10,402	4,148
59,623	3,227
47,980	8,120
57,506	-15,106
7,756	-0,256
116,783	-23,133
28,397	-9,897
23,634	-11,234
18,341	20,309
10,402	3,348
45,863	0,687
43,216	17,534
91,908	-22,058

Les points représentés correspondent aux moyennes des répétitions de chaque échantillon



**Exactitude relative - Entérocoques - Eaux de consommation humaine - Données en log**

Méthode de référence					Méthode alternative					Différence
Echantillon	Répétition 1	Répétition 2	M	SD	Echantillon	Répétition 1	Répétition 2	M	SD	
1	1,114	1,079	1,097	0,025	1	1,772	1,584	1,678	0,132	0,581
2	1,792	1,708	1,750	0,060	2	1,215	1,283	1,249	0,048	-0,501
3	1,362	1,398	1,380	0,026	3	1,459	1,537	1,498	0,055	0,118
4	1,568	1,653	1,611	0,060	4	1,609	1,748	1,678	0,099	0,068
5	1,114	1,176	1,145	0,044	5	0,875	1,045	0,960	0,120	-0,185
6	1,447	1,398	1,423	0,035	6	1,215	1,045	1,130	0,120	-0,292
7	1,477	1,613	1,545	0,096	7	1,868	1,893	1,881	0,018	0,336
8	2,045	2,009	2,027	0,026	8	2,006	2,073	2,039	0,048	0,013
9	1,613	1,591	1,602	0,015	9	1,250	1,250	1,250	0,000	-0,352
10	1,491	1,708	1,599	0,153	10	1,486	1,679	1,583	0,137	-0,017
11	2,017	2,013	2,015	0,003	11	2,005	2,160	2,082	0,110	0,067
12	1,000	1,114	1,057	0,081	12	1,283	0,996	1,139	0,203	0,082
13	1,763	1,763	1,763	0,000	13	1,843	1,748	1,796	0,067	0,032
14	1,672	1,672	1,672	0,000	14	1,725	1,772	1,748	0,033	0,076
15	1,740	1,756	1,748	0,011	15	1,537	1,702	1,619	0,117	-0,129
16	0,903	1,000	0,952	0,069	16	0,875	0,875	0,875	0,000	-0,076
17	2,025	2,072	2,049	0,033	17	1,893	2,038	1,966	0,102	-0,083
18	1,279	1,580	1,429	0,213	18	1,250	1,283	1,267	0,023	-0,162
19	1,477	1,255	1,366	0,157	19	1,045	1,137	1,091	0,065	-0,275
20	0,954	1,462	1,208	0,359	20	1,632	1,537	1,585	0,068	0,376
21	0,954	1,146	1,050	0,136	21	1,215	1,045	1,130	0,120	0,080
22	1,613	1,690	1,651	0,055	22	1,656	1,679	1,668	0,016	0,016
23	1,505	1,724	1,615	0,155	23	1,795	1,772	1,783	0,017	0,169
24	1,914	1,978	1,946	0,045	24	1,819	1,868	1,843	0,035	-0,102

