
**Qualité de l'eau — Lignes directrices pour
la validation des méthodes
microbiologiques**

Water quality — Guidance on validation of microbiological methods

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TR 13843:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2cbbf67b-df16-4c59-ab43-136c9a78a94e/iso-tr-13843-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2cbbf67b-df16-4c59-ab43-136c9a78a94e/iso-tr-13843-2000>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TR 13843:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2cbbf67b-df16-4c59-ab43-136c9a78a94e/iso-tr-13843-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2cbbf67b-df16-4c59-ab43-136c9a78a94e/iso-tr-13843-2000>

© ISO 2000

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 734 10 79
E-mail copyright@iso.ch
Web www.iso.ch

Imprimé en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
1 Domaine d'application.....	1
2 Termes et définitions.....	1
3 Organisation du document.....	8
4 Concepts de base.....	8
4.1 Généralités.....	8
4.2 Validation.....	8
4.3 Détecteurs.....	11
4.4 Caractéristiques de performance.....	12
4.5 Spécifications.....	12
5 Limites et caractéristiques des méthodes microbiologiques.....	12
5.1 Rendement de l'analyte.....	12
5.2 Variance de l'échantillon.....	13
5.3 Distribution et surdispersion des particules.....	13
5.4 Interactions dans le détecteur.....	13
5.5 Robustesse.....	13
5.6 Erreurs parasites.....	14
5.7 Cartes de contrôle et guides.....	14
6 Modèles mathématiques de variation.....	15
6.1 Variation de base inévitable — Distribution de Poisson.....	15
6.2 Surdispersion — Modèle binomial négatif.....	18
6.3 Limites statistiques et pratiques.....	21
6.4 Essais généraux à caractère aléatoire — Détection de la surdispersion.....	22
7 Spécifications — Pratique actuelle.....	22
8 Spécifications — Approche recommandée.....	23
9 Détermination et expression des caractéristiques de performance.....	24
9.1 Généralités.....	24
9.2 Caractéristiques catégoriques liées à la spécificité et à la sélectivité.....	24
9.3 Limites de travail.....	26
9.4 Gamme de travail des méthodes NPP.....	26
9.5 Fidélité.....	27
10 Méthodes et étapes de validation.....	28
10.1 Généralités.....	28
10.2 Validation primaire.....	28
10.3 Validation secondaire.....	30
11 Modèles de détermination des spécifications.....	30
11.1 Modèle général pour les spécifications quantitatives de base.....	30
11.2 Fidélité de l'intégralité de la méthode analytique.....	31
11.3 Caractéristiques de catégories.....	31
11.4 Données non planifiées.....	31
Annexe A Méthodes statistiques et programmes informatiques statistiques.....	32
Annexe B Exemples numériques.....	35
Annexe C Exemple d'expérience de validation.....	45
Bibliographie.....	46

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comité membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

Exceptionnellement, lorsqu'un comité technique a réuni des données de nature différente de celles qui sont normalement publiées comme Normes internationales (ceci pouvant comprendre des informations sur l'«état de la technique», par exemple), il peut décider, à la majorité simple de ses membres, de publier un Rapport technique. Les Rapports techniques sont de nature purement informative et ne doivent pas nécessairement être révisés avant que les données fournies ne soient plus jugées valables ou utiles.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent Rapport technique peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO/TR 13843 a été élaboré par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

ISO/TR 13843:2000
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2cbbf67b-df16-4c59-ab43-136c9a78a94e/iso-tr-13843-2000>

Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques

1 Domaine d'application

Le présent Rapport technique traite de la validation des méthodes microbiologiques. L'accent est mis sur les méthodes quantitatives sélectives, dans lesquelles l'estimation quantitative repose sur le comptage des particules, soit directement à l'aide d'un microscope, soit indirectement en se basant sur la croissance (multiplication) des colonies ou l'apparition d'une turbidité.

Les principes et les modes opératoires entrant dans le domaine d'application sont généralement présence/absence (P/A), le nombre le plus probable (NPP), le comptage de colonies et le comptage (microscopique) direct.

