

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Équivalence du test
de potabilité des eaux
Colilert[®]-18/Quanti-Tray[®]
pour la recherche
et le dénombrement
des *Escherichia coli* et
des bactéries coliformes
dans les eaux destinées à
la consommation humaine
par rapport à la méthode
de référence
NF EN ISO 9308-1 : 2000

Note d'appui scientifique et technique
Rapport d'expertise de laboratoire

Avril 2018

Édition scientifique

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Équivalence du test
de potabilité des eaux
Colilert[®]-18/Quanti-Tray[®]
pour la recherche
et le dénombrement
des *Escherichia coli* et
des bactéries coliformes
dans les eaux destinées à
la consommation humaine
par rapport à la méthode
de référence
NF EN ISO 9308-1 : 2000

Note d'appui scientifique et technique
Rapport d'expertise de laboratoire

Avril 2018

Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 4 avril 2018

NOTE
d'appui scientifique et technique
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à « Equivalence du test de potabilité des eaux Colilert®-18/Quanti-Tray® pour la recherche et le dénombrement des Escherichia coli (E. coli) et des bactéries coliformes dans les eaux destinées à la consommation humaine par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000 »

Dans le cadre de son mandat de laboratoire national de référence, le Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN) de l'Anses a été saisi le 25 mai 2010 par la Direction Générale de la Santé (DGS) d'une demande d'appui scientifique et technique (n°100019) relative à l'équivalence du test de potabilité des eaux Colilert®-18/Quanti-Tray® pour la recherche et le dénombrement des Escherichia coli (E. coli) et des bactéries coliformes dans les eaux destinées à la consommation humaine par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

La demande de cette saisine vise à s'assurer de l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® de la société Idexx vis-à-vis de la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000 sur le territoire français, conformément au principe de la directive européenne 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

Pour examiner cette équivalence, le LHN a suivi les recommandations du groupe consultatif d'experts, l'European Microbiology Group (EMG) mandaté par la Direction générale de l'Environnement de la Commission Européenne en employant la norme internationale NF EN ISO 17994 : 2004, « Qualité de l'Eau - Critères pour établir l'équivalence entre les méthodes microbiologiques ».

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

L'expertise a été réalisée par le Laboratoire d'hydrologie de Nancy dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) » par une expertise de type institutionnelle dans le cadre de son mandat de laboratoire national de référence.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques via le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

Pour répondre à la demande du Ministère chargé de la Santé, le LHN a proposé de procéder en deux temps.

Dans un premier temps, le LHN a examiné les documents concernant les études d'équivalence que la société Idexx a transmis à la DGS pour attester de sa reconnaissance d'équivalence. Cette première évaluation visait à vérifier que les informations de ces documents répondaient à l'ensemble des exigences et critères de la norme NF EN ISO 17994 : 2004. Cette expertise documentaire a fait l'objet d'un premier rapport transmis en octobre 2010. La conclusion de l'expertise documentaire établie à partir des documents fournis, pour apprécier le principe d'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® vis-à-vis de la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000 n'a pas permis d'apporter une conclusion sur l'applicabilité de la méthode alternative avec les eaux du territoire français, conformément aux principes établis dans la norme NF EN ISO 17994 : 2004 et les recommandations du groupe EMG. La lacune la plus importante concernait les différents types d'eaux soumises au test, pour les études qui respectaient au mieux le protocole de la norme NF EN ISO 17994 : 2004 et le protocole allégé conformément aux recommandations du groupe EMG.

Compte tenu de la conclusion de l'expertise documentaire, et en réponse à la demande de la saisine, le laboratoire d'hydrologie de l'Anses a conduit une étude complémentaire d'équivalence selon le référentiel international NF EN ISO 17994 : 2004 et des recommandations du groupe EMG. Cette étude constituait la deuxième étape de la saisine. Cette étude complémentaire devait permettre, sur la base des données obtenues, de statuer sur l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® vis-à-vis de la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000. Les conclusions de cette étude ne préjugeront pas de l'avis de l'Anses, qui sera saisie pour l'éventuelle modification de l'arrêté du 17 mars 2003 relatifs aux méthodes d'analyses et à leurs caractéristiques de performance, conformément à l'article 1321-21 du code de la santé publique.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS

Cette étude avait pour objectif de prouver l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1 sur des échantillons hydriques représentatifs d'eaux traitées et distribuées sur le territoire Français. La démarche retenue a consisté à suivre le référentiel normatif NF EN ISO 17994 recommandé par le groupe EMG. Cette norme a été employée dans différentes études d'équivalences menées par d'autres états membres de la Communauté européenne. L'évaluation de l'équivalence a été opérée sur plus de 200 échantillons provenant, pour un quart, de sites naturellement contaminés en bactéries coliformes et en bactéries *Escherichia coli* et, pour le reste, artificiellement contaminés par des eaux de surfaces ou des eaux issues de rejets de STEP contenant la population bactérienne ciblée.

La sélection des échantillons a été opérée en tenant compte de différents critères (type de ressource, traitement, taille des stations, couverture nationale...) au travers de la base nationale SISE-Eaux, de manière à être représentative des eaux produites au niveau du territoire. La participation de 9 laboratoires formés spécialement à la réalisation de cette étude et répartis géographiquement dans les régions françaises a permis de tester la robustesse de la méthode. L'utilisation d'échantillons provenant de sites naturellement contaminés avait pour objectif de tester les deux méthodes dans des conditions proches de celles rencontrées lors de la réalisation d'analyses entrant dans le contrôle sanitaire. Ces échantillons ont permis de vérifier que le domaine d'application des méthodes évaluées était en adéquation avec la nature des échantillons à analyser. Il faut souligner qu'il existe à ce jour très peu de résultats d'évaluation menée sur ce type d'échantillons dans les dossiers d'équivalence soumis à la Direction Générale de l'Environnement (DG env). Ce type d'échantillon est rare et de ce fait complexe à sélectionner. Il est le plus souvent employé des échantillons d'eaux qui sont artificiellement contaminés par le biais d'eaux environnementales contenant les bactéries à cibler. Ces derniers micro-organismes sont préalablement soumis, le plus souvent, à un traitement au chlore, de manière à « simuler » les situations pouvant être retrouvées sur le terrain. Il faut signaler qu'il a été constaté par plusieurs auteurs que l'origine des eaux, ou encore l'application ou non d'une étape supplémentaire visant à soumettre la population bactérienne à un stress, pouvait avoir une influence sur le résultat final du test. De manière à

mettre en évidence un effet lié à la préparation des échantillons, il a été systématiquement présenté dans cette étude les résultats de l'évaluation statistique comparative établie soit à partir des résultats de dénombrement provenant des échantillons regroupés (échantillons naturellement contaminés de la phase 2 + échantillons artificiellement dopés de la phase 3), soit tenant compte des données de dénombrements de chaque groupe d'échantillons à disposition (échantillons phase 2 ou échantillons de la phase 3).

En terme de résultats, il a été clairement démontré, concernant les bactéries coliformes que la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® offrait un rendement de détection nettement plus important que la méthode NF EN ISO 9308-1 sur l'ensemble des échantillons analysés. Ainsi un rendement supérieur de plus de 41% a été déterminé pour ce groupe de bactéries. Les résultats obtenus dans cette étude sont globalement concordants avec les tendances décrites dans divers dossiers publiés au niveau européen. Comme nous l'avons précisé dans le chapitre 3.1.1, cette tendance pourrait être expliquée par une meilleure revivification des bactéries dans le milieu liquide chromogénique ou par la présence d'une flore interférente pouvant gêner le rendement de la méthode NF EN ISO 9308-1. Sur les échantillons provenant de sites contaminés (phase 2), une variabilité dans les résultats plus importante a été mesurée. Pour ces échantillons, l'équivalence est également confirmée et les deux méthodes s'avèrent équivalente. Ces différents résultats nous permettent de conclure en l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1 sur les différentes eaux représentatives testées pour la détection des bactéries coliformes.

Pour *Escherichia coli*, les résultats d'évaluation sont plus contrastés et dépendent globalement des échantillons exploités dans l'analyse statistique, mais aussi d'un point de vue méthodologique, des tests employés pour confirmer leur présence dans les échantillons hydriques.

En première instance, l'étude d'équivalence menée sur les échantillons de la phase 2 et de la phase 3 selon le référentiel NF EN ISO 17994 :2004 a conclu que la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® n'était pas équivalente à la méthode NF EN ISO 9308-1 de part des dénombrements de bactéries plus faibles à ceux obtenus par la méthode de référence. Ces résultats sont globalement discordants avec ceux obtenus dans plusieurs dossiers d'autres états membres, qui ont démontré l'équivalence de la méthode. En revanche, ils sont très similaires à ceux publiés dans le dossier espagnol, dossier qui s'avère être à ce jour le dossier le plus complet dans ce domaine.

Il a été constaté que la tendance négative mesurée lors des tests statistiques était liée à une surestimation du nombre de bactéries *Escherichia coli* par la norme NF EN ISO 9308-1 dans les échantillons testés. L'ajout de tests supplémentaires visant à prouver chez les bactéries « indole positive » la présence d'une activité β -D-glucuronidase et, en conséquence, la correction des résultats des dénombrements après révélation de cette activité, a conduit à ne plus pouvoir conclure quant à la tendance du test statistique établi sur l'ensemble des échantillons. La notion de surestimation par la norme NF EN ISO 9308-1 des bactéries *Escherichia coli* est évoquée dans un rectificatif technique élaboré par le comité technique ISO/TC147 en 2007. Elle serait due à la présence de souches de *Klebsiella oxytoca* qui sont thermotolérantes et qui peuvent donner une réaction positive à l'Indole. De manière à minimiser ces faux positifs, ce groupe technique recommande la réalisation de tests supplémentaires β -D-glucuronidase. L'utilisation de tels tests n'est pas préconisée par le groupe EMG. Le même constat de surestimation a été relayé dans divers dossiers d'équivalence soumis à la DG ENV. Dans le dossier espagnol, les résultats obtenus après la réalisation de ces tests (basés sur la révélation du caractère de l'activité β -D-glucuronidase) sur un pool de colonies en association avec la recherche du phénotype des bactéries isolées par la réalisation de galeries miniaturisées, ont suffi à justifier la preuve de l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1 en dépit de la conclusion négative obtenue en premier lieu. Dans cette étude, l'ajout de tests supplémentaires opérés systématiquement par les laboratoires participants sur tous les échantillons analysés par la norme de référence NF EN ISO 9308-1 et sur au moins 3 colonies *Escherichia coli* détectées, a permis de corriger tous les résultats de dénombrement à disposition et donc de les exploiter statistiquement. Bien évidemment, il peut être regretté qu'un nombre restreint de colonies *Escherichia*

coli aient été testées, ce qui peut avoir introduit une imprécision dans le dénombrement de la méthode normative NF EN ISO 9308-1.

En réalité nous avons constaté, à partir des données d'identification obtenues par spectrométrie de masse ou par galeries miniaturisées sur les bactéries isolées en se basant uniquement sur le résultat des tests utilisés dans le principe de chaque méthode (bactéries Indole positive pour la norme de référence et bactérie β -D-glucuronidase positive pour la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®), que les deux méthodes étaient susceptibles de surestimer le nombre de bactéries *Escherichia coli* avec une tendance plus importante pour la méthode normative (21,1% versus 31,8% respectivement pour la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® et NF EN ISO 9308-1).

Il faut préciser que si l'ajout de tests supplémentaires révélant l'activité de la β -D-glucuronidase permet de mettre en place une seconde étape de confirmation au niveau des bactéries isolées par la norme de référence limitant dès lors la surestimation, il peut être envisagé qu'inversement ces tests conduisent à invalider injustement la présence de bactéries *Escherichia coli* détectées par la norme et qui ne présentent pas d'activité β -D-glucuronidase. Dans l'environnement, il existe au sein des espèces *Escherichia coli*, des phénotypes n'exprimant pas d'activité β -D-glucuronidase. L'exemple le plus représentatif est celui des *Escherichia coli* entérohémorragique productrices de shigatoxines qui sont des bactéries *Escherichia coli* présentes dans les milieux hydriques environnementaux. Ces bactéries seraient dès lors assimilées à des coliformes ce qui entraînerait dans ce cas particulier une réelle sous-estimation de risque stricto sensu si elles venaient à être présentes dans les eaux. La notion de sous-estimation de ces bactéries est clairement abordée dans le domaine d'application de la nouvelle norme ISO 9308-2 dont le principe est basé sur la méthode évaluée dans ce dossier.

La notion de sous-estimation du nombre de bactéries *Escherichia coli*, et donc par voie de conséquence l'obtention de résultats pouvant sous-estimer un risque en terme sanitaire, est peu abordée dans les dossiers européens. A partir des données d'identification des bactéries isolées par les deux méthodes et en tenant compte des résultats des différents tests effectués, il a été démontré que les deux méthodes évaluées étaient susceptibles de sous-estimer un pool de bactéries *Escherichia coli* présentes dans les échantillons avec une tendance légèrement plus importante pour la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (8,9% versus 4,5% pour la méthode NF EN ISO 9308-1). Il faut être relativement prudent sur les pourcentages exprimés ci-dessus puisqu'ils tiennent compte de données d'identification et des résultats des différents tests opérés au travers de chaque méthodologie. La proportion de bactéries *Escherichia coli* présentant des caractéristiques phénotypiques faisant qu'elles seront sous-estimées par les tests mises en place dans les deux méthodologies est dans l'environnement peu connue et reste à ce jour globalement très controversée par la communauté scientifique.