q= 24  
n= 2  
N=qn= 48

**Mx=** 1,529  
**MEDx=** 1,601  
**SDbx=** 0,325  
**MEDwx=** 0,050  
**SDwx=** 0,113  
**rob. SDwx=** 0,074

**My=** 1,522  
**MEDy=** 1,602  
**SDby=** 0,354  
**MEDwy=** 0,066  
**SDwy=** 0,089  
**rob. SDwy=** 0,098

**M=** -0,007  
**MED=** 0,014  
Biais

**Choix de la méthode**

GMFR

**R=** 0,794  
**rob. R=** 1,319

**Sx=** 0,332  
**Sy=** 0,356

**r=** 0,758  
**b=** 1,073  
**a=** -0,118

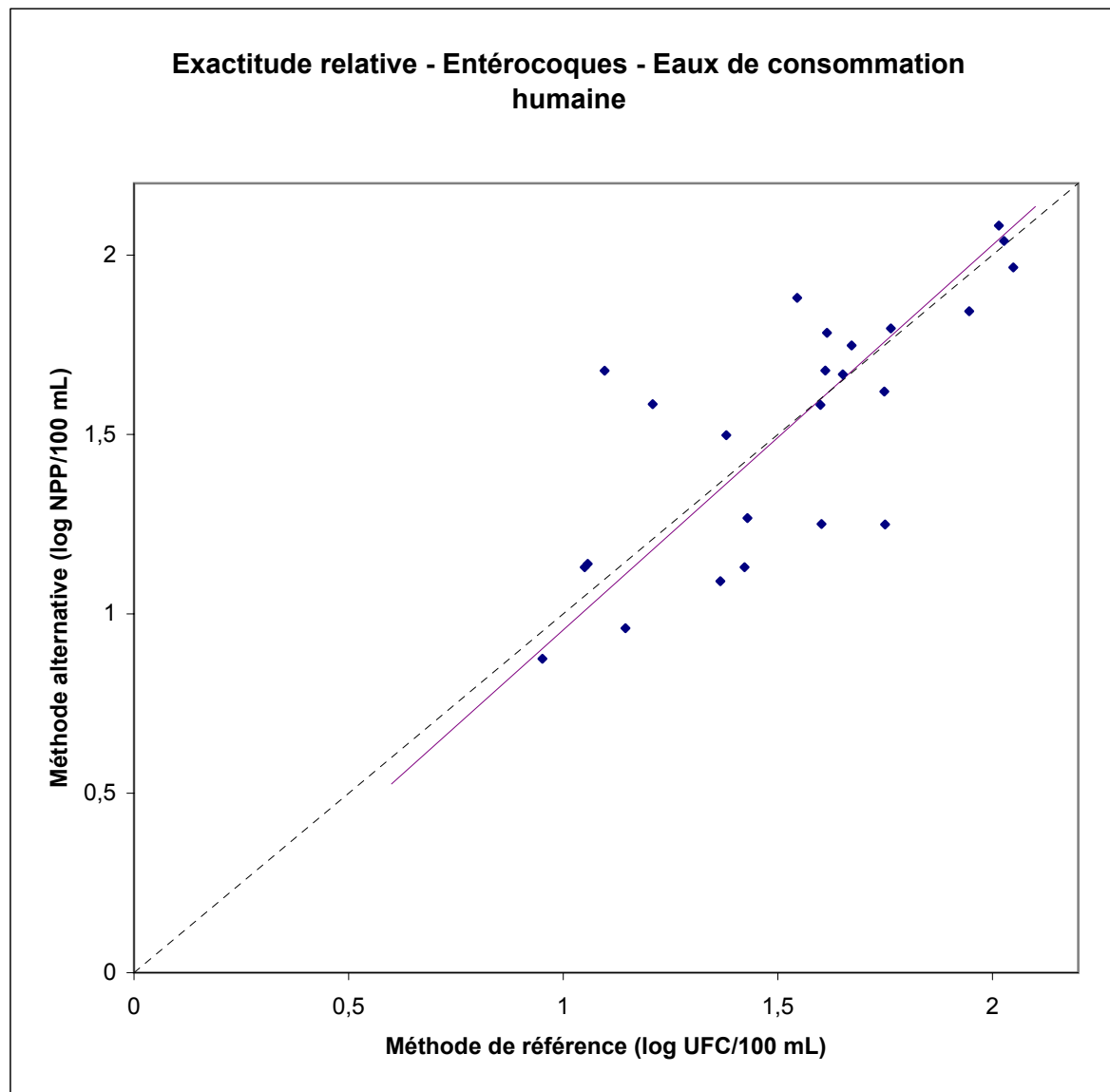
**Res. SEM=** 0,250  
**Res. SD=** 0,353