Le présent Rapport technique n'est pas applicable à la validation des méthodes dites rapides ou modernes, qui dépendent le plus souvent du mesurage des produits ou des modifications résultant de l'activité microbienne, mais lesquelles ne concernent pas la détection de particules individuelles.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

2 Termes et définitions

Pour les besoins du présent Rapport technique, les termes et définitions suivants s'appliquent.

2.1

exactitude d'un mesurage

étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée

NOTE Le terme «exactitude», appliqué à un ensemble de résultats d'essai implique une combinaison de composantes aléatoires et une erreur systématique commune ou une composante de biais.

[ISO 3534-1:1993, 3.11]

2.2

analyte

quantité mesurée

quantité particulière soumise au mesurage

NOTE 1 Voir référence [5].

NOTE 2 En microbiologie, l'analyte est de préférence défini par une liste d'espèces définies de manière taxonomique. Dans de nombreux cas pratiques, l'analyte peut uniquement être défini par des désignations de groupe moins précises que les définitions taxonomiques.

2.3

prise analytique

prise d'essai

volume d'une suspension de particules inoculé dans une unité de détecteur

NOTE Exemples d'unité de détecteur: boîte de gélose, membrane filtrante, tube d'essai, grille carrée microscopique.

2.4

gamme d'application

gamme de concentrations de particules soumise en routine au mesurage par une méthode

2.5

caractéristique de catégorie

caractéristique de performance de la méthode exprimée numériquement sous forme de fréquence relative basée sur une classification P/A ou +/-

2.6

UFC, terme rejeté

unité formant colonies, terme rejeté

PFC, terme rejeté

particule formant colonies, terme rejeté

NOTE Ces termes ont été introduits à l'origine pour communiquer l'idée qu'une colonie peut provenir non seulement d'une seule cellule mais également d'une chaîne solide ou d'un agrégat de cellules, d'un groupe de spores, d'un morceau de mycélium, etc. Par erreur, le nombre de colonies observé est égal au nombre d'entités vivantesensemencées dans le milieu. L'unité de croissance, la particule viable, la **propagule** (2.27) et le **germe** (2.13) sont des termes ayant une signification similaire, mais qui transmettent mieux l'idée initiale et s'appliquent non seulement aux méthodes de comptage des colonies mais aussi aux NPP et P/A.

2.7

coefficient de variation

CV

écart-type relatif

pour un caractère non négatif, rapport de l'écart-type à la moyenne

NOTE 1 Ce rapport peut être exprimé en pourcentage.

NOTE 2 Le terme «écart-type relatif» est parfois utilisé à la place de «coefficient de variation», mais cet usage n'est pas recommandé.

[ISO 3534-1:1993, 2.35]

NOTE 3 Dans le présent Rapport technique, le terme coefficient de variation (CV) est utilisé lorsque l'écart-type relatif est exprimé en pourcentage (CV % = 100 RSD).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2cbbf67b-df16-4c59-ab43-136c9a78a94e/iso-tr-13843-2000>

2.8

étude collaborative

essai des performances de la méthode ou du laboratoire pour lequel plusieurs laboratoires se regroupent pour réaliser une expérience planifiée et coordonnée par un laboratoire leader

NOTE Il existe principalement deux types d'études collaboratives: les exercices d'intercalibration sont effectués pour permettre aux laboratoires de comparer leurs résultats analytiques à ceux des autres laboratoires participants; les essais de performance de la méthode fournissent des estimations de fidélité (répétabilité, reproductibilité) d'après des données recueillies lorsque plusieurs laboratoires participants étudient des échantillons identiques à l'aide d'une méthode strictement normalisée.

2.9

comptage de colonies confirmé [vérifié]

x

comptage de colonies présumé, corrigé des faux positifs

$$x = pc = \frac{k}{n} c$$

où

c est le comptage présumé;

p est le taux de vrais positifs;

n est le nombre de positifs présumés isolés pour confirmation;

k est le nombre confirmé.

2.10**carte de contrôle**

graphique de dispersion à deux dimensions pour le contrôle des performances de la méthode avec des valeurs de contrôle obtenues à l'aide d'une étude de type A

NOTE Dans les cartes de contrôle, l'axe horizontal représente en général l'échelle de temps ou l'échelle ordinaire et la variable de contrôle représente la moyenne, ou une certaine mesure de fidélité (s , CV, RSD).