Concernant plus spécifiquement les échantillons provenant de sites contaminés (échantillon de phase 2), on constate que, même après correction des données de dénombrements obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1 par l'ajout de tests révélant l'activité de la β -D-glucuronidase, que la tendance du test statistique reste inchangée. Sur ces échantillons, la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® procure des dénombrements inférieurs. Nous avons démontré que cette tendance était liée à une sous-estimation du nombre de bactéries *Escherichia coli* décelées dans ce type échantillons sans pour autant expliquer les raisons de ce constat. Inversement, pour les échantillons de la phase 3 artificiellement dopés avec les solutions bactériennes ciblées stressées, provenant d'eaux de surfaces ou d'eaux de rejets de STEP, la proportion d'échantillons dans lesquels une sous-estimation se produit est équivalente lorsque les valeurs de dénombrement obtenues par la norme de référence ne sont pas corrigées et s'inverse en défaveur de la norme après correction de ces derniers. Ces résultats discordants selon le type d'échantillons traduisent très certainement la présence de populations bactériennes présentant des phénotypes différents.

Au travers de cette étude nous avons constaté que les jeux de données de dénombrements déséquilibrés (résultats de dénombrements nuls obtenus par une des deux méthodes), quelle que soit la méthode prise en référence, pouvaient s'avérer être problématiques dans la conclusion du test statistique. Bien que ces données permettent de qualifier la robustesse de chaque méthode évaluée dans des conditions opératoires proches de celles rencontrées sur le terrain, ce type de jeux ne permet

pas de caractériser précisément l'étendue de la différence relative mesurée sur les populations ciblées présentes dans chaque échantillon testé, et donc au final, d'évaluer la performance de chaque méthode. Au niveau des dossiers européens la proportion d'échantillons générant des dénombrements déséquilibrés n'est pas indiquée. Les données brutes ne sont pas systématiquement retranscrites dans les études publiées et seules les différences relatives moyennées sont communiquées. Comme nous l'avons précédemment évoqué, il est presque inévitable sur les bactéries *Escherichia coli* qui constituent une sous population du groupe vaste des coliformes, d'obtenir de telles données. Pour ces bactéries, l'obtention d'une valeur cible prédéfinie est complexe à atteindre car elle est dépendante de la proportion du dopage d'ensemencement (volume/volume) avec les eaux environnementales utilisées. Pour obtenir une valeur cible importante, il aurait été nécessaire d'accentuer cette proportion de dopage avec le risque, pour la suite de l'évaluation, d'augmenter la flore bactérienne interférente pouvant avoir un impact sur le rendement d'une des deux méthodes et donc par conséquent biaiser l'étude d'évaluation. L'utilisation de solutions pures contenant des bactéries *Escherichia coli* aurait pu résoudre ce problème. Or pour rappel l'utilisation de solution pure est à proscrire, voire à employer en dernier ressort dans les études d'évaluation d'équivalence, car elles ne sont pas représentatives des bactéries retrouvées dans l'environnement.

De manière à nous placer dans une démarche d'évaluation comparative « stricte » en utilisant des échantillons contenant les bactéries ciblées, révélées par les deux méthodes, il a été décidé finalement d'exclure volontairement de l'analyse statistique les jeux de dénombrements déséquilibrés issus d'échantillons de phase 2 et de phase 3. Selon la méthodologie retenue, 139 à 152 échantillons se sont révélés contenir des *Escherichia coli* décelés par les deux méthodes dont environ 15% sont issus de la phase 2. Sur ces échantillons, la tendance négative en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® mise en évidence en première instance a été confirmée et ceci en présence ou non de tests supplémentaires visant à confirmer l'activité β -D-glucuronidase des bactéries produisant de l'indole isolées par la norme de référence. L'obtention de variations importantes proche de 100% dans le cadre de cette évaluation a été expliquée par une proportion importante d'échantillons contenant un faible nombre de bactéries (<10 colonies) obtenus par une des deux méthodes. De manière à diminuer ces variations, de nouvelles analyses statistiques ont été opérées en tenant compte de valeurs de dénombrements >5 UFC ou NPP (obtenus par les deux méthodes) et ont confirmé la tendance négative en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (variation réduite autour de 50%).

Il est difficile d'expliquer avec précision pourquoi des dénombrements plus faibles sont obtenus pour les bactéries *Escherichia coli* avec la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® sur les échantillons testés. Il n'est pas possible d'indiquer si ces résultats sont exclusivement liés à un problème méthodologique de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (temps d'incubation insuffisant, milieu de culture inadapté...) ou en lien avec des proportions de phénotypes *Escherichia coli* (%*Escherichia coli* Indole positive, %*Escherichia coli* Indole négative, % *Escherichia coli* β -D-glucuronidase positive ou % *Escherichia coli* β -D-glucuronidase négative) retrouvées dans les eaux françaises, différentes de celles rencontrées dans des eaux testées dans d'autres pays de la communauté européenne.

■ Conclusion :

Compte tenu de ces différents résultats, dans l'état actuel des connaissances acquises au travers de cette étude comparative menée sur des échantillons représentatifs provenant de sites naturellement contaminés et artificiellement contaminés, notre étude conclut que la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®, ne produit pas de résultats équivalents statistiquement à la méthode NF EN ISO 9308-1 : 2000, dans les conditions et selon le mode opératoire prescrit par le fournisseur, pour la détection de bactéries *Escherichia coli* dans les échantillons hydriques du contrôle sanitaire.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Bactéries coliformes, Escherichia coli, indicateur de contamination fécale, eaux de consommation, équivalence, Colilert®-18/Quanti-Tray®, méthode de référence, différence relative.

BIBLIOGRAPHIE

/

ANNEXE(S)

/

**Equivalence du test de potabilité des eaux Colilert®-
18/Quanti-Tray® pour la recherche et le dénombrement des
Escherichia coli (E. coli) et des bactéries coliformes dans
les eaux destinées à la consommation humaine par rapport
à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000**

**Saisine n° 2010-SA-0323;
DGS n°100019**

**RAPPORT
d'expertise de laboratoire**

Juin 2014

Mots clés

Bactéries coliformes, *Escherichia coli*, indicateur de contamination fécale, eaux de consommation, équivalence, Colilert®-18/Quanti-Tray®, méthode de référence, différence relative

Coliforms bacteria, *Escherichia coli*, fecal indicator, drinking water, equivalence, Colilert®-18/Quanti-Tray®, reference method, relative difference

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. Benoît GASSILLOUD – Chef d'Unité Microbiologie des Eaux – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

Contribution scientifique

Melle Emmanuelle RION – Technicienne Microbiologie – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

Melle Amandine WILHELM – Technicienne Microbiologie – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

M. Jean-Sébastien PY – Ingénieur – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

Secrétariat administratif

Mme Sophie MARCHAL-MAUER – Documentaliste – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE AU COMITÉ DE SUIVI

M. Jacques Mudry – Hydrogéologue - Retraité

M. Michel LAURENTIE – Responsable plateforme d'analyses statistiques – Anses – Laboratoire de Fougères

M. Laurent MOULIN – Responsable Recherche et développement Biologie – Eaux de Paris -

M. Thierry CHESNOT – Adjoint au responsable du laboratoire d'études et d'expertises en charge de la microbiologie, santé-environnement et de l'hygiène hospitalière industrielle et tertiaire - IPL Santé Environnement Durable

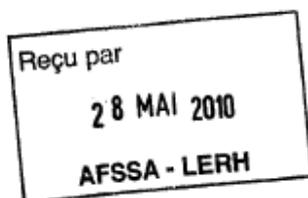
Mme Sandrine GRILLON – Responsable microbiologie – Laboratoire du CAR



SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	8
Liste des tableaux	8
Liste des figures	8
1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux.....	9
1.1 Objet de la demande	9
1.2 Contextes réglementaire et normatif	9
1.3 Méthode d'expertise en réponse à la question posée	9
2 Modalités d'organisation de l'étude complémentaire d'équivalence.....	11
2.1 Pilotage et laboratoires participants	11
2.2 Déroulement de l'étude pour les laboratoires participants	11
2.3 Sélection des échantillons	12
2.4 Description des méthodes et tests d'identification à opérer	13
2.4.1 Méthodes de détection comparées.....	13
2.4.2 Nombre de tests de confirmation effectués	14
2.4.3 Tests complémentaires.....	15
2.5 Analyse statistique	15
3 Résultats	17
3.1 Analyse statistique selon les critères retenus dans la norme NF EN ISO 17994	17
3.1.1 Bactéries Coliformes : analyse statistique tenant compte des critères édités dans la norme NF EN ISO 17994 : 2004.....	17
3.1.2 Bactérie <i>Escherichia coli</i> : analyse statistique tenant compte des critères édités dans la norme NF EN ISO 17994 :2004.....	19
3.2 Analyses complémentaires sur les bactéries <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.1 Analyse statistique tenant compte des dénombrements présomptifs obtenus par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray	21
3.2.2 Analyse statistique tenant compte de résultats de dénombrements obtenus par la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 corrigés par l'ajout de tests confirmant une activité β -D-glucuronidase chez les <i>Escherichia coli</i> productrices d'indole (notion de faux positifs)	22
3.2.3 Analyse des résultats obtenus sur les échantillons de la phase 2. Introduction de la notion de sous-estimation.....	24
3.2.4 Analyse statistique tenant compte uniquement de résultats de dénombrements >1 UFC ou NPP confirmant la présence de <i>Escherichia coli</i> dans les échantillons par les deux méthodes.....	25
4 Conclusions.....	28
5 Bibliographie	33
5.1 Normes	33

5.2 Législation et réglementation	33
ANNEXES	34
Annexe 1 : Lettre de la demande	35



Ministère de la Santé et des Sports

Direction générale de la santé

Paris, le 25 MAI 2010

Sous direction Prévention des risques liés à
l'environnement et à l'alimentation
Bureau Qualité des eaux

DGS/EA4 – N° 224

Le Directeur général de la santé

à

Personne chargée du dossier :
Béatrice JÉDOR
Tél. : 01.40.56.45.99
Fax : 01.40.56.50.56
E-mail : beatrice.jedor@sante.gouv.fr

Monsieur le Directeur du Laboratoire
d'Etudes et de Recherches en Hydrologie
(LERH – AFSSA)
40, rue Lionnois
54000 NANCY

Objet : Demande d'appui scientifique et technique – Equivalence du test de potabilité des eaux Colilert®-18 / Quanti-tray® pour la recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes dans les eaux destinées à la consommation humaine par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1

NRéf : DGS N° 100019 (numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance)

La directive 98/83/CE du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) prévoit la recherche de paramètres microbiologiques et fixe, à cette fin, les méthodes d'analyse, dites de référence, à utiliser (annexe III, partie 1) tout en spécifiant que des méthodes alternatives peuvent être utilisées « à condition qu'il puisse être démontré que les résultats obtenus sont au moins aussi fiables que ceux obtenus par les méthodes spécifiées à l'annexe III, partie 1 ». La directive 98/83/CE ne précisant pas de référentiel normatif ou de guide d'évaluation des méthodes alternatives, la Direction générale de l'Environnement de la Commission Européenne (CE) en charge de l'eau d'alimentation a mandaté en 2007 un groupe consultatif, l'European Microbiology Group (EMG), composé d'experts en microbiologie, afin d'évaluer les dossiers de demande d'équivalence des méthodes alternatives. La direction générale de la santé (DGS) a chargé l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) et votre laboratoire d'y représenter la France.

Pour mémoire, l'EMG s'appuie sur des lignes directrices, basées sur l'unique norme internationale existante définissant une procédure d'évaluation dans le domaine de l'eau, la norme NF EN ISO 17994 : 2004. Il appartient aux industriels souhaitant commercialiser des méthodes alternatives, de fournir les preuves de l'équivalence. Lorsqu'elle est accordée, cette équivalence est reconnue uniquement dans l'Etat-membre qui a porté le dossier auprès de la CE. Parallèlement, l'Agence française de normalisation (AFNOR) a initié en 2004 un projet de validation par tierce partie des méthodes alternatives. Initialement, le groupe de travail mis en place par l'AFNOR-Validation avait décidé de retenir le référentiel NF EN ISO 17994 : 2004 et de le compléter. Mais finalement, le groupe de travail a retenu la norme NF EN ISO 16140, utilisée pour la validation des méthodes microbiologiques alternatives pour les aliments.

Le rapport remis par votre laboratoire à la suite de ma demande d'appui scientifique et technique relatif à l'équivalence des méthodes alternatives par rapport aux méthodes de référence dans le domaine de l'eau d'alimentation (saisine 2007-SA-0192, juin 2007) met en évidence un certain nombre de différences entre le référentiel de l'AFNOR-Validation et celui utilisé par l'EMG, la principale étant l'absence d'essais sur des échantillons représentatifs des eaux distribuées en France dans le référentiel de l'AFNOR-Validation.

