



# Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées

1ères rencontres nationales  
« Gestion des baignades en eau douce »

Cahors, 25 juin 2009

J.-S. Pharamond  
*Ingénieur microbiologiste*



## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



### Institut Pasteur de Lille – Secteur d'activité Eaux & Environnement

- ✓ Sites à Lille (5800 m<sup>2</sup>) et à Gravelines (550 m<sup>2</sup>) : 160 personnes
- ✓ Agréments : Ministère de la Santé, Ministère de l'Environnement, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.
- ✓ Accréditation : 100-1 (chimie) , 100-2 (microbiologie) , 100-3 (hydrobiologie) , 134 (sols environnement) , 156 (boues sédiments) , 96 (sols agronomie) , 97 (polluants atmosphériques) , 99-2 (micropolluants fruits légumes) , 94 (qualité air lieux de travail) , prélèvements
- ✓ > 1 million de déterminations analytiques élémentaires sur plus de 74 000 échantillons
- ✓ Participation aux travaux de normalisation (AFNOR, CEN, ISO), à des groupes de réflexion (AFSSA, RITEAU)



## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées

- Historique
- Le processus de validation
- Exemple de validation de nouvelle méthode  
en cours : méthode XplOrer64™



## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



### Historique

Le processus de validation

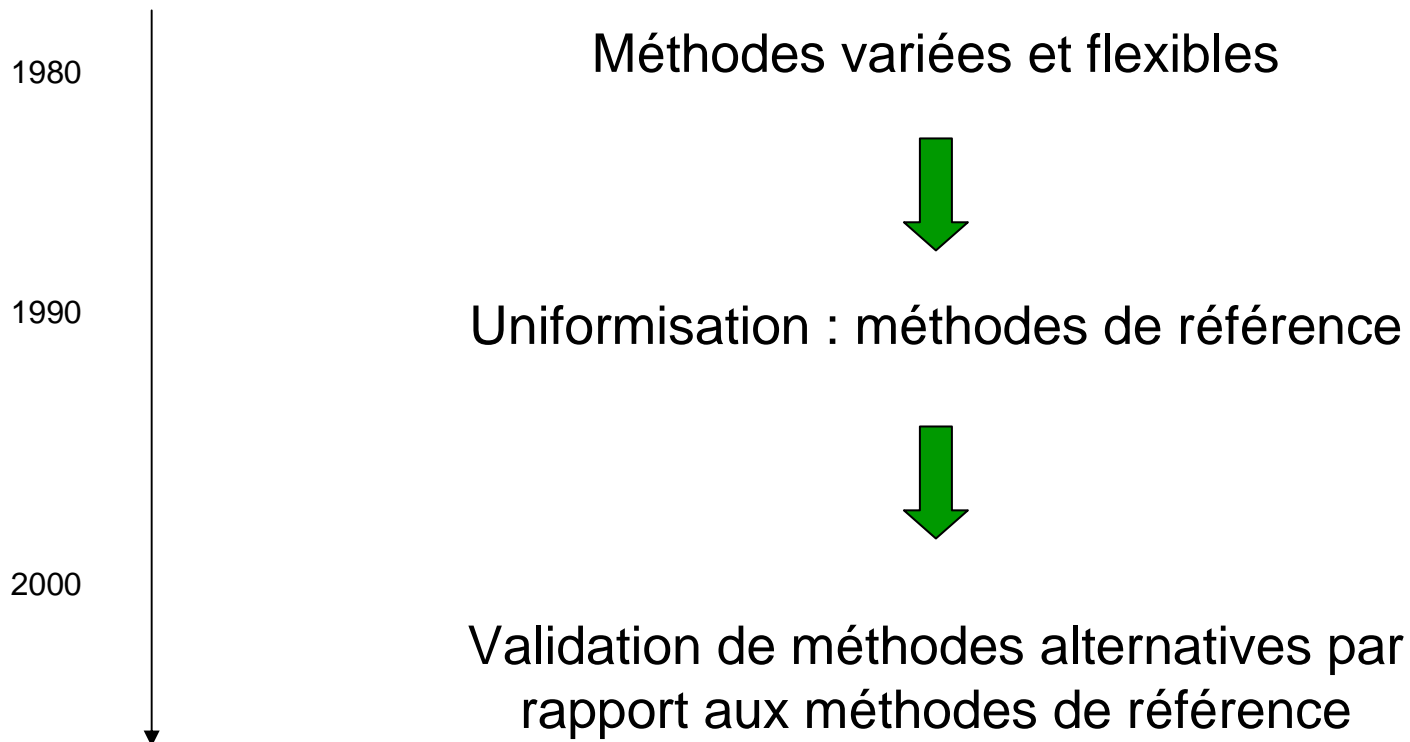
Exemple de validation de nouvelle méthode en cours : méthode XplOrer64™



Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



Historique





## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées

- Historique

- Le processus de validation**

- Exemple de validation de nouvelle méthode en cours : méthode XplOrer64™



## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



### La marque AFNOR Validation

- **Kits commerciaux** (« méthodes alternatives ») sur le marché de l'analyse microbiologique
  - Rapidité d'analyse et/ou de réponse
  - Facilité d'exécution et/ou d'automatisation
  - Caractéristiques analytiques (limites de détection, etc.)