2.11**détecteur****détecteur de particules**

boîte de matrice solide ou tube de liquide contenant un milieu nutritif pour le dénombrement ou la détection de particules microbiennes vivantes

2.12**série de détection****série de détecteurs**

combinaison de boîtes ou de tubes sur laquelle est basée l'estimation quantitative de la concentration microbienne de l'échantillon

NOTE La série de détection est la série de boîtes ou de tubes utilisée dans le cadre de l'estimation numérique d'une seule valeur.

EXEMPLES Boîtes parallèles d'une suspension, boîtes de dilutions consécutives, système NPP 3 × 5 tubes, microplaque.

2.13**germe**

entité vivante capable de produire une croissance dans un milieu nutritif

cf. **propagule** (2.27)

2.14**carte guide**

graphique de dispersion à deux dimensions présentant les données relatives aux performances de la méthode (quantité ou fidélité) à l'aide de valeurs guides arbitraires ou de valeurs guides obtenues par un raisonnement de type B

NOTE Dans les cartes guide, l'axe horizontal représente en général le comptage de colonies par détecteur.

2.15**distribution de Poisson hétérogène**

distribution qui se présente lorsque la moyenne de la distribution de Poisson varie aléatoirement d'un cas à l'autre

NOTE 1 Voir référence [11].

NOTE 2 Voir également **distribution binomiale négative** (2.19).

2.16**limite de détection**

nombre x de particules (par prise analytique) lorsque la probabilité, p_0 , d'un résultat négatif est égale à 5 %

NOTE 1 La probabilité d'un résultat positif est $p(+)=1-p_0$.

NOTE 2 a) Calcul de x par la distribution de Poisson:

$$x = \ln\left(\frac{1}{p_0}\right) = \ln\left(\frac{1}{0,05}\right) = \ln(20) = 3,00$$

b) Calcul de x par la distribution binomiale négative:

$$x = \frac{\left(p_0^{-u^2} - 1\right)}{u^2} = \frac{0,05^{-u^2} - 1}{u^2} = \frac{20^{u^2} - 1}{u^2}$$

2.17

limite de détermination

concentration de particules moyenne la plus faible, x , par prise analytique lorsque l'incertitude type relative prévue est égale à une valeur spécifiée (RSD)

NOTE a) Calcul de x par la distribution de Poisson:

$$x = \frac{1}{(\text{RSD})^2}$$

b) Calcul de x par la distribution binomiale négative:

$$x = \frac{1}{(\text{RSD})^2 - u^2}$$

où u est le facteur de surdispersion.

2.18

linéarité

dépendance linéaire du signal en fonction de la concentration de l'analyte

cf. **proportionnalité** (2.28)

2.19

distribution binomiale négative

distribution statistique particulière «surdispersée» des comptages

NOTE 1 Sa variance peut être exprimée comme étant

$$\sigma^2 = \mu + u^2 \mu^2$$

où μ est la moyenne.

NOTE 2 Dans le présent Rapport technique, le carré du facteur de surdispersion (u) est substitué par l'inverse de l'exposant ($1/k$) de la formule normalisée de la distribution binomiale négative.

2.20

surdispersion

variation excédentaire du caractère aléatoire de Poisson

NOTE Elle est détectée qualitativement par l'indice de dispersion de Poisson et mesurée quantitativement lors de l'estimation du paramètre u (facteur de surdispersion) de la distribution binomiale négative.

2.21

facteur de surdispersion

u

incertitude aléatoire supplémentaire de la détermination excédentaire de la distribution de Poisson, mesurée en termes d'écart-type relatif

2.22

erreur de chevauchement

erreur de saturation

dépression systématique des comptages de colonies due à la confluence de colonies

NOTE Quantitativement, l'erreur de chevauchement dépend essentiellement de la fraction de l'espace de croissance disponible occupé par une croissance de colonies.