1/2

Sigles et abréviations

DGS : Direction Générale de la Santé

EMG : European Microbiology Group

LHN : Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization -Time of Flight Mass Spectroscopy

NPP : Nombre le plus probable

ONPG : Ortho-nitrophényl- β -galactoside

STEP : Station d'Épuration des eaux usées

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries coliformes dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® et confirmées par les tests normatifs par rapport aux résultats de dénombrements obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1	17
Tableau 2 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries <i>Escherichia coli</i> dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® et confirmées par les tests normatifs par rapport aux résultats de dénombrements obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1	19
Tableau 3 : Comparaison des résultats des tests d'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® obtenus dans le dossier français et espagnol, dans le cadre du dénombrement des <i>Escherichia coli</i>	20
Tableau 4 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les dénombrements présomptifs des bactéries <i>Escherichia coli</i> obtenus par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à ceux de la norme NF EN ISO 9308-1.....	21
Tableau 5 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries <i>Escherichia coli</i> dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® et par la méthode NF EN ISO 9308-1 après corrections des valeurs de dénombrement par ajout d'un test révélant l'activité β -D- glucuronidase.....	23
Tableau 6 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries <i>Escherichia coli</i> dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (confirmation des puits présomptifs) par rapport aux résultats de dénombrement obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1. Élimination des jeux de dénombrements ne révélant pas la présence de E coli dans les échantillons par une des deux méthodes	26
Tableau 7 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries <i>Escherichia coli</i> dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (confirmation des puits présomptifs) par rapport aux résultats de dénombrement obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1 après corrections des valeurs de dénombrement par ajout d'un test révélant l'activité β -D-glucuronidase. Élimination des jeux de dénombrements ne révélant pas la présence de E coli dans les échantillons par une des deux méthodes	27

Liste des figures

Figure 1: Mode opératoire et critères retenus pour la sélection des sites représentatifs (données issues de la base nationale SISE-Eaux, source ministère de la Santé).....	13
---	----

1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux

1.1 Objet de la demande

Le Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN) a été saisi le 25 mai 2010 par la Direction Générale de la Santé (DGS) d'une demande d'appui scientifique et technique (n°100019) relative à l'équivalence du test de potabilité des eaux Colilert®-18/Quanti-Tray® pour la recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* (*E. coli*) et des bactéries coliformes dans les eaux destinées à la consommation humaine par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000.

Toute autre demande ultérieure d'un industriel devra respecter les référentiels requis, et, sauf pour un contexte particulier et exceptionnel, ne devra pas être soumise à une expertise technique systématique auprès du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy de l'Anses.

1.2 Contextes réglementaire et normatif

La demande de cette saisine vise à s'assurer de l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® de la société Idexx vis-à-vis de la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000 sur le territoire français, conformément au principe de la directive européenne 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

Pour examiner cette équivalence, le LHN a suivi les recommandations du groupe consultatif d'experts, l'European Microbiology Group (EMG) mandaté par la Direction générale de l'Environnement de la Commission Européenne en employant la norme internationale NF EN ISO 17994 : 2004, « Qualité de l'Eau - Critères pour établir l'équivalence entre les méthodes microbiologiques ».

1.3 Méthode d'expertise en réponse à la question posée

Pour répondre à la demande du Ministère chargé de la Santé, le LHN a proposé de procéder en deux temps.

Dans un premier temps, le LHN a examiné les documents concernant les études d'équivalence que la société Idexx a transmis à la DGS pour attester de sa reconnaissance d'équivalence. Cette première évaluation visait à vérifier que les informations de ces documents répondaient à l'ensemble des exigences et critères de la norme NF EN ISO 17994 : 2004. Cette expertise documentaire a fait l'objet d'un premier rapport transmis en octobre 2010. La conclusion de l'expertise documentaire établie à partir des documents fournis, pour apprécier le principe d'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® vis-à-vis de la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000 n'a pas permis d'apporter une conclusion sur l'applicabilité de la méthode alternative avec les eaux du territoire français, conformément aux principes établis dans la norme NF EN ISO 17994 : 2004 et les recommandations du groupe EMG. La lacune la plus importante concernait les différents types d'eaux soumises au test, pour les études qui respectaient au mieux le protocole de la norme NF EN ISO 17994 : 2004 et le protocole allégé conformément aux recommandations du groupe EMG.

Compte tenu de la conclusion de l'expertise documentaire, et en réponse à la demande de la saisine, le laboratoire d'hydrologie de l'Anses a conduit une étude complémentaire d'équivalence selon le référentiel international NF EN ISO 17994 : 2004 et des recommandations du groupe EMG. Cette étude constituait la deuxième étape de la saisine. Cette étude complémentaire devait permettre, sur la base des données obtenues, de statuer sur l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® vis-à-vis de la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000. Les conclusions de cette étude ne préjugeront pas de l'avis de l'Anses, qui sera saisie pour l'éventuelle modification de l'arrêté du 17 mars 2003 relatifs aux méthodes d'analyses et à leurs caractéristiques de performance, conformément à l'article 1321-21 du code de la santé publique.

2 Modalités d'organisation de l'étude complémentaire d'équivalence

2.1 Pilotage et laboratoires participants

La conduite de cette étude a reposé sur des principes d'indépendance, d'impartialité et de robustesse technique. Ainsi la société Idexx n'a pas été impliquée dans le pilotage de l'étude. Elle a été sollicitée pour la fourniture gratuite des produits et du matériel nécessaire à la réalisation et aux lectures des tests.

Le pilotage de l'étude a été confié à un groupe miroir composé de plusieurs experts en microbiologie des eaux, d'un expert en analyse statistique et d'un hydrogéologue qui ont assuré la bonne adéquation de la démarche mise en œuvre pour répondre à l'objectif de l'équivalence.

Le nombre de laboratoires participants a été fonction du nombre de zones géographiques retenues dans le cadre de ce projet. Initialement 12 laboratoires avaient été sélectionnés en fonction de la zone géographique d'intérêt, mais également sur la base (i) d'une accréditation de la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 : 2000 et (ii) de l'agrément pour la réalisation des analyses du contrôle officiel des eaux. 3 laboratoires se sont désistés en cours d'étude et donc au final, seuls les résultats de 9 laboratoires ont été pris en compte. Une convention spécifique précisant toutes les modalités de l'étude a été établie avec chaque laboratoire.

2.2 Déroulement de l'étude pour les laboratoires participants

Pour les laboratoires participants, le déroulement de l'étude s'est fait selon trois phases distinctes décrites ci-dessous :

- ▶ La première phase (phase 1) de l'étude :

Elle a eu pour objectifs de former et familiariser les laboratoires participants à l'utilisation de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® mais aussi à la bonne compréhension du protocole d'évaluation de l'équivalence mis en place. En termes d'utilisation de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®, tous les laboratoires, même ceux déjà pratiquants, ont été formés à l'utilisation de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® dans des conditions réelles par le laboratoire pilote (LHN, Anses) lors d'une session de formation de 2 jours. Compte tenu du nombre de laboratoires, 2 sessions différentes ont été organisées pour que les intervenants puissent pratiquer, au sein du laboratoire pilote, la méthode sur des échantillons. Cette session avait également pour objectif d'expliquer clairement le protocole comparatif employé, transmis préalablement aux laboratoires.

Suite à ces deux sessions, le personnel formé a pu tester le matériel, les réactifs à évaluer ainsi que le protocole de comparaison sur ses propres échantillons dans son laboratoire de manière à lever toutes ambiguïtés avant d'initier l'étude. Un test de validation visant à vérifier la bonne maîtrise de la méthode alternative et du protocole comparatif a été organisé par le laboratoire pilote sur des échantillons d'eaux artificiellement dopés par un matériel de référence calibré. Il a été demandé aux laboratoires d'appliquer pour ce test les deux méthodes à comparer en suivant les modalités du protocole comparatif. Après analyse des résultats de chaque laboratoire, une audition a été organisée puis selon les résultats obtenus, chaque laboratoire a été autorisé à démarrer l'étude pratique sur les échantillons hydriques attribués.

- ▶ La seconde phase (phase 2) de l'étude :

Elle a eu pour objectif de mettre en place une étude d'équivalence sur des échantillons fréquemment contaminés (échantillons naturels distribués) prélevés par les laboratoires. Une requête SISE-Eaux des données du contrôle sanitaire a été faite par la DGS, et le LHN a retenu des sites dont les échantillons sont contaminés naturellement par des bactéries coliformes et/ou des *Escherichia coli*. Ces échantillons ont été analysés par les deux méthodes en parallèle selon le protocole mis en place. Il est important de préciser que compte tenu du nombre restreint de ce type d'échantillons, seuls 5 laboratoires (Lab A, Lab D, Lab G, Lab H et Lab J) sur les 9 participants ont été chargés de les analyser. Cette attribution a été décidée en fonction de la situation géographique des points de prélèvement et de l'implantation du laboratoire par rapport au site d'intérêt.

- ▶ La troisième phase (phase 3) du projet :

Elle a eu pour objectif de mettre en place une étude d'équivalence sur des échantillons d'eaux d'alimentation non contaminés, prélevés par les laboratoires et qui ont été "artificiellement contaminés" par dopage. Cette phase a permis de comparer les deux méthodes sur un nombre de bactéries ciblées. La contamination des échantillons a été réalisée par le biais d'eaux environnementales contenant des bactéries coliformes et *Escherichia coli*. Pour cela, les laboratoires ont utilisé des eaux de surfaces et des eaux de rejets d'effluents de STEP. Ces différentes eaux ont été diluées à l'aide d'eau chlorée de manière à simuler un stress sur la flore bactérienne ciblée dans un réseau d'eau destinées à la consommation humaine. Les solutions ont été dans un second temps calibrées puis stockées à 4°C, avant dopage des échantillons hydriques à tester. Un protocole spécifique de préparation des eaux de dopages a été transmis à tous les laboratoires participants.

2.3 Sélection des échantillons

L'objectif visé en terme d'échantillons à tester, était d'environ 250, incluant des eaux subissant différents modes de désinfection (chlore, bioxyde de chlore, UV, ozone,...). Pour s'assurer de la représentativité des types d'eaux retenus, une extraction des données du contrôle sanitaire (SISE-Eaux) a permis de retenir des unités de distribution avec des typologies d'eaux différentes (physico-chimiques, microbiologiques et hydrologiques), couvrant si possible l'ensemble du territoire national (métropole et DOM).

La sélection d'échantillons hydriques naturellement contaminés (échantillon de la phase 2) a été favorisée pour tester les deux méthodes dans des conditions réelles retrouvées sur le terrain. L'évaluation de l'équivalence sur ce type d'échantillon correspond selon la norme NF EN ISO 17994 à un processus « idéal ». Dans ce cadre une extraction de données analytiques issues de la base nationale SISE-Eaux a été opérée sur l'ensemble du territoire afin de sélectionner dans un premier temps les sites potentiellement contaminés en bactéries coliformes.

Compte tenu du nombre restreint d'échantillons naturellement contaminés (échantillons de phase 2) sélectionnés (50 sites distincts, figure 1), de leurs répartitions sur le territoire national (sites situés principalement en zone karstique) et des volumes produits et distribués (entre 1 m³/j à 10 m³/J), un tirage aléatoire dans un second temps d'environ 150 sites supplémentaires a été réalisé par classe de débit et par bassin hydrographique de manière à tester un panel d'échantillon plus représentatif des filières du contrôle sanitaire.

Dans un troisième temps, un groupe de travail « hydrogéologue » a modifié et complété le nombre de sites en incluant 60 supplémentaires tenant compte de trois critères : augmentation de la couverture et de la diversité des masses d'eau sur certains bassins et sélection de site présentant une forte contamination en *Escherichia coli*.

Ce travail a permis au final de sélectionner 250 sites en métropole et Département D'Outre-Mer qui sont présentés sur la carte de la figure 1.

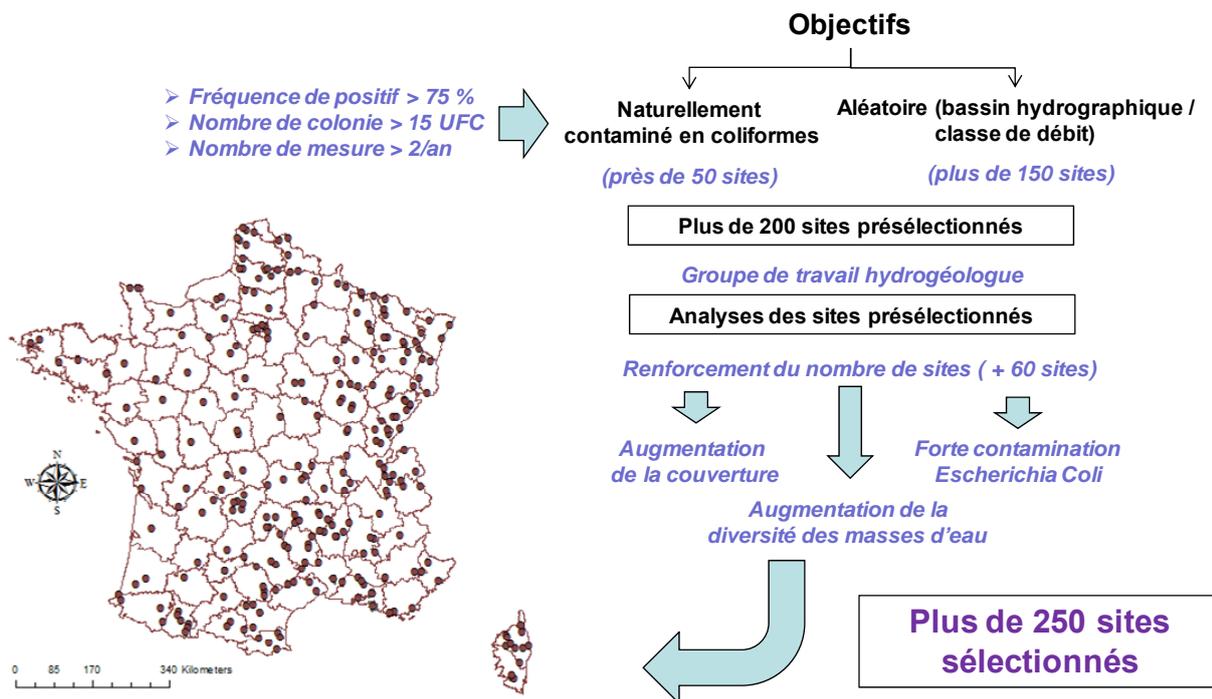


Figure 1: Mode opératoire et critères retenus pour la sélection des sites représentatifs (données issues de la base nationale SISE-Eaux, source ministère de la Santé)

Tous les échantillons (phase 2 + phase 3) ont été attribués aux laboratoires selon leur localisation géographique de manière à ce que chaque laboratoire participant puisse respecter les prescriptions des normes de prélèvements, de transports et des délais de mise en analyse. De ce fait, selon la localisation des laboratoires participants vis-à-vis des sites retenus, le nombre d'échantillons attribué a été variable selon l'établissement concerné.