- Besoin de **garanties** par les **utilisateurs** quant aux performances de ces kits



- Mise au point par **AFNOR Certification** d'un système de validation de ces méthodes commerciales assurant que les **résultats** obtenus avec les kits commerciaux sont **équivalents** aux résultats obtenus avec méthodes normalisées.





## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



### Intervenants

- **Commission de Validation** qui pilote l'activité
- **Bureau technique** d'experts en microbiologie qui instruisent les dossiers et évaluent les résultats
  - ✓ Utilisateurs
  - ✓ Organismes techniques
  - ✓ Pouvoirs publics
  - ✓ Fabricants
- **Laboratoires experts** qualifiés pour réaliser les études de validation
- **Auditeurs** qualifiés pour réaliser les audits sur les sites de production



Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



## Évaluation de la méthode en 2 étapes

1. Étude complète de **validation par un laboratoire expert** indépendant selon un protocole fixé
  - ✓ étude préliminaire
  - ✓ étude interlaboratoire
2. Réalisation d'un **audit sur le site de production** du kit à valider

➔ Délivrance de la marque AFNOR Validation pour une durée de 4 ans, assortie d'une surveillance des kits validés par des audits réguliers.



## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées

Historique

Le processus de validation


➔  **Exemple de validation de nouvelle méthode  
en cours : méthode XplOrer64™**




## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



Exemple de validation de nouvelle méthode en cours :

- **Fabricant** : Bio-Rad 
- **Laboratoire expert** : Institut Pasteur de Lille
- **Méthode à valider** : méthode XplOrer64™ pour le dénombrement des *E. coli* et des entérocoques intestinaux
- **Référentiel de validation** : Protocole de Validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence (révision 0) adapté par AFNOR Certification le 28/07/2008
- **Méthodes de référence** : NF EN ISO 9308-3 <sup>(1)</sup> (*E. coli*) et NF EN ISO 7899-1 <sup>(1)</sup> (entérocoques intestinaux)
- **Domaine d'application** : eaux de baignade (eaux douces et eaux de mer)



<sup>(1)</sup> Les analyses normalisées réalisées dans le cadre de cette validation ont été réalisées sous accréditation COFRAC 

## Présentation de méthode XplOrer64™

(Méthode automatisée par mesure d'impédancemétrie, sans confirmation)



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



Pliage de la membrane



Transfert de la membrane dans la cellule de mesure contenant le milieu liquide CheckN'Safe™ *E.coli* ou CheckN'Safe™ *Enterococci*



Lecture en continu des résultats sur l'écran du PC relié à l'automate

Transfert de la cellule dans l'automate, incubation à 44°C pendant 8h pour *E. coli*, à 37°C pendant 12,5h pour entérocoques. Lecture automatisée des cellules en continu, à intervalle de 10 min



Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



Intérêts de la méthode XplOrer64™ par rapport à la méthode normalisée :

- **Durée d'ensemencement** un peu plus rapide
- **Délais d'obtention des résultats** significativement plus courts
- **Mesure en continu** des échantillons incubés et **affichage en temps réel** des résultats sur l'écran
- Résultats directement exploitables par rapports aux **valeurs réglementaires** grâce à un code couleur pré-enregistré

## Visualisation des résultats obtenus avec la méthode XpIOrer64™

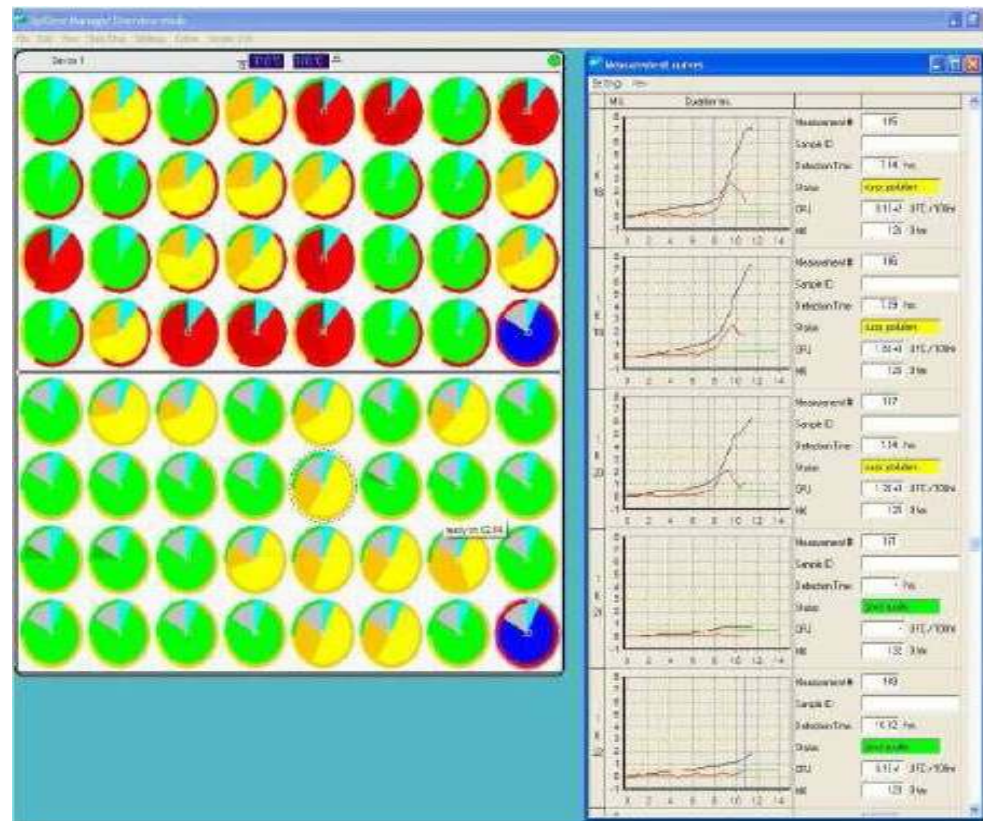
Compartiment A pour l'incubation d'*E. coli*