2.23

comptages parallèles

nombre de particules ou de colonies dans des prises analytiques égales provenant de la même suspension

2.24**distribution de Poisson**

distribution entièrement aléatoire des nombres de particules lors de l'échantillonnage d'une suspension parfaitement homogénéisée

NOTE La probabilité $P(k)$ d'observer exactement k unités dans une prise d'essai, lorsque la moyenne est égale à μ , se calcule à l'aide de la formule suivante:

$$P(k) = \frac{\mu^k}{k!} e^{-\mu}$$

2.25**fidélité**

étroitesse de l'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus dans des conditions stipulées

NOTE La fidélité n'a pas de rapport avec la valeur vraie ou la valeur spécifiée. Elle est généralement exprimée en termes d'imprécision et calculée comme un écart-type des résultats d'essai.

2.26**validation primaire****validation totale**

détermination des spécifications de performance d'une nouvelle méthode et/ou vérification expérimentale qu'une méthode répond bien aux critères de qualité dérivés théoriquement

2.27**propagule**

entité viable, cellule végétative, groupe de cellules, spores, groupe de spores ou morceau de mycélium fongique capable de croître dans un milieu nutritif

cf. **germe** (2.13)

2.28**proportionnalité**

correspondance des comptages de particules effectués avec un volume (ou une dilution) d'une série de prises analytiques à partir d'une suspension à racine commune

NOTE La proportionnalité est calculée pour une évaluation statistique comme le coefficient de vraisemblance-log statistique G^2 avec $n-1$ degrés de liberté.

2.29**méthode qualitative**

méthode d'analyse dont la réponse est soit la présence, soit l'absence de l'analyte dans une certaine quantité d'échantillon

NOTE 1 Voir référence [10].

2.30**rendement**

terme général désignant le nombre de particules estimé dans une prise d'essai ou dans un échantillon, sachant qu'il y a un nombre réel (même s'il est inconnu) de particules dont 100 % ou moins est «récupéré» par le détecteur

2.31**exactitude relative**

degré de correspondance entre la réponse obtenue par la méthode de référence et la réponse obtenue par l'autre méthode sur des échantillons identiques

NOTE 1 Voir référence [10].

2.32
différence relative

d
différence entre deux mesures, divisée par leur moyenne

$$d = \frac{x_A - x_B}{\bar{x}} = \frac{2(x_A - x_B)}{x_A + x_B}$$

$$d \% = 100 d$$

NOTE Pour des raisons pratiques, les mêmes valeurs résultent du calcul $d = \ln(x_A) - \ln(x_B)$.

2.33
rendement relatif

rapport (A/B) des comptages de colonies obtenus par deux méthodes soumises à l'essai sur des prises d'essai équivalentes d'une même suspension, où B = la référence (si possible)

2.34
écart-type relatif
RSD

estimation de l'écart-type d'une population d'un échantillon de n résultats divisé par la moyenne de cet échantillon

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$$

cf. **coefficient de variation** (2.7)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

2.35
répétabilité

étroitesse de l'accord entre les résultats des mesurages successifs de la même quantité, effectués dans les mêmes conditions de mesurage

ISO/TR 13843:2000
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sis/2c06107b-d1f0-4c59-ab45-136c9a78a94e/iso-tr-13843-2000>

NOTE 1 Voir le *Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure* [6].

NOTE 2 La répétabilité est calculée comme étant $r = 2,8s_r$, où s_r est l'écart-type de répétabilité.

2.36
reproductibilité

étroitesse de l'accord entre les résultats des mesurages de la même quantité, effectués dans des conditions de mesurage variables

NOTE 1 Voir le *Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure* [6].

NOTE 2 La reproductibilité est calculée comme étant $R = 2,8s_R$, où s_R est l'écart-type de reproductibilité, généralement composé par l'écart-type interlaboratoires s_L et l'écart-type de répétabilité, s_r , à savoir:

$$s_R = \sqrt{s_L^2 + s_r^2}$$

2.37
robustesse

insensibilité d'une méthode d'analyse aux faibles modifications de la méthode

NOTE 1 Voir référence [23].

NOTE 2 Pour étudier la robustesse, il est recommandé «d'abuser» de la méthode de manière contrôlée.