**S(b)=** 0,157      **p(t;b=1)=** 0,645      **t(b)=** 0,464  
**S(a)=** 0,347      **p(t;a=0)=** 0,735      **t(a)=** 0,340

Répétabilité	Méthode de référence	Méthode alternative
r	0,315	0,250
rob. r	0,207	0,274

Est. y	Dév.
1,058	0,620
1,759	-0,510
1,362	0,136
1,610	0,068
1,110	-0,150
1,408	-0,278
1,539	0,341
2,057	-0,017
1,601	-0,350
1,598	-0,015
2,044	0,039
1,016	0,124
1,774	0,022
1,676	0,072
1,757	-0,138
0,903	-0,028
2,080	-0,114
1,415	-0,148
1,348	-0,257
1,178	0,406
1,009	0,121
1,654	0,014
1,614	0,169
1,969	-0,126

Les points représentés correspondent aux moyennes des répétitions de chaque échantillon



**ANNEXE 5**

**LINEARITE**

**DONNEES BRUTES ET CALCULS STATISTIQUES**

## Linéarité - Résultats bruts

N° d'échantillon	Matrice	Méthode de référence						Méthode alternative					
		R1			R2			R1			R2		
		Nombre de colonies sur Slanetz et Bartley	Nombre de colonies esculine + sur BEA	log	Nombre de colonies sur Slanetz et Bartley	Nombre de colonies esculine + sur BEA	log	Nombre puits jaunes	NPP / 100 mL	log	Nombre puits jaunes	NPP / 100 mL	log
ENTC.1.2	Eau de distribution	5	5	0,699	3	3	0,477	5	5,3	0,724	4	4,2	0,623
		25	25	1,398	19	19	1,279	17	20,7	1,316	15	17,8	1,250
		32	32	1,505	38	38	1,580	20	25,4	1,405	23	30,6	1,486
		63	63	1,799	67	67	1,826	31	47,8	1,679	33	53,1	1,725
		76	76	1,881	108	108	2,033	44	101,3	2,006	42	88,5	1,947

## Linéarité - Entérocoques - Eau de distribution - Données brutes

Niveau
1
2
3
4
5

Méthode de référence			
Rep.1	Rep.2	M	SD
5	3	4,0	1,414
25	19	22,0	4,243
32	38	35,0	4,243
63	67	65,0	2,828
76	108	92,0	22,627

Méthode alternative			
Rep.1	Rep.2	M	SD
5,3	4,2	4,8	0,778
20,7	17,8	19,3	2,051
25,4	30,6	28,0	3,677
47,8	53,1	50,5	3,748
101,3	88,5	94,9	9,051

**q** = 5  
**n** = 2  
**N = qn** = 10

**Mx** = 43,600  
**MEDx** = 35,000  
**SDbx** = 35,033

**My** = 39,470  
**MEDy** = 28,000  
**SDby** = 35,139

**MEDwx** = 4,243  
**SDwx** = 7,470  
**rob. SDwx** = 6,290

**MEDwy** = 3,677  
**SDwy** = 3,381  
**rob. SDwy** = 5,451

### Choix méthode GMFR

**R** = 0,453  
**rob.R** = 0,867  
**Res.SEM** = 7,972  
**Res.SD** = 11,273

**Sx** = 33,955  
**Sy** = 33,320

Est y	Déviation
0,610	4,140
18,274	0,976
31,031	-3,031
60,470	-10,020
86,965	7,935