2.4 Description des méthodes et tests d'identification à opérer

2.4.1 Méthodes de détection comparées

- ▶ Méthode NF EN ISO 9308-1 : 2000 :

Dans cette étude la méthode NF EN ISO 9308-1 : 2000 est la méthode prise pour référence. Pour rappel, le principe de cette méthode consiste à filtrer 100 mL d'eau destinées à la consommation humaine au travers d'une membrane filtrante d'une porosité de 0,45 µm, d'incuber la membrane sur un milieu gélosé sélectif et d'opérer la confirmation des bactéries par des tests adéquats. Selon cette norme de référence, les coliformes sont définis comme des bactéries pouvant former des colonies en aérobiose dans les (21 ± 3)h à (36 ± 2)°C sur un milieu de culture lactosé sélectif et sont oxydase-négatives. Pour l'essai standard, la norme autorise par la note 1 une extension de l'incubation pendant 24 heures supplémentaires pour augmenter la sensibilité de la méthode en cas d'absence de colonies à 24 h. Cette disposition est reprise dans le texte réglementaire relatif aux eaux de consommation humaine (arrêté ministériel du 17 septembre 2003 relatif aux méthodes d'analyses des échantillons d'eaux et à leurs caractéristiques de performance). Ce délai d'incubation a été retenu dans le cadre de ces essais, soit un dénombrement après (44±4)h (2 lectures : (21±3)h et (44±4)h). Pour les *Escherichia coli* la production de l'indole à partir du tryptophane dans les (21 ± 3) h à (44 ± 0,5)°C complète la définition décrite ci-dessus. Une

seconde membrane a été systématiquement réalisée en parallèle pour incubation à $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Une tolérance de $\pm 1^\circ\text{C}$ à 44°C est acceptée dans le cadre de l'étude.

► Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray :

La méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® est la méthode à évaluer dans le cadre de cette étude. Il s'agit d'une méthode de type NPP qui vise à mélanger 100 mL d'eau de consommation avec un réactif lyophilisé, et à répartir le mélange réactionnel dans 51 puits de même volume. Le principe de la détection des coliformes est basé sur leur capacité à cliver l'ortho-nitrophényl- β -galactoside (ONPG) via l'enzyme β -D-galactosidase en 18h d'incubation à une température de $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$. Dans ce cadre, les puits initialement transparents vont se colorer progressivement en jaune. Pour la détection des *Escherichia coli*, la méthode révélera la présence d'une autre enzyme, la β -D-glucuronidase lors de la même période d'incubation. Dans ce cadre, les puits jaunes qui apparaîtront fluorescents témoigneront de la présence *Escherichia coli* dans les échantillons. Bien qu'avec la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® aucun test supplémentaire ne soit requis pour confirmer l'exactitude de l'information fournie par la coloration des puits, il a été nécessaire lors du test comparatif d'équivalence de vérifier et confirmer la présence des coliformes et des *Escherichia coli* obtenus. Ces confirmations ont été opérées en employant les mêmes tests que ceux utilisés dans la norme de référence. Par conséquent, cette exigence supplémentaire a imposé aux laboratoires impliqués dans le test comparatif, d'opérer sur le même échantillon une double série de confirmation. En pratique, à partir des puits positifs révélant la présence de bactéries coliformes ou d'*Escherichia coli* (puits dans ce cadre déclarés comme présomptifs), il a été prélevé un volume de milieu liquide dans chaque puits qui a été déposé sur une gélose Mac Conkey de manière à confirmer le caractère lactose positif des bactéries après incubation à $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ pendant (21 ± 3) h. Le test oxydase, mais également la recherche de la production d'indole des bactéries détectées, ont été systématiquement réalisés sur les colonies lactoses positives obtenues sur gélose Mac Conkey provenant de puits positifs indiquant la présence de coliformes ainsi que des puits positifs en bactérie *Escherichia coli*. Signalons que si plusieurs types de colonies lactoses positives étaient identifiés sur la gélose Mac Conkey, les laboratoires avaient comme consigne de sélectionner pour confirmation les différents types observés. Dès lors pour le rendu des résultats, dans le cas où plusieurs types de colonies étaient obtenus sur la gélose Mac Conkey, il a été décidé de considérer le puits comme contenant des coliformes ou *Escherichia coli* confirmés si au moins un des types de colonies repiqués, présenté les caractéristiques définies dans la norme de référence. Pour obtenir les résultats de dénombrements définitifs, les tables NPP fournies par le producteur des kits de détection ont été utilisées conformément aux prescriptions de la notice d'utilisation. Concernant le temps d'incubation des réactifs, un délai supplémentaire de 2 h a été toléré aux laboratoires participants. Dans le cadre de cette étude tous les laboratoires ont été munis des appareillages spécifiques nécessaires à la réalisation des essais avec la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (appareil permettant de sceller les plaques Quanti-Tray ; lampe Ultraviolet 365 nm ; comparateur Quanti-Tray ; plaque NPP). Ces appareils ont été fournis par l'industriel au laboratoire pilote qui les a redistribués à chaque participant.

2.4.2 Nombre de tests de confirmation effectués

L'aspect relatif à la confirmation des colonies ou des puits positifs lors d'un essai comparatif est important à prendre en compte. Idéalement, il serait préférable de confirmer toutes les colonies présomptives obtenues sur milieu sélectif de la norme de référence ou les puits de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®. Cependant pour des raisons de coût, il n'a pas été envisageable de demander à tous les laboratoires participants d'effectuer l'ensemble des confirmations notamment lors de la mise en place des analyses sur les échantillons "artificiellement contaminés" par dopage lors de la phase 3. Dans ce cadre, il a été demandé aux laboratoires sur les "échantillons naturellement contaminés" de la **phase 2** de réaliser l'ensemble des confirmations sur toutes les colonies obtenues par la norme et tous les puits positifs de la méthode alternative. Lors de la **phase 3** de l'étude, les laboratoires travaillant sur des échantillons contaminés artificiellement par dopage ont adopté la démarche appliquée sur les échantillons d'eaux de consommation dans le cadre du contrôle officiel, à savoir que dans le cas où le nombre de colonies présomptives ou puits

positifs de la méthode alternative étaient > 10, d'en sélectionner 10 pour confirmation en privilégiant de préférence les *Escherichia coli*.

2.4.3 Tests complémentaires

Il a été demandé à tous les laboratoires participants d'effectuer des tests complémentaires sur les bactéries coliformes et *Escherichia coli* isolées et confirmées à partir des tests de la norme de référence NF EN ISO 9308-1. Ainsi sur un milieu chromogénique transmis à tous les laboratoires par le LHN, les laboratoires devaient sur au moins 3 colonies coliformes et 3 colonies *Escherichia coli* isolées et confirmées, tester la présence d'une activité enzymatique de type β -D-galactosidase (coliforme) et β -D-glucuronidase (*Escherichia coli*). La recherche de la β -D-glucuronidase a été recommandée dans le cadre d'un rectificatif technique élaboré par le comité technique ISO/TC147 en 2007. Elle a pour objectif d'éviter des faux positifs lorsque la méthode est employée, faux positifs notamment liés à la présence de souches de *Klebsiella oxytoca* pouvant donner une réaction positive à l'Indole dans les mêmes conditions d'incubation.

Par ailleurs, les laboratoires avaient également comme consigne de conserver sur cryobilles à -20°C pour envoi au LHN, pour chaque échantillon analysé et selon les méthodes employées, au moins 3 souches de coliformes confirmées et 3 souches *Escherichia coli* confirmées. Ces bactéries issues d'échantillons analysés ont été identifiées principalement par spectrométrie MALDI-TOF (couplage d'un « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation » et d'un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry) et également par le biais de quelques galeries biochimiques. Une base de donnée reprenant les différentes réponses des tests de chaque méthode ainsi que les données d'identification obtenues a été créée pour exploitation.

2.5 Analyse statistique

L'analyse statistique a été opérée en utilisant les résultats de dénombrements obtenus par la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 et Colilert®-18/Quanti-Tray® et tenant compte des prescriptions de la norme internationale NF EN ISO 17994. Cette méthode repose sur la détermination de la différence relative exprimée en pourcentage entre chaque couple de comptages confirmés obtenus par les deux méthodes employées selon la formule :

$$x = \frac{|\ln(a) - \ln(b)|}{\ln(a) + \ln(b)} \times 100 \% \text{ avec } a \text{ et } b \text{ les valeurs de dénombrement mesurées pour chaque méthode.}$$

Deux méthodes seront considérées comme quantitativement équivalentes (« sans différence ») si la différence relative moyenne mesurée sur des dénombrements confirmés par couples ne s'écarte pas de manière significative du zéro et si l'incertitude élargie calculée ne dépasse pas le niveau de l'écart maximal admissible fixé pour ce type d'échantillon. Cet écart admissible « D » pour les échantillons d'eau a été fixé à 10%. Dans le cadre de cette étude il a été décidé d'accepter l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® chaque fois que sa performance moyenne était soit quantitativement équivalente ou soit supérieure à celle de la méthode de référence. Nous avons indiqué pour chaque analyse effectuée, la différence relative obtenue ainsi que la déviation standard, l'erreur standard, l'incertitude élargie « U » et enfin la tendance globale du test qui peut selon les résultats du test s'exprimer comme suit :

- Tendance globale positive (+) = méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection supérieur par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1
- Tendance globale négative (-) = méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection inférieur à la méthode NF EN ISO 9308-1
- Tendance globale non concluante (o) = résultats ne permettant pas de conclure par manque de données
- Tendance globale sans différence (MSD) = méthode équivalente sans différence

Préalablement à la réalisation des tests statistiques, une analyse critique des résultats de dénombrements a été réalisée. Ainsi par exemple les jeux de dénombrements pour chaque échantillon testé conduisant à un résultat de zéro par les deux méthodes ont été écartés de l'analyse. Une recherche des données de dénombrements aberrants a été également entreprise de manière à les exclure de l'analyse statistique. La norme NF EN ISO 17994 :2004, « n'indique pas d'essais officiels qui permettent de détecter les laboratoires aberrants, les types inappropriés d'échantillons ou des résultats d'essais aberrants isolés. Il incombe à l'analyste statisticien de décider de mettre en oeuvre ou non des essais de détection des aberrants ». Pour répondre à cette question, une analyse des résultats produits par chaque laboratoire a été mise en oeuvre dans un premier temps. Sur la base des résultats, les dénombrements de l'ensemble des laboratoires ont été réunis dans un second temps afin de réaliser un test statistique global. Compte tenu du nombre de résultats ($n > 25$ et <inférieur à 500), il a été décidé de réaliser un test de Rosner pour éliminer les valeurs aberrantes.

Concernant les jeux de dénombrements obtenus pour les échantillons conduisant à un résultat de type zéro par une des deux méthodes mais non pas par l'autre méthode, il est important de préciser qu'ils ont été conservés dans l'analyse statistique. Il est pratiquement inévitable d'obtenir ce type de combinaison (a, 0) et (0, b). De manière à éviter d'omettre ces échantillons, les différences relatives ont été calculées en appliquant les formules ci-après :

- Lorsque le résultat est du type (a, 0), la différence relative s'obtient à partir de : $x = \ln(a + 1) \times 100\%$
- Lorsque le résultat est du type (0, b), la différence relative s'obtient à partir de : $x = -\ln(b + 1) \times 100\%$

L'analyse statistique principale a consisté à comparer les dénombrements confirmés obtenus par la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 à ceux obtenus par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® après confirmation des bactéries présomptives présentes dans les puits jaunes (bactéries coliformes) et jaune + fluorescent (bactérie *Escherichia coli*) par les tests décrits dans la méthode de référence. Cette analyse correspond à celle opérée dans la plupart des dossiers d'évaluation réalisés et répond aux prescriptions éditées par le groupe EMG. Les résultats des tests pour les coliformes sont présentés dans le chapitre 6.1.1 et pour les *Escherichia coli* dans le chapitre 6.1.2. De manière à approfondir les conclusions de certains tests, d'autres analyses statistiques complémentaires reprenant les prescriptions de la norme NF EN ISO 17994 ont également été opérées notamment en exploitant directement les résultats de dénombrement déterminés à partir des puits présomptifs de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®, ou encore en exploitant les résultats de dénombrements corrigés obtenus par la norme de référence après révélation de l'activité enzymatique β -D-glucuronidase chez les colonies isolées et confirmées (bactérie *Escherichia coli* produisant de l'indole).