2.38**validation secondaire**

démonstration par expérience qu'une méthode établie fonctionne bien selon ses spécifications dans les mains de l'utilisateur

2.39**sélectivité apparente**

F

rapport entre le nombre de colonies cibles et le nombre total de colonies dans le même volume d'échantillon

$$F = \lg(t/n)$$

où

t est la concentration apparente de cibles types présumées, estimées lors du comptage de colonies;

n est la concentration du nombre total de colonies.

2.40**sensibilité**

fraction du nombre total de cultures ou de colonies positives correctement attribuées lors de l'analyse de présomption

2.41**spécificité**

fraction du nombre total de cultures ou de colonies négatives correctement attribuées lors de l'analyse de présomption

2.42**incertitude-type**

incertitude du résultat d'une mesure exprimée sous forme d'un écart-type

NOTE Voir référence [5].

2.43**évaluation de type A**

(de l'incertitude) méthode d'évaluation de l'incertitude par l'analyse statistique d'une série d'observations

EXEMPLE De telles observations peuvent être, par exemple, l'écart-type, l'écart-type relatif.

NOTE 1 Voir références [5] et [6].

NOTE 2 La répétabilité et la reproductibilité sont souvent estimées à l'aide d'essais collaboratifs des performances de la méthode au cours desquels plusieurs laboratoires étudient des échantillons « identiques » fournis par un organisateur central [15].

2.44**évaluation de type B**

(de l'incertitude) méthode d'évaluation de l'incertitude par d'autres moyens que l'analyse statistique d'une série d'observations, par exemple à partir de distributions de probabilité supposées, basées sur l'expérience ou sur d'autres informations

NOTE Voir références [5] et [6].

2.45**incertitude**

(de mesure) paramètre associé au résultat de mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourrait être raisonnablement attribuée à la quantité mesurée

NOTE Voir référence [6].

2.46
incertitude

(de comptage) écart-type relatif des résultats des comptages répétés des colonies ou des particules d'une ou des mêmes boîtes ou d'un ou des mêmes champs dans des conditions stipulées

EXEMPLE De telles conditions peuvent être, par exemple, la même personne ou des personnes différentes dans un même laboratoire ou dans différents laboratoires.

2.47
gamme de validation

gamme du nombre moyen de particules par prise analytique pour laquelle la conformité aux spécifications de validation (en particulier la linéarité) a été démontrée de manière acceptable

NOTE La gamme de validation est habituellement exprimée comme la gamme de comptages «fiables» des colonies.

3 Organisation du document

La première partie (articles 4 à 8) du présent Rapport technique contient des informations relatives aux principes fondamentaux, aux caractéristiques et aux limites des méthodes microbiologiques, ainsi qu'aux aspects généraux de la validation. La seconde partie (articles 9 à 11) représente le document de validation en lui-même avec les spécifications et les modes opératoires recommandés pour leur détermination.

Les concepts et les principes, anciens et nouveaux, ne sont pas définis en intégralité dans le corps du présent Rapport technique. Trois annexes sont jointes. L'annexe A donne le détail des formules statistiques les plus utilisées dans le document, l'annexe B fournit des exemples numériques et l'annexe C donne les plans détaillés de deux essais de validation.

Les essais statistiques, au sens commun du terme, ne sont pas une composante essentielle. Les calculs mathématiques servent principalement à présenter des résumés pratiques de données et les distributions statistiques donnent des valeurs guides. Un tableau de la distribution du χ^2 est l'aide la plus fréquemment consultée.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2cbbf67b-df16-4c59-ab43-136c9a78a94e/iso-tr-13843-2000>

Les deux programmes en BASIC donnés à l'annexe A peuvent être copiés facilement sur des ordinateurs de bureau ou des calculatrices de poche programmables pour aider aux calculs de base les plus fréquemment utilisés.

4 Concepts de base

4.1 Généralités

Pour ce qui est des calculs statistiques des particules, les comptages microscopiques obéissent aux mêmes lois que les comptages viables mais, à l'exception des méthodes de comptage des microcolonies, ils ne présentent pas de problèmes liés à la croissance. Les colorants de différenciation, en particulier les complexes spécialement conçus à cet effet, ou autres agents utilisés pour identifier l'organisme cible ne modifient pas les principes métrologiques. Les mêmes principes de validation que pour les méthodes sélectives de comptage des colonies peuvent être appliqués.