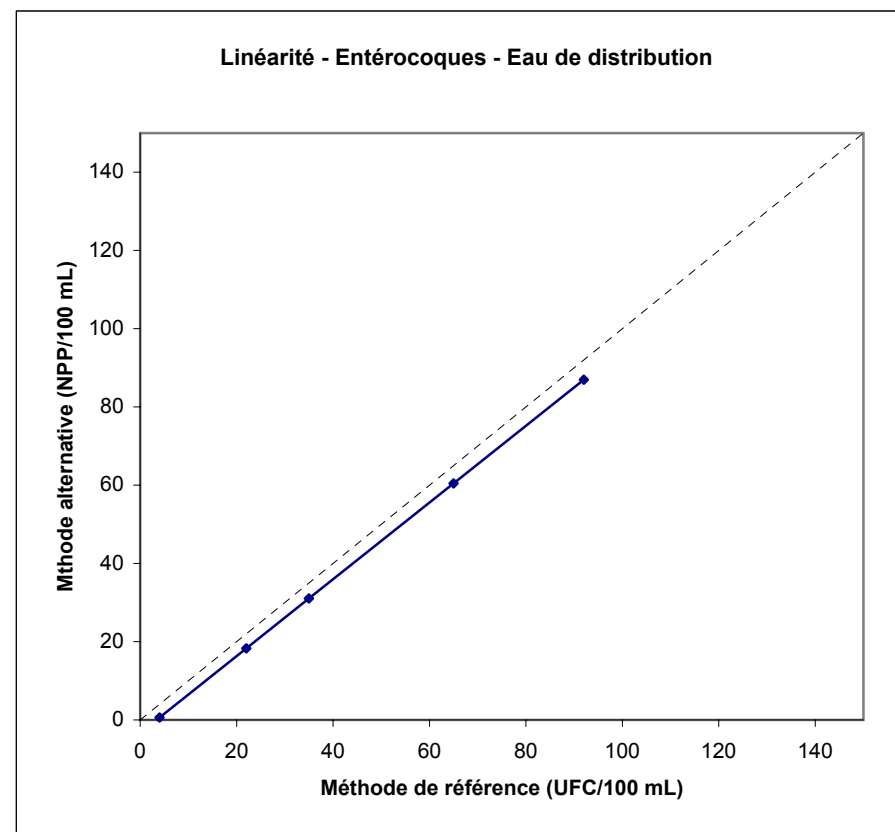
**r** = 0,981  
**b** = 0,981  
**a** = -3,315

**Sb** = 0,117     **p(t;b=1)** = 0,877     **t (b)** = 0,159  
**Sa** = 6,237     **p(t;a=0)** = 0,610     **t (a)** = 0,692

### Linéarité

**F** = 27,985  
**rob.F** = 9,737

**p(F)** = 0,001  
**rob.p(F)** = 0,016



## Linéarité - Entérocoques - Eau de distribution - Données en log

Niveau
1
2
3
4
5

Méthode de référence			
Rep.1	Rep.2	M	SD
0,699	0,477	0,6	0,157
1,398	1,279	1,3	0,084
1,505	1,580	1,5	0,053
1,799	1,826	1,8	0,019
1,881	2,033	2,0	0,108

Méthode alternative			
Rep.1	Rep.2	M	SD
0,724	0,623	0,7	0,071
1,316	1,250	1,3	0,046
1,405	1,486	1,4	0,057
1,679	1,725	1,7	0,032
2,006	1,947	2,0	0,041