3 Résultats

3.1 Analyse statistique selon les critères retenus dans la norme NF EN ISO 17994

3.1.1 Bactéries Coliformes : analyse statistique tenant compte des critères édités dans la norme NF EN ISO 17994 : 2004

La première étape du travail statistique a consisté à déterminer l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 en tenant compte des résultats confirmés obtenus après vérification du caractère lactose + et oxydase – des bactéries isolées des puits positifs présomptifs (puits jaunes : activité β -galactosidase). Au final, 220 échantillons dont 45 issus d'échantillons naturellement contaminés (phase 2) et 175 d'échantillons artificiellement contaminés (phase 3) ont été utilisés pour l'exploitation statistique. Les résultats des tests statistiques menés sur chaque type d'échantillon (phase 2 ou phase 3), lorsqu'ils sont regroupés mais aussi par laboratoire, sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries coliformes dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® et confirmées par les tests normatifs par rapport aux résultats de dénombrements obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1

Laboratoires regroupements	Nombre d'échantillons	Différence relative moyenne (%)	Déviat ion standard (%)	Erreur standard (%)	U (%)	Conclusion globale du test
Lab A	14	77,05	111,3	29,75	59,49	+
Lab C	12	74,91	75,85	21,90	43,79	+
Lab D	37	60,94	100,22	16,48	32,95	+
Lab E	9	5,58	37,18	12,39	24,78	o
Lab F	13	45,89	34,01	9,43	18,87	+
Lab G	11	-0,62	78,44	23,65	47,3	o
Lab H	12	47,1	116,62	33,67	67,33	o
Lab J	84	36,37	124,81	13,62	27,24	+
Lab K	28	19,03	46,07	8,71	17,41	+
Phase 2 + 3	220	41,02	101,7	6,86	13,71	+
phase 2	45	35,93	147,39	21,97	43,94	MSD
phase 3	175	42,34	86,7	6,55	13,11	+

+ : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection supérieur

- : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection inférieur

O : Résultats ne permettant pas de conclure par manque de données

MSD : Méthode Sans Différence

Dans cette étude, 6 laboratoires ont obtenu une conclusion positive sur les échantillons attribués (Lab A, C, D, F, J et K) indiquant par conséquent que la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® permet d'obtenir des dénombrements supérieurs à ceux obtenus par la méthode normative NF EN ISO 9308-1. Il est constaté des différences relatives variant de 19,03% à 77,05% selon les laboratoires avec une variabilité oscillant entre 34,01% et 124,81%. Pour 3 laboratoires participants (Lab E, Lab G et Lab H), les données de mesures opérées sur les différents échantillons testés n'ont pas permis de conclure. Pour ces laboratoires, il aurait été nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons à tester pour obtenir une tendance.

Le regroupement de l'ensemble des dénombrements issus des échantillons de la phase 2 et de la phase 3 confirme que la méthode alternative offre un rendement de détermination supérieur (41,02%) du nombre de bactéries coliformes dans les eaux par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1.

L'analyse statistique réalisée sur les échantillons dégroupés de la phase 2 ou de la phase 3, conclut également à l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®. Cependant il peut être observé une réponse nettement moins tranchée entre les échantillons de la phase 3 comparativement aux échantillons de la phase 2 (tendance sans différence) qui peut s'expliquer par une plus forte variabilité pour ces derniers échantillons (147,39% versus 86,7% pour les échantillons de phase 3).

Les résultats de cette étude démontrent sur plus de 200 échantillons que la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® est équivalente à la norme NF EN ISO 9308-1 concernant le dénombrement des bactéries coliformes dans des échantillons hydriques. Cette conclusion est globalement conforme à celles obtenues dans différentes études d'équivalences menées par d'autres pays de la communauté européenne opérées sur des échantillons hydriques représentatifs d'eaux distribuées. Il est difficile d'indiquer avec précision les raisons de cette différence si importante en faveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®. Divers auteurs ont émis l'hypothèse d'une meilleure remise en culture des bactéries ciblées dans le milieu liquide chromogénique par rapport au milieu solide TTC tergitol. Pour d'autres, la présence d'une flore interférente dans les échantillons hydriques pouvant perturber le rendement de la méthode normative pourrait expliquer ces derniers résultats. A titre indicatif l'impact négatif de la flore interférente sur le rendement de la méthode NF EN ISO 9308-1 est repris dans le domaine d'application de cette norme.

Il est intéressant de constater que les réponses d'équivalence reposant sur les dénombrements obtenus entre les échantillons de la phase 2 et ceux de la phase 3 sont différentes. Si sur les échantillons provenant de la phase 3, des échantillons artificiellement dopés par des bactéries coliformes provenant d'eaux de surfaces et d'eaux de rejets de STEP, une différence importante de dénombrement a pu être observée, cette dernière s'efface en ce qui concerne les échantillons issus de la phase 2, échantillons naturellement contaminés. Sur ces échantillons traités, les deux méthodes semblent être peu différentes dû notamment à la grande variabilité des dénombrements mesurés. La encore il est difficile d'indiquer les raisons de ce constat hormis le fait que dans ces eaux les bactéries coliformes sont dans un état physiologique certainement très différents des bactéries artificiellement ajoutées aux échantillons, malgré le traitement appliqué pour simuler un stress au chlore. Au niveau des autres études publiées, l'utilisation d'échantillons naturellement contaminés pour évaluer l'équivalence des deux méthodes a été très peu opérée.

En conclusion, les résultats de cette étude mettent en évidence que la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® est équivalente à la méthode NF EN ISO 9308-1 pour le dénombrement des coliformes dans les échantillons hydriques testés.

3.1.2 Bactérie *Escherichia coli* : analyse statistique tenant compte des critères édités dans la norme NF EN ISO 17994 :2004.

Pour les bactéries *Escherichia coli*, la différence relative moyenne a été établie à partir des dénombrements obtenus avec la méthode de référence et ceux de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® en tenant compte des résultats confirmés des bactéries issues des puits positifs jaunes fluorescents (Bactéries *Escherichia coli* présomptives) présentant les caractères suivants : lactose positif (+), oxydase négatif (–) et indole positif (+). L'évaluation de l'équivalence a été estimée sur 202 échantillons dont 38 sont issus d'échantillons naturellement contaminés (phase 2) et 164 d'échantillons artificiellement contaminés (phase 3). Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries *Escherichia coli* dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® et confirmées par les tests normatifs par rapport aux résultats de dénombrements obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1

Laboratoires regroupements	Nombre d'échantillons	Différence relative moyenne (%)	Déviations standard (%)	Erreur standard (%)	U (%)	Conclusion globale du test
Lab A	12	-74,59	117,74	33,99	67,98	-
Lab C	11	-80,15	109,54	33,03	66,05	-
Lab D	32	-38,57	130,67	23,10	46,2	o
Lab E	9	-113,06	64,51	21,50	43,01	-
Lab F	13	-20,75	71,47	19,82	39,64	o
Lab G	11	-53,66	105,32	31,76	63,51	o
Lab H	10	28,36	78,23	24,74	49,48	o
Lab J	76	-31,97	105,28	12,08	24,15	-
Lab K	28	-33,54	94,74	17,90	35,81	o
Phase 2 + 3						
Phase 2 + 3	202	-39,47	106,41	7,49	14,97	-
Phase 2	38	-74,35	117,15	19,00	38,01	-
Phase 3	164	-31,39	102,46	8,00	16,00	-

+ : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection supérieur

- : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection inférieur

O : Résultats ne permettant pas de conclure par manque de données

MSD : Méthode Sans Différence

Sur les 9 laboratoires participants, seuls 4 laboratoires ont mis en évidence, sur les échantillons qui leur ont été attribués, un rendement de dénombrement inférieur des bactéries *Escherichia coli* par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1. Les différences relatives mesurées varient entre -31,97% et -113,06%.

Le regroupement de l'ensemble des échantillons confirme la tendance observée par ces trois laboratoires. La différence relative moyenne mesurée oscille entre -31,39% pour les échantillons de la phase 3 à -74,35% pour les échantillons naturellement contaminés de la phase 2. Signalons que les variations obtenues sont relativement élevées puisqu'elles sont proches de 100%.

L'obtention de résultats en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® a été très peu relayée dans les dossiers d'équivalence européens publiés. Le plus souvent des rendements supérieurs prouvant l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la norme de référence sont constatés. Seuls les résultats présentés dans le dossier d'équivalence espagnol sont proches de ceux obtenus dans cette étude. En effet, au terme de la comparaison de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® avec la norme NF EN ISO 9308-1 sur 275 échantillons dopés artificiellement par 9 laboratoires espagnols, les différentes valeurs concernant le rendement global; la déviation standard, l'erreur standard et l'incertitude élargie « U » se révèlent être similaires de celles mesurées dans cette étude (Tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison des résultats des tests d'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® obtenus dans le dossier français et espagnol, dans le cadre du dénombrement des *Escherichia coli*

Échantillons	Nombre d'échantillons	Différence relative moyenne (%)	Déviat ion standard (%)	Erreur standard (%)	U (%)	Conclusion globale du test
Français	202	-39,47	106,41	7,49	14,97	-
Espagnols*	275	-38,16	103,18	6,22	12,44	-

*résultats exprimés en pourcentage

Ces résultats relativement semblables par rapport aux dénombrements des échantillons exploités dans le dossier espagnol permettent de confirmer la validité de la méthodologie comparative retenue dans le cadre de cette étude sur les échantillons hydriques représentatifs des eaux Françaises comprenant entre autre des échantillons naturellement contaminés. Sur ce type d'échantillons (phase 2) et pour les *Escherichia coli*, il est observé une différence relative moyenne négative nettement plus importante (-74,35% versus -31,39%) que celle obtenue sur les échantillons de phase 3 ce qui pourrait laisser présager une influence liée à la nature même des échantillons testés (échantillons phase 2 versus phase 3).

En conclusion pour les bactéries *Escherichia coli*, les résultats de cette étude démontrent que la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® fournit des résultats de dénombrement inférieurs à ceux de la norme de référence sur des échantillons hydriques naturellement contaminés ou artificiellement dopés lorsque les prescriptions de la norme EN ISO 17994 sont suivies. A ce stade de l'étude, l'équivalence de cette méthode par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1 ne peut être admise pour la détection des bactéries *Escherichia coli* dans les eaux testées.

3.2 Analyses complémentaires sur les bactéries *Escherichia coli*

Compte tenu des résultats obtenus sur les bactéries *Escherichia coli*, nous avons décidé dans la suite de ce travail d'évaluation de comprendre la tendance observée sur ces bactéries. Les tests complémentaires réalisés ci-dessous, ne sont pas préconisés dans la norme NF EN ISO 17994, ni dans le document guide publié par le groupe EMG. Cependant ils ont été pour certains réalisés dans plusieurs dossiers d'équivalence, dont celui publié par l'Espagne et les résultats de ces données complémentaires ont été employés pour attester de l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1.

3.2.1 Analyse statistique tenant compte des dénombrements présomptifs obtenus par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray

Dans les études d'équivalence menées selon le principe de la norme NF EN ISO 17994, les bactéries *Escherichia coli* décelées avec la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® doivent être confirmées par les tests décrits dans la méthode de référence. Dans ce cadre, il est recherché la production d'indole chez les bactéries *Escherichia coli* issues de puits fluorescents (activité β -D-glucuronidase). La confirmation de cette caractéristique valide dès lors les puits positifs présomptifs, ce qui permet soit de confirmer le dénombrement présomptif soit d'établir un nouveau dénombrement en fonction du nombre de puits effectivement confirmés.

Afin d'évaluer l'impact de l'étape de confirmation basée sur la production de l'indole sur le résultat final du test statistique, une nouvelle exploitation a été opérée en tenant compte des résultats de dénombrements obtenus par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® basés sur les puits positifs présomptifs non confirmés.

Les résultats obtenus sur les échantillons de phase 2, de phase 3 et sur les échantillons regroupés sont présentés dans le tableau n°4.

Tableau 4 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les dénombrements présomptifs des bactéries *Escherichia coli* obtenus par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à ceux de la norme NF EN ISO 9308-1

Laboratoires regroupements	Nombre d'échantillons	Différence relative moyenne (%)	Déviations standard (%)	Erreur standard (%)	U (%)	Conclusion globale du test
Phase 2 + 3	203	-29,95	103,58	7,27	14,54	-
Phase 2	39	-66,66	115,09	18,43	36,86	-
Phase 3	164	-21,22	99,04	7,73	15,47	-

+ : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection supérieur

- : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection inférieur

O : Résultats ne permettant pas de conclure par manque de données

MSD : Méthode Sans Différence

L'analyse statistique a été réalisée sur 203 échantillons différents soit un échantillon de plus que lorsque les puits de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® sont confirmés avec les tests de la méthode normative NF EN ISO 9308-1 (tableau 3). Les résultats de l'analyse statistique mettent en évidence sur les données issues des échantillons de phase 2 ou de phase 3, des rendements de détection inférieurs de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® oscillant entre -66,66% et -21,22% respectivement selon la phase considérée. Le regroupement des échantillons conduit à une différence relative de -29,95% en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®.

En conclusion, la confirmation des puits présomptifs par l'ajout d'un test Indole impacte peu les résultats de dénombrements observés et donc la tendance et les conclusions des tests statistiques opérés. L'étape de confirmation par le test Indole n'explique pas les écarts de dénombrements mesurés entre les deux méthodes.

3.2.2 Analyse statistique tenant compte de résultats de dénombrements obtenus par la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 corrigés par l'ajout de tests confirmant une activité β -D-glucuronidase chez les *Escherichia coli* productrices d'indole (notion de faux positifs)

Plusieurs dossiers d'équivalence ont relaté que la caractérisation des bactéries *Escherichia coli* sur le critère de la production d'indole seul ne permettait pas d'être suffisamment spécifique pour confirmer la présence des *Escherichia coli* dans un échantillon hydrique. En effet pour certains auteurs des bactéries autres que *Escherichia coli* telles que les *Klebsiella oxytoca* seraient susceptibles d'être également décelées par ces tests de confirmation générant dès lors des faux positifs. Cet argument est repris dans le rectificatif technique 1 de la norme ISO 9308-1 élaboré en 2007 par le comité technique ISO/TC 147 (qualité de l'eau, sous comité SC 4). Dans ce contexte, il se produirait une surestimation du nombre réel de bactéries *Escherichia coli* dans l'échantillon hydrique lorsque la norme NF EN ISO 9308-1 serait employée biaisant dès lors l'analyse statistique en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®.