Dans la plupart des cas, les comptages de plages de bactériophages sont similaires aux comptages de colonies bactériennes.

4.2 Validation

4.2.1 Généralités

La validation est un processus qui permet de démontrer qu'une méthode remplit la fonction à laquelle elle est destinée: détecter ou quantifier un microbe ou un groupe microbien donné avec la fidélité et l'exactitude requises.

Les méthodes de comptage total n'ont pas de groupe cible définissable et elles ne peuvent être validées qu'en relation avec d'autres méthodes ou par rapport à des probabilités théoriques de fidélité.

Selon son objet, la validation est classée primaire ou secondaire.

4.2.2 Validation primaire

La validation primaire est un processus exploratoire dont l'objectif est de déterminer les limites opérationnelles et les caractéristiques de performance d'une méthode nouvelle, modifiée ou insuffisamment détaillée. Il convient que cette validation se traduise par des spécifications numériques et descriptives des performances et comprenne une description détaillée et univoque de la cible concernée (colonie, plage ou tube positifs).

La validation primaire s'effectue en général au moyen de plans d'essais spécialement conçus à cet effet.

Il convient qu'un laboratoire développant sa propre méthode ou une variante d'une norme existante suive les étapes de la validation primaire.

Il est impératif que les techniciens qui doivent procéder à une validation primaire aient une grande expérience des autres méthodes microbiologiques.

4.2.3 Validation secondaire

La validation secondaire (également appelée vérification) a lieu lorsqu'un laboratoire met en œuvre une méthode développée ailleurs. La validation secondaire a pour principal objectif de réunir les informations permettant de démontrer que le laboratoire est en mesure de répondre aux spécifications déterminées lors de la validation primaire. Actuellement, il n'existe pas de spécifications pour la plupart des méthodes. Il peut être nécessaire d'utiliser les résultats de l'assurance de qualité externe (voir en 4.2.8) comme première étape vers une validation secondaire complète.

En règle générale, la validation secondaire utilise les mêmes modes opératoires que la validation primaire mais sous des formes sélectionnées et simplifiées, parfois réparties sur une période prolongée. Les échantillons naturels sont les matériaux d'essai idéaux et la charge de travail ne concerne que le mode opératoire s'inscrivant dans les limites opérationnelles définies par la validation primaire.

4.2.4 Contrôle de qualité analytique (AQC)

L'application de méthodes validées, dans leurs limites spécifiées et fiables, ne garantit pas forcément la validité des résultats. Il est nécessaire de procéder à un contrôle de qualité analytique (AQC) en relation avec les analyses de routine quotidiennes. Ce contrôle permet de vérifier si une méthode peut être utilisée avec succès.

L'AQC est un processus continu. Des cartes guides, dont les limites sont tirées des spécifications de méthodes (de la validation primaire) ou de considérations théoriques, représentent les outils principaux.

Les méthodes d'AQC constituent des compléments du processus analytique de routine, par exemple des répétitions à différents niveaux ou tout simplement des calculs qui ne sont pas effectués couramment sur les données de routine. En outre, des matériaux de référence, des intercalibrations et des échantillons dopés sont utilisés.

Le contrôle de qualité analytique doit être effectué en combinaison avec les validations primaire et secondaire. Il convient de n'utiliser que des résultats fiables au sens de l'AQC pour définir les critères de validation et les caractéristiques de performance.

Des groupes de travail nationaux et internationaux ont élaboré de nombreux documents sur le contrôle de qualité analytique des méthodes microbiologiques (par exemple les références [1, 2, 3, 4, 7, 8, 20, 21, 24, 26]). Les recueils de normes contiennent également des parties à ce sujet. Bien qu'essentielles pour la validation, les méthodes de contrôle de qualité analytique ne sont pas détaillées dans le présent Rapport technique. Dans les spécifications qui suivent, il est supposé que les laboratoires ont mis en œuvre les systèmes de contrôle analytique et d'assurance de la qualité externe et interne.