**q** = 5  
**n** = 2  
**N = qn** = 10

**Mx** = 1,448  
**MEDx** = 1,542  
**SDbx** = 0,537

**My** = 1,416  
**MEDy** = 1,445  
**SDby** = 0,491

**MEDwx** = 0,084  
**SDwx** = 0,068  
**rob. SDwx** = 0,125

**MEDwy** = 0,046  
**SDwy** = 0,036  
**rob. SDwy** = 0,069

### Choix méthode

#### GMFR

**R** = 0,535  
**rob.R** = 0,550  
**Res.SEM** = 0,076  
**Res.SD** = 0,108

**Sx** = 0,511  
**Sy** = 0,465

Est y	Déviatiion
0,635	0,039
1,317	-0,034
1,502	-0,057
1,748	-0,046
1,879	0,097

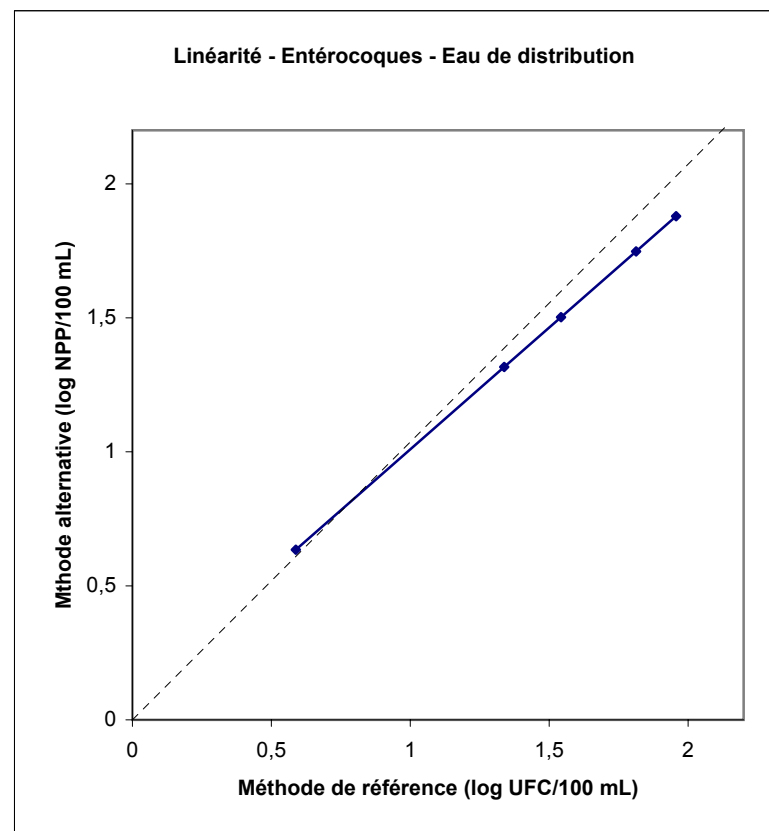
**r** = 0,991  
**b** = 0,909  
**a** = 0,100

**Sb** = 0,075    **p(t;b=1)** = 0,257    **t (b)** = 1,220  
**Sa** = 0,113    **p(t;a=0)** = 0,403    **t (a)** = 7,956

### Linéarité

**F** = 21,628    **p(F)** = 0,003  
**rob.F** = 4,887    **rob.p(F)** = 0,060

21,6276117





**ANNEXE 6**

**LOD-LOQ**

**DONNEES BRUTES ET CALCULS STATISTIQUES**

## **Limite de détection (LOD) et Limite de quantification (LOQ)**

### **Résultats bruts**

#### **Souche : *Enterococcus faecalis***

Taux visé (UFC/ 100mL)	Taux réel (UFC/ 100mL) (a)	Réplicats					
		1	2	3	4	5	6
		Détection entérocoque (UFC/ 100mL)	Détection entérocoque (UFC/ 100mL)	Détection entérocoque (UFC/ 100mL)	Détection entérocoque (UFC/ 100mL)	Détection entérocoque (UFC/ 100mL)	Détection entérocoque (UFC/ 100mL)
0	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,3	0,233	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,6	0,500	1,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0
1	0,967	1,0	1,0	1,0	2,0	0,0	2,0
2	1,700	0,0	0,0	1,0	4,2	1,0	2,0
3	3,467	4,2	6,4	5,3	2,0	6,4	1,0