Dans cette étude, nous avons voulu estimer dans un premier temps la proportion de résultats faux positifs obtenu par les deux méthodes. Cette évaluation a été opérée à partir d'un pool de bactéries isolées des puits jaunes fluorescents (bactérie *Escherichia coli*) de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® mais également des bactéries isolées à partir de la norme NF EN ISO 9308-1 provenant des géloses Tergitol et révélées comme étant oxydase négative (-), lactose positif (+), avec production d'indole pour les bactéries *Escherichia coli*, en tenant compte des identifications des espèces opérées par spectrométrie MALDI-TOF ou par galerie biochimique. Ce travail a été réalisé sur des souches bactériennes présentes dans les échantillons d'eaux de phase 2 et de phase 3. La spéciation permet, en se basant sur les résultats des différents tests de confirmation réalisés selon la méthode considérée, de déterminer le pourcentage de faux positifs obtenus par les deux méthodes.

Concernant les bactéries identifiées comme *Escherichia coli* par la méthode **NF EN ISO 9308-1**, sur 267 souches identifiées (77 provenant de 31 échantillons différents issus de la phase 2 et 190 provenant de 93 échantillons différents issus de la phase 3), 182 bactéries (68,1%) se sont révélées être réellement des *Escherichia coli* ce qui porte le nombre de faux positifs à 31,8% (85 bactéries) lorsque la norme est employée.

Avec la méthode **Colilert®-18/Quanti-Tray®**, sur 241 souches identifiées, isolées de puits jaunes fluorescents (48 provenant de 23 échantillons différents issus de la phase 2 et 193 provenant de 86 échantillons différents de la phase 3), 190 bactéries se sont révélées être réellement des *Escherichia coli* (78,8%) ce qui porte le nombre de faux positifs à 21,1% (51 bactéries) lorsque cette méthodologie est employée.

Ces résultats mettent clairement en évidence une surestimation du dénombrement des bactéries *Escherichia coli* dans les échantillons hydriques quelle que soit la méthode de détection employée avec une tendance plus importante lorsque la norme NF EN ISO 9308-1 est utilisée.

De manière à tenir compte de l'impact de résultats surestimés obtenus avec la méthode NF EN ISO 9308-1 sur le résultats de l'évaluation statistique, il a été décidé dans un second temps de corriger les résultats de dénombrements obtenus par cette méthode en tenant compte des réponses des tests supplémentaires non normatifs visant à caractériser la production de l'activité β -D-glucuronidase chez les *Escherichia coli* producteurs d'indole. Ce travail a pu être possible car pour rappel, tous les laboratoires participants ont eu pour consigne d'effectuer, sur chaque échantillon testé, une recherche de l'activité β -D-glucuronidase sur 3 colonies *Escherichia coli* (ou plus) identifiées par la méthode NF EN ISO 9308-1. Les résultats de ces tests supplémentaires ont permis de corriger le résultat de dénombrement en invalidant les réponses positives du test Indole si aucune activité β -D-glucuronidase n'était retrouvée chez les bactéries testées.

A partir de ces nouveaux résultats de dénombrement corrigés de la norme NF EN ISO 9308-1, une analyse statique respectant le formalisme décrit dans la norme NF EN ISO 17994 a été opérée. Ces nouveaux résultats ont été comparés aux dénombrements de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (confirmation du caractère Indole positif des bactéries présentes dans les puits jaunes fluorescents).

Les résultats obtenus sur les échantillons de phase 2, de phase 3 et sur les échantillons regroupés sont présentés dans le tableau n°5.

Tableau 5 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries *Escherichia coli* dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® et par la méthode NF EN ISO 9308-1 après corrections des valeurs de dénombrement par ajout d'un test révélant l'activité β -D- glucuronidase

Laboratoires regroupements	Nombre d'échantillons	Différence relative moyenne (%)	Déviations standard (%)	Erreur standard (%)	U (%)	Conclusion globale du test
Phase 2 + 3	193	-13,37	110,71	7,97	15,94	o
Phase 2	34	-48,71	108,36	18,58	37,17	-
Phase 3	159	-5,81	110,07	8,73	17,46	o

+ : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection supérieur

- : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection inférieur

O : Résultats ne permettant pas de conclure par manque de données

MSD : Méthode Sans Différence

La mise en place de tests complémentaires visant à révéler le caractère β -D-glucuronidase des bactéries *Escherichia coli* confirmées par la norme et par conséquent la correction des dénombrements, modifie la conclusion globale du test statistique lorsque les valeurs issues de l'étude comparative des échantillons de phase 2 et phase 3 sont regroupées. Ainsi en présence de ces tests supplémentaires, bien que des différences relatives moyennes négatives sont obtenues, il n'est plus possible de conclure et d'indiquer une tendance globale pour la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®. Ces derniers résultats sont le résultat d'une diminution des écarts de comptage entre les deux méthodes. Il est constaté que le nombre d'échantillons testés et retenus dans l'exploitation s'avère plus faible (193 versus 202 précédemment). Pour pouvoir conclure précisément, le test statistique indique qu'il faudrait plus de 500 échantillons supplémentaires.

Il est intéressant de noter que la tendance globale du test est différente selon la nature des échantillons employés dans l'exploitation. Ainsi s'il n'est pas possible de conclure lorsque les échantillons de phase 3 sont exploités ou lorsque les échantillons des deux phases sont regroupés, il n'en est pas de même lorsque les échantillons naturellement contaminés (phase 2) sont utilisés pour l'analyse statistique. Pour ces derniers échantillons, la tendance négative en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® reste confirmée même lorsqu'une étape supplémentaire de révélation de l'activité β -D-glucuronidase est ajoutée. Un rendement inférieur de l'ordre de -48,71% est obtenu sur les 34 échantillons testés lorsque la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® est utilisée. Il faut cependant préciser que pour les échantillons de phase 2, il peut être constaté que dans cette nouvelle configuration de confirmation des bactéries *Escherichia coli*, 34 échantillons sont déclarés non conformes par la présence de *Escherichia coli* alors qu'il était au nombre de 38 initialement.

En conclusion, les résultats de cette étude mettent en évidence une surestimation du nombre de bactérie *Escherichia coli* lorsque les deux méthodes sont employées pour dénombrer des bactéries *Escherichia coli* dans les échantillons hydriques. La proportion de bactéries surestimées est plus importante avec la méthode NF EN ISO 9308-1 par rapport à la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®. Sur des données de dénombrements caractérisant les bactéries *Escherichia coli* sur la production d'indole et l'activité β -D-glucuronidase, il

n'est plus possible de conclure quant à l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1. L'ajout de tests supplémentaires visant à révéler l'activité β -D-glucuronidase des bactéries productrices d'indole permet de limiter cette surestimation et semble, comme l'indique le rectificatif normatif de 2007 non en vigueur actuellement en Europe, avoir un intérêt afin de diminuer le nombre de faux positifs. Cependant il est observé concernant les échantillons naturellement contaminés de phase 2, que la correction des dénombrements par l'ajout de tests supplémentaires lorsque la méthode NF EN ISO 9308-1 est employée, maintient la tendance négative du test statistique en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®.

3.2.3 Analyse des résultats obtenus sur les échantillons de la phase 2. Introduction de la notion de sous-estimation

Dans la suite de ce travail d'évaluation, il nous est apparu essentiel de déterminer les raisons conduisant à une tendance négative en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® lorsque les échantillons de phase 2 étaient exploités. L'analyse détaillée des résultats de dénombrement des échantillons naturellement contaminés, met en évidence une sous-estimation plus importante de la présence des bactéries *Escherichia coli* dans les échantillons hydriques par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode normative NF EN ISO 9308-1 et ceci bien que des tests supplémentaires (confirmation de l'activité β -D-glucuronidase des bactéries *Escherichia coli* révélées par la méthode normative) soient opérés.

Ainsi, sur les 34 échantillons de la phase 2, la présence de bactéries *Escherichia coli* a été décelée simultanément par les deux méthodes dans 23 échantillons (67,7%) seulement. L'utilisation de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® n'a pas permis de révéler la présence de *Escherichia coli* dans 10 échantillons (29,4%) alors que ces bactéries ont été décelées par la méthode NF EN ISO 9308-1. A l'inverse cette dernière méthode n'a pas permis de détecter des bactéries *Escherichia coli* dans 1 échantillon sur 34 (2,9%) contrairement à la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®. Il semble au vu de ces derniers résultats qu'avec la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®, la détection des *Escherichia coli* dans les échantillons de la phase 2 soit sous estimée. Il faut cependant nuancer cette tendance compte tenu du faible nombre d'échantillons testés. A ce jour il existe peu de données disponibles au travers des études européennes réalisées sur ce type d'échantillons naturels puisque la plupart du temps, l'évaluation porte sur des échantillons artificiellement contaminés.

Comparativement, pour les échantillons de la phase 3, il est observé qu'en première instance chaque méthode sous-estime dans une proportion équivalente (autour de 10%) un pool d'échantillons. La confirmation des dénombrements de la norme NF EN ISO 9308-1, par des tests visant à confirmer l'activité de la β -D-glucuronidase inverse la tendance en défaveur de la méthode NF EN ISO 9308-1 qui sous-estime au final la présence de bactérie *Escherichia coli* dans 18,2% des échantillons de la phase 3 contre 8,1% pour la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®.

Le risque de sous estimation (résultats faux négatif) est lié à la présence de bactéries *Escherichia coli* n'exprimant pas le caractère recherché. Ainsi pour la méthode normative NF EN ISO 9308-1, il s'agirait de bactéries *Escherichia coli* ne produisant pas d'indole. Avec la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®, il s'agirait de bactéries E coli n'exprimant pas d'activité β -D-glucuronidase. Dans les deux cas précisés ci-dessus, les bactéries seraient assimilées à des coliformes. Dans l'environnement, il existe une proportion variable de *Escherichia coli* n'exprimant pas l'indole ou n'exprimant pas l'activité β -D-glucuronidase. L'exemple le plus représentatif est celui cité dans la nouvelle norme ISO 9308-2 de 2012 (Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria —

Part 2: Most probable number method) reprenant l'exemple des E coli Entérohémorragiques (ex H7 :O157), qui sont des bactéries pathogènes de classe 3 pouvant contaminer l'homme et qui n'expriment pas d'activité β -D-glucuronidase.

A partir de la base de données élaborée, tenant compte d'une part de la réponse des différents tests réalisés au travers de chaque méthode et d'autre part des résultats d'identification des

espèces isolées par spectrométrie de MALDI-TOF ou galeries biochimiques nous avons estimé la proportion de ces deux types de bactéries *Escherichia coli* (souches indoles négatives et souches β -D-glucuronidase négatives) dans les échantillons analysés.

Avec la norme de référence, la proportion de bactéries *Escherichia coli* parmi le pool de bactéries isolées n'exprimant pas la production d'indole a été déterminée à partir de bactéries ayant cultivé sur gélose tergitol, positive au lactose et négative au test oxydase (bactéries assimilées à des coliformes). Sur 308 souches identifiées par spectrométrie MALDI-TOF ou galerie biochimique n'exprimant pas d'indole (76 provenant de 35 échantillons différents issus de la phase 2 et 232 provenant de 101 échantillons issus de la phase 3), 14 souches (4,5 %) se sont révélées être en réalité des *Escherichia coli* comptabilisées par la méthode NF EN ISO 9308-1 comme des coliformes et non comme des *Escherichia coli*.

Concernant la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®, nous avons déterminé la proportion de bactéries *Escherichia coli* n'exprimant pas d'activité β -D-glucuronidase parmi les bactéries révélées comme des coliformes par la méthode. Sur 415 souches identifiées complètement par spectrométrie MALDI-TOF ou galeries biochimiques, isolées de puits jaunes non fluorescent (176 provenant de 45 échantillons de phase 2 et 239 provenant de 101 échantillons différents de la phase 3), il s'avère que 37 souches (8,9 %) se sont révélées être en réalité des *Escherichia coli* comptabilisés par la méthode comme étant des coliformes.

Tenant compte de ces derniers résultats, il est observé que les deux méthodes employées sont susceptibles de sous-estimer la présence de bactéries *Escherichia coli* dans les échantillons avec une tendance légèrement plus importante lorsque la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® est utilisée. A ce stade de l'évaluation, il faut être très prudent sur les proportions indiquées ci-dessus. En effet, comme nous l'avons précisé précédemment ces résultats sont obtenus sur la base des résultats des tests opérés par chaque méthode (révélation du caractère indole ou de l'apparition d'une fluorescence dans le puits de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®) et non sur la preuve d'un mécanisme biochimique ou moléculaire de la présence de ces deux voies métaboliques. Il pourrait être envisagé de possibles biais d'estimation entre autre liés à la procédure méthodologique suivie. Ainsi à titre d'exemple, pour la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®, la révélation de l'activité β -D-glucuronidase se fait après un délai d'incubation de 18h, ce qui fait qu'en cas de révélation tardive de cette activité, le pool de bactéries *Escherichia coli* non encore révélé ne sera pas comptabilisé comme des *Escherichia coli* mais comme des bactéries coliformes biaisant en réalité la proportion déterminée précédemment.

En conclusion, nous avons montré que les deux méthodes sont susceptibles de sous estimer un pool de bactérie *Escherichia coli* avec une tendance légèrement plus importante pour la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®. L'obtention de différence relative moyenne négative en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® sur les résultats des échantillons de phase 2 s'explique par l'absence de détection des bactéries E coli dans 30% des échantillons par cette dernière méthodologie.

3.2.4 Analyse statistique tenant compte uniquement de résultats de dénombrements >1 UFC ou NPP confirmant la présence de *Escherichia coli* dans les échantillons par les deux méthodes.