4.2.5 Méthodes équivalentes

Il est nécessaire d'appliquer deux méthodes en parallèle sur les mêmes échantillons lors du développement d'une méthode interne, et également lors de la collecte d'informations pour justifier l'utilisation d'une méthode alternative.

Les performances de la méthode ont de multiples facettes. Il n'existe ni essai unique pour l'équivalence des méthodes, ni critère numérique correspondant. Une méthode peut s'avérer supérieure sur le plan de la spécificité mais inférieure sur celui du rendement. Toutes les informations sur la robustesse, la fidélité et la spécificité recueillies durant les essais de validation peuvent être utilisées pour la comparaison des méthodes (exemples B.2, B.3, B.4 à l'annexe B). Il est nécessaire d'examiner les méthodes en parallèle uniquement pour les comparaisons de rendement.

La méthode qui donne le plus fort rendement d'organismes cibles confirmés est manifestement la meilleure, sauf si une confirmation est toujours nécessaire pour une utilisation en routine. Il se peut qu'une méthode qui donne un rendement quelque peu inférieur mais ne nécessitant pas de confirmation soit préférable. Si des taux élevés de faux négatifs ou de faux positifs observés pendant la validation primaire ne peuvent être corrigés par des définitions de colonies cibles plus affinées, il convient de considérer la méthode comme non valable.

4.2.6 Matériaux d'essai

Il est généralement admis que la validation doit simuler autant que possible les conditions de routine. Il convient que les échantillons naturels présentant des concentrations naturelles de microbes constituent les matériaux d'essai principaux. Il y a des exceptions dans certaines circonstances.

Les matériaux artificiels (matériaux de référence certifiés et échantillons dopés) sont utilisés dans les systèmes d'assurance de la qualité interne et externe afin de garantir un niveau d'aptitude minimal des laboratoires participant aux essais de validation de méthodes.

Le dopage peut être utile voire nécessaire pour la validation secondaire lorsqu'il est difficile de trouver des échantillons naturels contenant les organismes cibles. Le personnel de laboratoire sera en mesure de se familiariser avec l'organisme cible.

Il convient de limiter l'utilisation des échantillons négatifs (blancs) aux seules opérations pour l'assurance de la qualité interne. Le fait de les associer aux autres échantillons utilisés pour étudier l'équivalence entre plusieurs méthodes peut donner la fausse impression d'une bonne corrélation entre les méthodes. S'il était possible de savoir à l'avance quels échantillons naturels ne contiennent aucun organisme cible, cela permettrait d'effectuer une sélection appropriée pour soumettre à essai les faux positifs dans des exercices de validation réels.

La gamme de concentration optimale pour la validation des méthodes microbiologiques est plus restreinte que la gamme d'application prévue. Il n'est pas nécessaire d'utiliser de fortes concentrations. Ces échantillons sont comparables à des cultures pures et ne permettent pas de vérifier les performances de la méthode ou du laboratoire soumis à essai.

Il est nécessaire d'étudier les échantillons à faible teneur bactérienne pour des raisons de santé publique mais, pour des raisons statistiques, ces échantillons ne sont pas adaptés à la comparaison de méthodes ni aux autres exercices de validation. Le problème ne se pose d'ailleurs pas quand on sait que, lorsqu'elle est faible, la concentration n'est plus un facteur déterminant. Dans un même échantillon, chaque type de germe réagit avec le milieu nutritif, sans interaction, ou presque, avec les autres particules. Pour comparer le rendement de deux méthodes, il est préférable de les appliquer sur des boîtes contenant des colonies de 20 ou 30 particules au moins.

On considère que les méthodes qui s'avèrent valides avec des concentrations suffisantes pour la validation sont également fiables lorsque les concentrations en analyte sont faibles.

4.2.7 Échantillons — Représentativité et quantité suffisante

Une théorie statistique apporte des solutions au calcul du nombre d'échantillons requis pour différentes situations d'essai ou d'estimation (voir références [3] et [13]). Afin de pouvoir mettre la théorie en pratique, il convient d'évaluer l'importance des effets qui ont réellement une influence et les chances de les détecter. Il convient de

disposer d'une estimation de l'incertitude (fidélité) de la détermination et de procéder à un échantillonnage aléatoire.