(a): taux calculé à partir de 30 dénombrements

**ANNEXE 7**

**SELECTIVITE**  
**DONNEES BRUTES**

## Inclusivité

N°	Code	Espèce	Origine	Taux d'inoculation (UFC/100 mL)	Nombre de puits jaunes	Résultat (NPP/100 mL)
1	ENTC.1.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 33186	25	31	47,8
2	ENTC.1.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 103214	20	13	15
3	ENTC.1.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	Eau de rivière	30	25	34,4
4	ENTC.1.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	Eau de surface	27	31	47,8
5	ENTC.1.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	Eau de surface	31	27	38,4
6	ENTC.1.7	<i>Enterococcus faecalis</i>	Eau de surface	26	17	20,7
7	ENTC.1.8	<i>Enterococcus faecalis</i>	Eau de rivière	23	12	13,7
8	ENTC.1.9	<i>Enterococcus faecalis</i>	Eau de rivière	25	19	23,8
9	ENTC.1.10	<i>Enterococcus faecalis</i>	Eau de rivière	35	21	27,1
10	ENTC.1.11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Eau de rivière	24	24	32,4
11	ENTC.1.12	<i>Enterococcus faecalis</i>	Eau de rivière	26	35	59,1
12	ENTC.2.1	<i>Enterococcus faecium</i>	industrie laitière	19	7	7,5
13	ENTC.2.2	<i>Enterococcus faecium</i>	Environnement aquatique	15	9	9,9
14	ENTC.2.4	<i>Enterococcus faecium</i>	Eau de surface	10	16	19,2
15	ENTC.2.5	<i>Enterococcus faecium</i>	Eau de surface	6	12	13,7
16	ENTC.2.6	<i>Enterococcus faecium</i>	Eau de surface	11	8	8,7
17	ENTC.2.7	<i>Enterococcus faecium</i>	Eau de rivière	19	11	12,4
18	ENTC.2.8	<i>Enterococcus faecium</i>	Eau de rivière	9	8	8,7
19	ENTC.2.9	<i>Enterococcus faecium</i>	Eau de rivière	20	10	11,1
20	ENTC.6.1	<i>Enterococcus durans</i>	Eau de surface	8	35	59,1
21	ENTC.6.2	<i>Enterococcus durans</i>	Eau de rivière	31	15	17,8
22	ENTC.4.1	<i>Enterococcus avium</i>	Eau (Allemagne)	31	24	32,4
23	ENTC.5.1	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Eau de rivière	16	10	11,1
24	ENTC.5.2	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Eau de rivière	9	10	11,1
25	ENTC.5.3	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Eau d'effluent	12	3	3,1
26	ENTC.3.1	<i>Enterococcus hirae</i>	CIP 58.55	35	32	50,4
27	ENTC.3.2	<i>Enterococcus hirae</i>	Eau de rivière	21	22	28,8
28	ENTC.7.1	<i>Enterococcus casselifavus</i>	Eau de rivière	16	15	17,8
29	ENTC.7.2	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Eau de rivière	6	3	3,1
30	ENTC.7.3	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Eau de rivière	18	15	17,8