Nous venons de constater que les jeux de dénombrements dont un des résultats obtenu par une des deux méthodes conduisant à un dénombrement nul et leur exploitation dans l'analyse statistique pouvaient s'avérer problématique dans l'exploitation statistique qui s'en suit. Si comme l'indique la norme NF EN ISO 17994 :2004, il est inévitable d'obtenir ce type de données, l'exploitation d'un trop grand nombre de jeux de dénombrement déséquilibré devrait en termes de recommandation être évitée.

En ce qui concerne l'évaluation sur les bactéries *Escherichia coli*, il est pratiquement inévitable d'obtenir des résultats faibles de dénombrement pouvant conduire à un résultat nul d'une des deux méthodes, en particulier dans les échantillons environnementaux naturellement contaminés. En

effet la proportion des bactéries *Escherichia coli* parmi la totalité des bactéries coliformes présentes dans les eaux naturelles ou issues des dopages est déséquilibrée en défaveur des bactéries *Escherichia coli* qui, pour rappel, constituent une sous population de ce vaste groupe. Les résultats relatifs aux dénombrements des bactéries *Escherichia coli* sont étroitement liés à la valeur cible fixée pour les bactéries coliformes. De ce fait si une valeur pour les coliformes a été établie en suivant les recommandations de la norme NF EN ISO 17994, pour les bactéries *Escherichia coli* qui sont dénombrées lors de la même séquence analytique, cette cible ne pourra être atteinte et se trouvera en deçà. Pour obtenir une valeur cible équivalente, il aurait été nécessaire d'accentuer en proportion le dopage des eaux à tester avec la solution contaminée, ce qui aurait entraîné une augmentation de la présence des bactéries coliformes mais aussi de la flore interférente dans les échantillons à tester. Bien évidemment la présence d'une flore interférence en quantité trop importante aurait pu biaiser l'évaluation en altérant le rendement de détection de la méthode normative (voir le domaine d'application de cette méthode).

Dans les différentes analyses statistiques opérées jusqu'alors, seuls les jeux de valeurs de dénombrement nul, obtenues avec les deux méthodes ont été écartés de l'exploitation. Afin de diminuer l'impact des jeux de dénombrements déséquilibrés, nous avons décidé de conduire une nouvelle analyse statistique sur des jeux de dénombrements positifs (≥ 1 UFC ou 1 NPP) obtenus par les deux méthodes. Cette analyse statistique a été opérée dans un premier temps en tenant compte des résultats de dénombrements obtenus par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® après confirmation des puits positifs présomptifs par les tests normatifs de la méthode normative NF EN ISO 9308-1. Les résultats sont présentés dans le tableau 6. Dans un second temps de manière à limiter la surestimation des dénombrements de la méthode normative NF EN ISO 9308-1 sur le résultat final du test, ces derniers résultats ont été corrigés en tenant compte des résultats des tests supplémentaires visant à caractériser la production de la β -D-glucuronidase chez les bactéries isolées. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 6 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries *Escherichia coli* dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (confirmation des puits présomptifs) par rapport aux résultats de dénombrement obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1. Élimination des jeux de dénombrements ne révélant pas la présence de E coli dans les échantillons par une des deux méthodes

Laboratoires regroupements	Nombre d'échantillons	Différence relative moyenne (%)	Déviations standard (%)	Erreur standard (%)	U (%)	Conclusion globale du test
Phase 2 + 3	152	-36,41	102,71	8,33	16,66	-
phase 2	24	-33,08	118,86	24,26	48,53	o
phase 3	128	-37,03	99,91	8,83	17,66	-

+ : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection supérieur

- : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection inférieur

O : Résultats ne permettant pas de conclure par manque de données

MSD : Méthode Sans Différence

Tableau 7 : Résultats des tests comparatifs opérés sur les bactéries *Escherichia coli* dénombrées par la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (confirmation des puits présomptifs) par rapport aux résultats de dénombrement obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1 après corrections des valeurs de dénombrement par ajout d'un test révélant l'activité β -D-glucuronidase. Élimination des jeux de dénombrements ne révélant pas la présence de E coli dans les échantillons par une des deux méthodes

Laboratoires regroupements	Nombre d'échantillons	Différence relative moyenne (%)	Déviations standard (%)	Erreur standard (%)	U (%)	Conclusion globale du test
Phase 2 + 3	139	-22,48	102,61	8,70	17,41	-
Phase 2	23	-16,72	104,11	21,71	43,42	o
Phase 3	116	-23,62	102,73	9,54	19,08	-

+ : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection supérieur

- : Méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® présentant un rendement de détection inférieur

O : Résultats ne permettant pas de conclure par manque de données

MSD : Méthode Sans Différence

Selon le mode opératoire retenu, 139 à 152 échantillons dont environ 15% proviennent de phase 2 ont été employés pour opérer les différentes analyses statistiques. Le nombre d'échantillons répartis par laboratoire a oscillé entre 2 et 41.

Sur les dénombrements regroupés, il est observé une tendance globale négative en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® et ceci qu'il soit ajouté ou non un test complémentaire visant à révéler l'activité de la β -D-glucuronidase chez les bactéries *Escherichia coli* isolées par la norme NF EN ISO 9308-1. L'ajout d'une étape supplémentaire d'identification (test révélant l'activité β -D-glucuronidase) et la correction des dénombrements permet de réduire l'écart entre les différences relatives moyennes mesurées puisqu'elle passe de -36,41% à -22,48% en présence de tests supplémentaires.

Sur les échantillons regroupés par phase, les tendances observées sont différentes. Pour les échantillons de phase 2 à l'inverse des échantillons de phase 3, il n'est plus possible de conclure par manque d'échantillons mais aussi certainement en raison de résultats de dénombrements trop faibles.

En conclusion, la comparaison des résultats de dénombrements excluant les jeux déséquilibrés confirme la première tendance globale observée dans le paragraphe 3.1.2 à savoir que les deux méthodes ne sont pas équivalentes pour la détection des *Escherichia coli* dans les échantillons hydriques. Pour les *Escherichia coli* la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® procure un rendement de détection inférieur par rapport à la norme NF EN ISO 9308-1.

4 Conclusions

Cette étude avait pour objectif de prouver l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1 sur des échantillons hydriques représentatifs d'eaux traitées et distribuées sur le territoire Français. La démarche retenue a consisté à suivre le référentiel normatif NF EN ISO 17994 recommandé par le groupe EMG. Cette norme a été employée dans différentes études d'équivalences menées par d'autres états de la communauté européenne. L'évaluation de l'équivalence a été opérée sur plus de 200 échantillons provenant pour un quart de sites naturellement contaminés en bactéries coliformes et en bactéries *Escherichia coli* et pour le reste, artificiellement contaminés par des eaux de surfaces ou des eaux issues de rejet de STEP contenant la population bactérienne ciblée.

La sélection des échantillons a été opérée en tenant compte de différents critères (type de ressource, traitement, taille des stations, couverture nationale...) au travers de la base nationale SISE-Eaux de manière à être représentative des eaux produites au niveau du territoire. La participation de 9 laboratoires formés spécialement à la réalisation de cette étude et répartis géographiquement au niveau de différentes régions françaises a permis de tester la robustesse de la méthode. L'utilisation d'échantillons provenant de sites naturellement contaminés avait pour objectif de tester les deux méthodes dans des conditions proches de celles rencontrées lors de la réalisation d'analyses entrant dans le contrôle sanitaire. Ces échantillons ont permis de vérifier que le domaine d'application de méthode évaluée était en adéquation avec la nature des échantillons à analyser. Il faut souligner qu'il existe à ce jour très peu de résultats d'évaluation menés sur ce type d'échantillons dans les dossiers d'équivalence soumis à la Direction Générale de l'environnement (DG env). Ce type d'échantillon est rare et de ce fait complexe à sélectionner. Il est le plus souvent employé des échantillons d'eaux qui sont artificiellement contaminés par le biais d'eaux environnementales contenant les bactéries à cibler. Ces derniers micro-organismes sont préalablement soumis le plus souvent à un traitement au chlore de manière à « simuler » les situations pouvant être retrouvées sur le terrain. Il faut signaler qu'il a été constaté par plusieurs auteurs que l'origine des eaux, ou encore l'application ou non d'une étape supplémentaire visant à soumettre la population à un stress, pouvait avoir une influence sur le résultat final du test. De manière à mettre en évidence un effet lié à la préparation des échantillons, il a été systématiquement présenté dans cette étude les résultats de l'évaluation statistique comparative établie soit à partir des résultats de dénombrement provenant des échantillons regroupés (échantillons naturellement contaminés de la phase 2 + échantillons artificiellement dopés de la phase 3) soit tenant compte des données de dénombrements de chaque groupes d'échantillons à disposition (échantillons phase 2 ou échantillons de la phase 3).

En terme de résultats, il a été clairement démontré concernant les bactéries coliformes que la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® offrait un rendement de détection nettement plus important que la méthode NF EN ISO 9308-1 lorsque l'ensemble des échantillons étaient regroupés. Ainsi un rendement supérieur de plus de 41% a été déterminé pour ce groupe de bactéries. Les résultats obtenus dans cette étude sont globalement concordants avec les tendances relayées dans divers dossiers publiés au niveau européen. Il est difficile d'indiquer avec précision l'explication de cette tendance. Comme nous l'avons précisé dans le chapitre 3.1.1, cette tendance pourrait être expliquée par une meilleure revivification des bactéries dans le milieu liquide chromogénique ou par la présence d'une flore interférente pouvant gêner le rendement de la méthode NF EN ISO 9308-1. Sur les échantillons provenant de sites contaminés (phase 2), une variabilité dans les résultats plus importante a été mesurée, ce qui atténue la conclusion finale du test. Pour ces échantillons, l'équivalence est également confirmée et les deux méthodes s'avèrent en réalité sans différence. Ces différents résultats nous permettent de conclure en l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1 sur les différentes eaux représentatives testées pour la détection des bactéries coliformes.

Pour les bactéries *Escherichia coli*, les résultats d'évaluation sont plus contrastés et dépendent globalement des échantillons exploités dans l'analyse statistique mais aussi d'un point de vue méthodologique des tests employés pour confirmer leur présence dans les échantillons hydriques.

En première instance, l'étude d'équivalence menée sur les échantillons de la phase 2 et de la phase 3 selon le référentiel NF EN ISO 17994 :2004 a conclu que la méthode Colilert®-18/Quantitray® n'était pas équivalente à la méthode NF EN ISO 9308-1 de part des dénombrements de bactéries plus faibles à ceux obtenus par la méthode de référence. Ces résultats sont globalement discordants avec ceux obtenus dans plusieurs dossiers qui ont démontré l'équivalence de la méthode. En revanche, ils sont très similaires à ceux publiés dans le dossier espagnol, dossier qui s'avère être à ce jour le dossier le plus complet dans ce domaine.

Il a été constaté que la tendance négative mesurée était liée à une surestimation du nombre de bactéries *Escherichia coli* par la norme NF EN ISO 9308-1 dans les échantillons testés. L'ajout de tests supplémentaires visant à prouver chez les bactéries « indoles positives » la présence d'une activité β -D-glucuronidase et par conséquent la correction des résultats des dénombrements après révélation de cette activité, a conduit à ne plus pouvoir conclure quant à la tendance du test statistique établi sur l'ensemble des échantillons. La notion de surestimation par la norme NF EN ISO 9308-1 des bactéries *Escherichia coli* est évoquée dans un rectificatif technique élaboré par le comité technique ISO/TC147 en 2007. Elle serait entre autre due à la présence de souches de *Klebsiella oxytoca* qui sont thermotolérantes et qui peuvent donner une réaction positive à l'Indole. De manière à minimiser ces faux positifs, ce groupe technique recommande la réalisation de tests supplémentaires β -D-glucuronidase. L'utilisation de tels tests n'est pas préconisée par le groupe EMG. Le même constat de surestimation a été relayé dans divers dossiers d'équivalence soumis à la DG ENV. Dans le dossier espagnol, les résultats obtenus après la réalisation de ces tests (basés sur la révélation du caractère de l'activité β -D-glucuronidase) sur un pool de colonies en association avec la recherche du phénotype des bactéries isolées par la réalisation de galeries miniaturisées, ont suffi à justifier la preuve de l'équivalence de la méthode Colilert®-18/Quantitray® par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1 en dépit de la conclusion négative obtenue en premier lieu. Dans cette étude, l'ajout de tests supplémentaires opérés systématiquement par les laboratoires participants sur tous les échantillons analysés par la norme de référence NF EN ISO 9308-1 et sur au moins 3 colonies *Escherichia coli* détectées, a permis de corriger tous les résultats de dénombrement à disposition et donc de les exploiter statistiquement. Bien évidemment, il peut être regretté qu'un nombre restreint de colonies *Escherichia coli* aient été testées, ce qui peut avoir introduit une imprécision dans le dénombrement de la méthode normative NF EN ISO 9308-1.

En réalité nous avons constaté, à partir des données d'identification obtenues par spectrométrie de masse ou par galeries miniaturisées sur les bactéries isolées en se basant uniquement sur le résultat des tests utilisés dans le principe de chaque méthode (bactéries Indole positive pour la norme de référence et bactérie β -D-glucuronidase positive pour la méthode Colilert®-18/Quantitray®), que les deux méthodes étaient susceptibles de surestimer un nombre non négligeable de bactérie *Escherichia coli* avec une tendance plus importante pour la méthode normative (21,1% versus 31,8% respectivement pour la méthode Colilert®-18/Quantitray® et NF EN ISO 9308-1).