Compartiment B pour l'incubation d'entérocoques



A

B



Résultats consultables en temps réel

### Délais d'obtention de résultats avec la méthode XplOrer64™

Directive	Origine	Paramètre	Limite 1	Limite 2
76/160/CEE	eau douce et eau de mer	E. coli	100 / 100 ml $T_D = 6h18$	2000 / 100 ml $T_D = 4h20$
		Entérocoques	100 / 100 ml $T_D = 10h01$	-
2006/7/CE	eau de mer	E. coli	250 / 100 ml $T_D = 5h33$	500 / 100 ml $T_D = 5h05$
		Entérocoques	100 / 100 ml $T_D = 10h01$	250 / 100 ml $T_D = 9h18$
	eau douce	E. coli	500 / 100 ml $T_D = 5h05$	1000 / 100 ml $T_D = 4h42$
		Entérocoques	200 / 100 ml $T_D = 9h28$	400 / 100 ml $T_D = 9h00$



## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



### Étude préliminaire / validation de la méthode XplOrer64™

- Évaluation de la **sélectivité** pour le paramètre ***E. coli*** sur :
  - **20 souches d' *E. coli***  
souches en majorités isolées à partir d'échantillons d'eau de baignade
  - **20 souches de germes interférents**  
Dont 60% de coliformes



#### **Conclusion :**

**Résultats jugés satisfaisants** par le Bureau Technique ; légère interférence avec *Enterobacter sakazakii* et *Salmonella* pour le paramètre *E. coli*, mais non significative.



Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



## Étude préliminaire / validation de la méthode XplOrer64™

- Évaluation de la **sélectivité** pour le paramètre **entérocoques intestinaux** sur :
  - **30 souches d'entérocoques intestinaux**  
souches en majorité isolées à partir d'échantillons d'eau de baignade
  - **30 souches de germes interférents**  
Dont 60% de cocci



**Conclusion :**

*Résultats jugés satisfaisants par le Bureau Technique.*



Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



## Étude préliminaire / validation de la méthode XplOrer64™

- Évaluation de la **linéarité** et de l'**exactitude relative**
  - Prélèvement **d'échantillons naturels** dans des lieux différents

	Eau douce	Eau de mer	Total
Nombre d'échantillons analysés	51	108	159

- **Origine** des échantillons : 74% du Nord-Pas-De-Calais, 16% de Bretagne (prélevés par IPL SED Bretagne), 10% du Languedoc-Roussillon (prélevés par IPL SED Méditerranée)
- Analyses physico-chimiques pour **caractérisation** des échantillons (pH, turbidité, matières en suspension, salinité)



Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



## Étude préliminaire / validation de la méthode XplOrer64™

- Évaluation de la **linéarité** et de **l'exactitude relative**
  - Analyses microbiologiques des échantillons par **méthode normalisée** et **méthode alternative**
  - **Exploitation statistique** des résultats



### **Conclusion :**

*Résultats jugés satisfaisants par le Bureau Technique. Résultats sur eaux de mer fortement contaminée à compléter avec des nouveaux résultats, en raison du faible nombre de données obtenu.*



## Validation de nouvelles méthodes d'analyses par rapport aux méthodes normalisées



### Étude préliminaire / validation de la méthode XplOrer64™

- **Conclusion :**

- **Résultats d'étude préliminaire acceptés par le Bureau Technique pour les 2 paramètres**

- **L'étape suivante du processus de validation, l'étude collaborative, peut donc être lancée.**

*(Liste des laboratoires participants à fournir par Bio-Rad et à valider par AFNOR Certification avant lancement)*



*Merci de votre attention*

J.-S. Pharamond

03 20 87 77 30

[jean-sebastien.pharamond@pasteur-lille.fr](mailto:jean-sebastien.pharamond@pasteur-lille.fr)

“le virus de l’expertise...”