Il est difficile de répondre à l'intégralité ou à la plupart des exigences mentionnées ci-dessus lors de la planification et de la réalisation anticipées d'essais de performances des méthodes microbiologiques. Les techniques statistiques, le cas échéant, deviennent des lignes directrices.

Pour être convaincants, le nombre et la variété des échantillons examinés doivent être suffisants. Sans l'aide des statistiques, il n'existe aucune manière précise de décider. Dans certains cas, le premier échantillon étudié peut indiquer que la méthode n'est pas assez bonne. Mais un seul échantillon ne suffit généralement pas. Parfois, un millier d'échantillons peut être nécessaire pour «démontrer» que deux méthodes P/A ne sont pas équivalentes. Le fait de sélectionner une quantité insuffisante d'exemples peut être une perte de temps.

4.2.8 Assurance qualité externe et autres études collaboratives

Les études réalisées sur un produit «homogène» et auxquelles participent plusieurs laboratoires sont considérées comme essentielles pour les performances de la méthode mais aussi pour celles des laboratoires. (Une fois les points aberrants identifiés et supprimés, il est considéré que les données restantes apportent les informations nécessaires sur les performances et l'efficacité de la méthode.)

Les études collaboratives constituent maintenant un outil très utilisé pour les essais des caractéristiques de fidélité des méthodes chimiques [34]. Il semble un peu trop tôt pour recommander la mise en place de ce type d'essais en microbiologie. Il est admis en effet que tous les laboratoires participants ont plusieurs années d'expérience en ce qui concerne les méthodes expérimentées et des compétences reconnues dans leur utilisation. Actuellement, l'expérience démontre que les études collaboratives portant sur les essais de performance des méthodes tendent à devenir des essais d'aptitude de laboratoire et des exercices de formation.

Certaines méthodes microbiologiques sont utilisées depuis des dizaines d'années (par exemple gélose Endo pour coliformes totaux, m-FC pour coliformes thermotolérants, gélose m-*Enterococcus* pour entérocoques intestinaux) par des centaines de laboratoires. Ces méthodes peuvent donc théoriquement être utilisées dans le cadre d'études collaboratives sur les performances des méthodes.

Lors de la réalisation d'essais d'aptitude collaboratifs pour des organismes cibles spécifiques avec un milieu de culture sélectif, il convient que les échantillons soient presque obligatoirement dopés à l'aide de cultures pures ou de mélanges d'organismes. Une autre solution consiste à utiliser des matériaux de référence certifiés. Il s'agit d'une situation simplifiée et artificielle. Il peut donc manquer les plus grosses difficultés rencontrées par les différents laboratoires en ce qui concerne l'utilisation de routine des méthodes sur des échantillons naturels. Tant que les caractéristiques de performance d'une méthode microbiologique n'ont pas été exprimées quantitativement, il se peut que ces types de programmes d'assurance de la qualité externe soient malgré tout le moyen le plus satisfaisant concernant une validation secondaire (vérification) d'une méthode.

4.3 Détecteurs

4.3.1 Généralités

Il est souvent pratique d'appeler détecteur (2.11) le milieu nutritif dans son récipient. Deux types de détecteurs, à savoir les détecteurs solides et les détecteurs liquides, sont utilisés dans différentes variantes des méthodes microbiologiques. De plus, ils sont le plus souvent associés à différents principes de dénombrement et de détection: liquide avec la méthode P/A et NPP et solide avec les comptages de colonies.

En microbiologie, l'objet principal de toutes les formes de validation est la détermination des performances des détecteurs.

La série de tubes (NPP) ou de boîtes (dénombrables) utilisées pour l'analyse est appelée série de détection ou série de détecteurs (2.12). Chaque tube NPP est un détecteur P/A.

EXEMPLE Le puits individuel d'une microplaque est un détecteur P/A. Lorsqu'elle est utilisée en tant que système NPP, la boîte prise dans son ensemble constitue la série de détection.