## Exclusivité

N°	Code	Espèce	Origine	Taux d'inoculation (UFC/100 mL)	Nombre de puits jaunes	Résultat (NPP/100 mL)
1	AERC.1.1	<i>Aerococcus viridans</i>	CIP 54.145	1,1E+04	0	<1
2	AUR.1.1	<i>Aureobacterium saperdae</i>	Evaporateur	3,4E+04	0	<1
3	LACC.1.1	<i>Lactococcus lactis</i>	Souche de collection	2,6E+04	0	<1
4	MIC.1.2	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 4698	1,0E+04	0	<1
5	MIC.2.2	<i>Micrococcus spp</i>	Eau de surface	2,3E+04	0	<1
6	MIC.2.3	<i>Micrococcus spp</i>	Eau de surface	3,8E+04	0	<1
7	STA.1.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	Eaux superficielles	2,3E+06	0	<1
8	STA.5.1	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Eau de surface	5,6E+04	0	<1
9	STA.6.1	<i>Staphylococcus capitis</i>	Eau de surface	3,3E+04	0	<1
10	STA.2.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Eau de surface	2,5E+04	0	<1
11	STA.7.1	<i>Staphylococcus sciuri</i>	Eau de surface	1,1E+04	0	<1
12	STA.2.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Produit laitier	1,0E+05	0	<1
13	STA.3.2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Eau de surface	1,0E+04	0	<1
14	STA.4.1	<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	Evaporateur	2,3E+04	0	<1
15	PED.1.1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Souche de collection	1,9E+04	0	<1
16	PED.1.2	<i>Pediococcus spp</i>	Eau de surface	2,0E+04	0	<1
17	RHO.1.1	<i>Rhodococcus equi</i>	Souche de collection	1,3E+04	0	<1
18	BAC.2.1	<i>Bacillus circulans</i>	Industrie laitière	1,7E+05	0	<1
19	BAC.4.2	<i>Bacillus subtilis</i>	CIP 52.65 T	1,2E+04	0	<1
20	BAC.1.4	<i>Bacillus cereus</i>	Souche de collection suédoise SIK 281	1,0E+05	0	<1
21	STE.1.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Eau de fontaine	1,0E+05	0	<1
22	AER.1.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Eau de puits	1,8E+04	0	<1
23	PSE.1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Eau de fontaine	1,5E+04	0	<1
24	ACI.2.1	<i>Acinetobacter cloacae</i>	Eau de la Seine	1,2E+04	0	<1
25	RAH.1.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	Eau (Seine)	1,0E+06	0	<1
26	ESC.1.120	<i>Escherichia coli</i>	Eau (Angleterre)	1,0E+06	0	<1
27	PRO.1.2	<i>Proteus mirabilis</i>	Eau	1,0E+04	0	<1
28	ENTB.2.2	<i>Enterobacter cloacae</i>	Eau de puits	1,0E+04	0	<1
29	PROV.1.1	<i>Providencia stuartii</i>	HPA RM	1,0E+04	0	<1
30	XAN.1.1	<i>Xanthomonas campestris</i>	Evaporateur	5,3E+04	0	<1

## **Annexe 8 - Dénombrement de la flore totale**

<b>Laboratoire</b>	<b>Résultat (UFC/mL) à 22°C</b>	<b>Résultat (UFC/mL) à 36°C</b>
A	124	<1
B	79	4
C	142	30
D	145	8
F	102	11
G	142	7
H	100	7
I	108	5
J	112	3
K	99	6
L	99	9
M	105	2

## **Annexe 9 - Résultats bruts**

Résultats en UFC/100 mL pour la méthode de référence et en NPP/100 mL pour la méthode alternative

### **Niveau 0**

Laboratoire	Méthode de référence - Echantillons						Méthode alternative - Echantillons					
	1			8			1			8		
	Nombre de colonies typiques	Résultat après confirmation	Résultat logarithmique	Nombre de colonies typiques	Résultat après confirmation	Résultat logarithmique	Nombre de puits positifs	Résultat	Résultat logarithmique	Nombre de puits positifs	Résultat	Résultat logarithmique
A	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
B	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
C	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
D	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
F	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
G	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
H	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
I	0	<1	0	2	<1	0	0	0	0	0	0	0
J	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
K	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
L	77	<1	0	4	<1	0	0	0	0	0	0	0
M	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
Expert	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0