Il faut préciser que si l'ajout de tests supplémentaires révélant l'activité de la β -D-glucuronidase permet de mettre en place une seconde étape de confirmation au niveau des bactéries isolées par la norme de référence limitant dès lors la surestimation, il peut être envisagé qu'inversement ces tests conduisent à invalider injustement la présence de bactéries *Escherichia coli* détectées par la norme et qui ne présentent pas d'activité β -D-glucuronidase. Dans l'environnement, il existe au sein des espèces *Escherichia coli*, des phénotypes n'exprimant pas d'activité β -D-glucuronidase. L'exemple le plus représentatif est celui des *Escherichia coli* entérohémorragique productrices de shigatoxines qui sont des bactéries *Escherichia coli* présentes dans les milieux hydriques environnementaux. Ces bactéries seraient dès lors assimilées à des coliformes ce qui entraînerait dans ce cas particulier une réelle sous-estimation de risque stricto sensu si elles venaient à être présentes dans les eaux. La notion de sous estimation de ces bactéries est clairement abordée

dans le domaine d'application de la nouvelle norme ISO 9308-2 dont le principe est basé sur la méthode évaluée dans ce dossier.

La notion de sous estimation du nombre de bactéries *Escherichia coli*, et donc par voie de conséquence l'obtention de résultats pouvant sous-estimer un risque en terme sanitaire, est peu abordée dans les dossiers européens. En réalité, à partir des données d'identification des bactéries isolées par les deux méthodes et en tenant compte des résultats des différents tests effectués, il a été démontré que les deux méthodes évaluées étaient susceptibles de sous-estimer un pool de bactéries *Escherichia coli* présentes dans les échantillons avec une tendance légèrement plus importante pour la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (8,9% versus 4,5% pour la méthode NF EN ISO 9308-1). Il faut être relativement prudent sur les pourcentages exprimés ci-dessus puisqu'ils tiennent compte de données d'identification et des résultats des différents tests opérés au travers de chaque méthodologie. La proportion de bactéries *Escherichia coli* présentant des caractéristiques phénotypiques faisant qu'elles seront sous-estimées par les tests mises en place dans les deux méthodologies est dans l'environnement peu connue et reste à ce jour globalement très controversée par la communauté scientifique.

Concernant plus spécifiquement les échantillons provenant de sites contaminés (échantillon de phase 2), il est constaté que, même après correction des données de dénombrements obtenus par la norme NF EN ISO 9308-1 par l'ajout de tests révélant l'activité de la β -D-glucuronidase, la tendance du test statistique reste inchangée. Sur ces échantillons, la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® procure des dénombrements inférieurs. Nous avons démontré que cette tendance était liée à une sous estimation du nombre de bactéries *Escherichia coli* décelées dans ce type échantillons sans pour autant expliquer les raisons de ce constat. Inversement, pour les échantillons de la phase 3 artificiellement dopés avec les solutions bactériennes ciblées stressées, provenant d'eaux de surfaces ou d'eaux de rejets de STEP, la proportion d'échantillons dans lesquels une sous-estimation se produit est équivalente lorsque les valeurs de dénombrement obtenues par la norme de référence ne sont pas corrigées et s'inverse en défaveur de la norme après correction de ces derniers. Ces résultats discordants selon le type d'échantillons traduisent très certainement la présence de populations bactériennes présentant des phénotypes différents.

Au travers de cette étude nous avons constaté que les jeux de données de dénombrements déséquilibrés (résultats de dénombrements nuls obtenus par une des deux méthodes), quelle que soit la méthode prise en référence, pouvaient s'avérer être problématiques dans la conclusion du test statistique. Bien que ces données permettent de qualifier la robustesse de chaque méthode évaluée dans des conditions opératoires proches de celles rencontrées sur le terrain, ce type de jeux ne permet pas de caractériser précisément l'étendue de la différence relative mesurée sur les populations ciblées présentes dans chaque échantillon testé, et donc au final, d'évaluer la performance de chaque méthode. Au niveau des dossiers européens la proportion d'échantillons générant des dénombrements déséquilibrés n'est pas indiquée. Les données brutes ne sont pas systématiquement retranscrites dans les études publiées et seules les différences relatives moyennées sont communiquées. Comme nous l'avons précédemment évoqué, il est presque inévitable sur les bactéries *Escherichia coli* qui constituent une sous population du groupe vaste des coliformes, d'obtenir de tels jeux. Pour ces bactéries, l'obtention d'une valeur cible prédéfinie est complexe à atteindre car elle est dépendante de la proportion du dopage (volume/volume) avec les eaux environnementales utilisées. Pour obtenir une valeur cible importante, il aurait été nécessaire d'accentuer cette proportion de dopage avec le risque, pour la suite de l'évaluation, d'augmenter la flore bactérienne interférente pouvant avoir un impact sur le rendement d'une des deux méthodes et donc par conséquence biaiser l'étude d'évaluation. L'utilisation de solutions pures contenant des bactéries *Escherichia coli* auraient pu résoudre ce problème. Or pour rappel l'utilisation de solution pure est à proscrire voir à employer en dernier ressort dans les études d'évaluation d'équivalence car elles ne sont pas représentatives des bactéries retrouvées dans l'environnement.

De manière à nous placer dans une démarche d'évaluation comparative « stricte » en utilisant des échantillons contenant les bactéries ciblées, révélées par les deux méthodes, il a été décidé

finalement d'exclure volontairement de l'analyse statistique les jeux de dénombrements déséquilibrés issus d'échantillons de phase 2 et de phase 3. Selon la méthodologie retenue, 139 à 152 échantillons se sont révélés contenir des *Escherichia coli* décelés par les deux méthodes dont environ 15% sont issus de la phase 2. Sur ces échantillons, la tendance négative en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® mise en évidence en première instance a été confirmée et ceci en présence ou non de tests supplémentaires visant à confirmer l'activité β -D-glucuronidase des bactéries produisant de l'indole isolées par la norme de référence. L'obtention de variations importantes proche de 100% dans le cadre de cette évaluation a été expliquée par une proportion importante d'échantillons contenant un faible nombre de bactéries (<10 colonies) obtenus par une des deux méthodes. De manière à diminuer ces variations, de nouvelles analyses statistiques ont été opérées en tenant compte de valeurs de dénombrements >5 UFC ou NPP (obtenus par les deux méthodes) et ont confirmé la tendance négative en défaveur de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (variation réduite autour de 50%).

Il est difficile d'expliquer avec précisions pourquoi des dénombrements plus faibles sont obtenus pour les bactéries *Escherichia coli* avec la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® sur les échantillons testés. Il n'est pas possible d'indiquer si ces résultats sont exclusivement liés à un problème méthodologique de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® (temps d'incubation insuffisant, milieu de culture inadapté...) ou en lien avec des proportions de phénotypes *Escherichia coli* (%*Escherichia coli* Indole positive, % *Escherichia coli* Indole négative, % *Escherichia coli* β -D-glucuronidase positive ou % *Escherichia coli* β -D-glucuronidase négative) retrouvées dans les eaux françaises différentes de celles rencontrées dans des eaux testées dans d'autres pays de la communauté européenne.

Par conséquent, compte tenu de ces différents résultats, dans l'état actuel des connaissances acquises au travers de cette étude comparative menée sur des échantillons représentatifs provenant de sites naturellement contaminés et artificiellement contaminés, nous ne recommandons pas l'emploi de la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray®, dans les conditions et selon le mode opératoire prescrit par le fournisseur, pour la détection de bactéries *Escherichia coli* dans les échantillons hydriques du contrôle sanitaire.

Date de validation du rapport : 9 février 2017

5 Bibliographie

5.1 Normes

NF EN ISO 9308-1 (septembre 2000) Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 1 : Méthode générale par filtration sur membrane

NF EN ISO 17994 (avril 2014) Qualité de l'eau - Exigences pour la comparaison du rendement relatif des microorganismes par deux méthodes quantitatives

5.2 Législation et réglementation

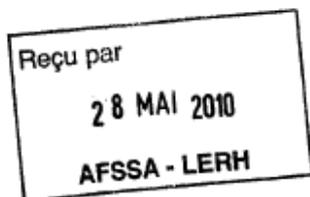
MINISTERE DE LA SANTE, DES FAMILLES ET DES PERSONNES HANDICAPEES. Arrêté du 17 septembre 2003 relatif aux méthodes d'analyse des échantillons d'eau et à leurs caractéristiques de performance. Journal officiel de la République Française, n°258, page 19027, texte n° 20, du 7 novembre 2003. En ligne

<<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000247611&fastPos=1&fastReqId=1449584004&categorieLien=id&oldAction=rechTexte>>

CONSEIL DE L'UNION EUROPEENNE. Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Journal Officiel de l'Union Européenne, n°L330, page 32, du 5 décembre 1998. En ligne <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?qid=1458310800760&uri=CELEX:31998L0083>>

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de la demande



Ministère de la Santé et des Sports

Direction générale de la santé

Paris, le 25 MAI 2010

Sous direction Prévention des risques liés à
l'environnement et à l'alimentation
Bureau Qualité des eaux

DGS/EA4 – N° 224

Le Directeur général de la santé

à

Personne chargée du dossier :

Béatrice JÉDOR
Tél. : 01.40.56.45.99
Fax : 01.40.56.50.56
E-mail : beatrice.jedor@sante.gouv.fr

Monsieur le Directeur du Laboratoire
d'Etudes et de Recherches en Hydrologie
(LERH – AFSSA)
40, rue Lionnois
54000 NANCY

Objet : Demande d'appui scientifique et technique – Equivalence du test de potabilité des eaux Colilert®-18 / Quanti-tray® pour la recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes dans les eaux destinées à la consommation humaine par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1

NRéf : DGS N° 100019 (numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance)

La directive 98/83/CE du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) prévoit la recherche de paramètres microbiologiques et fixe, à cette fin, les méthodes d'analyse, dites de référence, à utiliser (annexe III, partie 1) tout en spécifiant que des méthodes alternatives peuvent être utilisées « à condition qu'il puisse être démontré que les résultats obtenus sont au moins aussi fiables que ceux obtenus par les méthodes spécifiées à l'annexe III, partie 1 ». La directive 98/83/CE ne précisant pas de référentiel normatif ou de guide d'évaluation des méthodes alternatives, la Direction générale de l'Environnement de la Commission Européenne (CE) en charge de l'eau d'alimentation a mandaté en 2007 un groupe consultatif, l'European Microbiology Group (EMG), composé d'experts en microbiologie, afin d'évaluer les dossiers de demande d'équivalence des méthodes alternatives. La direction générale de la santé (DGS) a chargé l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) et votre laboratoire d'y représenter la France.

Pour mémoire, l'EMG s'appuie sur des lignes directrices, basées sur l'unique norme internationale existante définissant une procédure d'évaluation dans le domaine de l'eau, la norme NF EN ISO 17994 : 2004. Il appartient aux industriels souhaitant commercialiser des méthodes alternatives, de fournir les preuves de l'équivalence. Lorsqu'elle est accordée, cette équivalence est reconnue uniquement dans l'Etat-membre qui a porté le dossier auprès de la CE. Parallèlement, l'Agence française de normalisation (AFNOR) a initié en 2004 un projet de validation par tierce partie des méthodes alternatives. Initialement, le groupe de travail mis en place par l'AFNOR-Validation avait décidé de retenir le référentiel NF EN ISO 17994 : 2004 et de le compléter. Mais finalement, le groupe de travail a retenu la norme NF EN ISO 16140, utilisée pour la validation des méthodes microbiologiques alternatives pour les aliments.

Le rapport remis par votre laboratoire à la suite de ma demande d'appui scientifique et technique relatif à l'équivalence des méthodes alternatives par rapport aux méthodes de référence dans le domaine de l'eau d'alimentation (saisine 2007-SA-0192, juin 2007) met en évidence un certain nombre de différences entre le référentiel de l'AFNOR-Validation et celui utilisé par l'EMG, la principale étant l'absence d'essais sur des échantillons représentatifs des eaux distribuées en France dans le référentiel de l'AFNOR-Validation.

Bien que la DGS ait régulièrement alerté l'AFNOR-Validation et la société Idexx Laboratories sur ces divergences et le risque de non reconnaissance par la DG Environnement de dossier ne suivant pas le référentiel de l'EMG, celle-ci a déposé fin 2008 une demande de validation de la méthode Colilert®-18 / Quanti-Tray® pour l'eau de consommation humaine auprès de l'AFNOR-Validation. L'AFNOR-Validation a validé cette méthode début 2010 selon son propre référentiel.

Lors de la réunion du 10 mars 2010 avec le cabinet de Mme la Ministre, il a été convenu de la nécessité de tester la méthode sur différentes eaux françaises (EDCH, eaux brutes d'origine superficielle ou souterraine utilisées pour la production d'EDCH). Le choix des types d'eaux sera déterminé à partir de l'examen des résultats des essais menés par la Société Idexx sur différentes eaux européennes.

Aussi, je sollicite votre appui scientifique et technique pour réaliser cette étude complémentaire en mettant en œuvre les moyens que vous jugerez nécessaires. La Société Idexx fournira les tests de potabilité des eaux Colilert®-18 / Quanti-tray®. Un rapport intermédiaire de cet appui scientifique et technique est attendu pour le mois de septembre 2010. Votre avis est d'autant plus important qu'il n'est pas envisagé de consulter le groupe EMG.

Je vous précise, enfin, que ce dossier est enregistré à la Direction générale de la santé sous l'intitulé suivant :

**DEMANDE D'APPUI SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE SUR L'EQUIVALENCE DU TEST DE POTABILITE
DES EAUX COLILERT®-18 / QUANTI-TRAY® POUR LA RECHERCHE ET LE DENOMBREMENT DES
E. COLI ET DES COLIFORMES DANS LES EAUX DESTINEES A LA CONSOMMATION HUMAINE
PAR RAPPORT A LA METHODE DE REFERENCE NF EN ISO 9308-1**

et porte le numéro : DGS N° 100019.


Jocelyne BOUDOT
Sous-directrice de la prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation

Notes



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr /  @Anses_fr