### **Niveau 1**

Laboratoire	Méthode de référence - Echantillons						Méthode alternative - Echantillons					
	2			5			2			5		
	Nombre de colonies typiques	Résultat après confirmation	Résultat logarithmique	Nombre de colonies typiques	Résultat après confirmation	Résultat logarithmique	Nombre de puits positifs	Résultat	Résultat logarithmique	Nombre de puits positifs	Résultat	Résultat logarithmique
A	26	26	1,415	23	23	1,362	11	12	1,079	14	16	1,204
B	16	16	1,204	23	23	1,362	23	31	1,491	14	16	1,204
C	20	20	1,301	20	20	1,301	14	16	1,204	18	22	1,342
D	24	24	1,380	19	19	1,279	25	34	1,531	16	19	1,279
F	27	27	1,431	18	18	1,255	22	29	1,462	17	21	1,322
G	22	22	1,342	13	13	1,114	25	34	1,531	19	24	1,380
H	32	32	1,505	20	20	1,301	15	18	1,255	13	15	1,176
I	23	23	1,362	21	21	1,322	22	29	1,462	18	22	1,342
J	26	26	1,415	28	28	1,447	13	15	1,176	18	22	1,342
K	26	26	1,415	12	12	1,079	17	21	1,322	17	21	1,322
L	19	19	1,279	25	21	1,322	18	22	1,342	22	29	1,462
M	26	26	1,415	35	35	1,544	16	19	1,279	22	29	1,462
Expert	18	18	1,255	17	17	1,230	18	22	1,342	18	22	1,342

### Niveau 2

Laboratoire	Méthode de référence - Echantillons						Méthode alternative - Echantillons					
	4			7			4			7		
	Nombre de colonies typiques	Résultat après confirmation	Résultat logarithmique	Nombre de colonies typiques	Résultat après confirmation	Résultat logarithmique	Nombre de puits positifs	Résultat	Résultat logarithmique	Nombre de puits positifs	Résultat	Résultat logarithmique
A	55	55	1,740	56	56	1,748	27	38	1,580	35	59	1,771
B	37	37	1,568	41	41	1,613	38	70	1,845	35	59	1,771
C	52	52	1,716	64	64	1,806	36	62	1,792	35	59	1,771
D	52	52	1,716	64	64	1,806	35	59	1,771	38	70	1,845
F	76	76	1,881	71	71	1,851	32	50	1,699	37	66	1,820
G	52	52	1,716	45	45	1,653	40	78	1,892	39	74	1,869
H	62	62	1,792	68	68	1,833	36	62	1,792	34	56	1,748
I	53	53	1,724	55	55	1,740	35	59	1,771	40	78	1,892
J	64	64	1,806	68	68	1,833	38	70	1,845	42	89	1,949
K	63	63	1,799	63	63	1,799	31	48	1,681	29	43	1,633
L	69	45	1,653	67	58	1,763	29	43	1,633	29	43	1,633
M	63	63	1,799	58	58	1,763	34	56	1,748	38	70	1,845
Expert	57	57	1,756	55	55	1,740	34	56	1,748	35	59	1,771

### Niveau 3

Laboratoire	Méthode de référence - Echantillons						Méthode alternative - Echantillons					
	3			6			3			6		
	Nombre de colonies typiques	Résultat après confirmation	Résultat logarithmique	Nombre de colonies typiques	Résultat après confirmation	Résultat logarithmique	Nombre de puits positifs	Résultat	Résultat logarithmique	Nombre de puits positifs	Résultat	Résultat logarithmique
A	100	100	2,000	90	90	1,954	42	89	1,949	44	101	2,004
B	59	59	1,771	88	88	1,944	43	95	1,978	42	89	1,949
C	86	86	1,934	82	82	1,914	44	101	2,004	44	101	2,004
D	102	102	2,009	121	121	2,083	47	130	2,114	46	118	2,072
F	116	116	2,064	95	95	1,978	40	78	1,892	45	109	2,037
G	101	101	2,004	105	105	2,021	45	109	2,037	46	118	2,072
H	92	92	1,964	87	87	1,940	36	62	1,792	48	145	2,161
I	86	86	1,934	96	96	1,982	43	95	1,978	43	95	1,978
J	94	94	1,973	94	94	1,973	42	89	1,949	47	130	2,114
K	96	96	1,982	87	87	1,940	43	95	1,978	48	145	2,161
L	95	84	1,924	98	98	1,991	40	78	1,892	41	83	1,919
M	96	96	1,982	100	100	2,000	42	89	1,949	46	118	2,072
Expert	108	108	2,033	96	96	1,982	48	145	2,161	43	95	1,978