
**Qualité de l'eau — Détection et
dénombrement des bactériophages —
Partie 3:
Validation des méthodes de
concentration des bactériophages dans
l'eau**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages —

*Part 3: Validation of methods for concentration of bacteriophages from
water*

[ISO 10705-3:2003](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6ba99564-5127-4c26-92af-f35b2cbc2be4/iso-10705-3-2003>



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 10705-3:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6ba99564-5127-4c26-92af-f35b2cbc2be4/iso-10705-3-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6ba99564-5127-4c26-92af-f35b2cbc2be4/iso-10705-3-2003>

© ISO 2003

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 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage et verrerie	3
7 Échantillonnage	3
8 Préparation des échantillons d'eaux usées pour le dopage	3
9 Mode opératoire	4
10 Calculs	6
11 Contrôle de qualité analytique	7
12 Rapport d'essai	7
Annexe A (informative) Méthodes recommandées de concentration des bactériophages dans l'eau selon le volume, la turbidité et la teneur en particules	8
Annexe B (informative) Exemple de processus de validation d'une méthode de concentration	10
Bibliographie	13

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités 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 2.

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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document 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 10705-3 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Études microbiologiques*.

L'ISO 10705 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Détection et dénombrement des bactériophages*:

- *Partie 1: Dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques*
- *Partie 2: Dénombrement des coliphages somatiques*
- *Partie 3: Validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau*
- *Partie 4: Dénombrement des bactériophages infectant Bacteroides fragilis*

Qualité de l'eau — Détection et dénombrement des bactériophages —

Partie 3:

Validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau

AVERTISSEMENT — Les utilisateurs de la présente partie de l'ISO 10705 doivent être familiarisés avec les pratiques d'usage en laboratoire. La présente partie de l'ISO 10705 n'a pas la prétention d'aborder tous les problèmes de sécurité concernés par son usage. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de consulter et d'établir des règles de sécurité et d'hygiène appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires avant utilisation.

IMPORTANT — Il est impératif que le personnel impliqué dans la validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau possèdent l'expérience nécessaire pour mettre en œuvre les méthodes de dénombrement des bactériophages (voir l'ISO/TR 13843^[1]).

iTeh STANDARD PREVIEW

1 Domaine d'application (standards.iteh.ai)

La présente partie de l'ISO 10705 spécifie les principes généraux qui permettent d'évaluer les performances des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau. La concentration est recommandée pour les échantillons d'eau supposés contenir moins de 3 pfp (particules formant plaque) par millilitre. Les méthodes de concentration peuvent être appliquées à tous les types d'eau, sous réserve que la quantité et la nature des matières en suspension et/ou des matières dissoutes n'interfèrent pas avec le mode opératoire de concentration.

La présente partie de l'ISO 10705 ne donne pas de détails spécifiques quant aux méthodes de concentration, mais esquisse les principes fondamentaux pour l'évaluation de l'adéquation d'une méthode particulière pour un type et un volume d'eau donnés. L'Annexe A donne des exemples de méthodes qui ont été jugées satisfaisantes ainsi que leur domaine d'application.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

ISO 6887-1, *Microbiologie — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*

ISO 8199, *Qualité de l'eau — Guide général pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture*

ISO 10705-1, *Qualité de l'eau — Détection et dénombrement des bactériophages — Partie 1: Dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques*

ISO 10705-2, *Qualité de l'eau — Détection et dénombrement des bactériophages — Partie 2: Dénombrement des coliphages somatiques*

ISO 10705-4, *Qualité de l'eau — Détection et dénombrement des bactériophages — Partie 4: Dénombrement des bactériophages infectant Bacteroides fragilis*

ISO/CEI Guide 2, *Normalisation et activités connexes — Vocabulaire général*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO/CEI Guide 2 ainsi que le terme et la définition suivants s'appliquent.

3.1

bactériophages

virus bactériens capables d'infecter des souches hôtes sélectionnées

NOTE Les bactériophages produisent des plages visibles (zones de lyse) dans un tapis confluent de la souche hôte cultivée dans des conditions appropriées.

4 Principe

L'échantillon est traité selon une méthode choisie qui permet de concentrer les bactériophages d'un volume d'échantillon relativement important (de 100 ml à plusieurs litres) à un volume plus petit (de quelques ml à 20 ml). L'échantillon concentré est ensuite analysé pour rechercher des bactériophages selon une méthode internationale normalisée ou tout autre protocole approprié.

Il convient de décrire avec précision dans un protocole la méthode de concentration à évaluer, en respectant autant que possible une présentation conforme aux normes ISO. Il convient que la description comprenne le ou les groupes cibles de bactériophages et leur(s) méthode(s) de détection, les types d'eau et la gamme des volumes à analyser ainsi que les exceptions au domaine d'application, par exemple la turbidité.

La méthode est validée selon les principes énoncés dans la présente partie de l'ISO 10705. La procédure de validation consiste à déterminer le taux de récupération des bactériophages à partir d'une série d'échantillonsensemencés avec de l'eau naturellement polluée (eaux usées brutes ou traitées). Le taux de récupération est testé dans une gamme de volumes, et une attention particulière est portée à sa reproductibilité.

5 Réactifs

Pour la préparation des milieux de culture, utiliser des ingrédients de qualité constante et des produits chimiques de qualité analytique. En ce qui concerne la conservation, se reporter à l'ISO 8199, sauf si précisé dans la présente partie de l'ISO 10705. Comme variante, des milieux complets déshydratés peuvent être utilisés. Dans ce cas, suivre scrupuleusement les instructions du fabricant.

Il est possible d'utiliser des produits chimiques d'une autre qualité à la condition qu'il soit reconnu qu'ils donnent les mêmes résultats.

5.1 Eau, pour la préparation des milieux de culture, utiliser de l'eau distillée sous verre ou de l'eau déionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des bactéries dans les conditions de l'essai, et conforme au moins à la qualité 3 comme spécifiée par l'ISO 3696.

5.2 Diluant, pour réaliser les dilutions, utiliser une solution peptonée saline ou tout autre diluant adéquat conforme à l'ISO 6887-1 ou à l'ISO 8199.

5.3 Milieux de culture et cultures de référence, tels que spécifiés dans la méthode normalisée correspondant à l'analyse des phages (ISO 10705-1, ISO 10705-2 et ISO 10705-4).

5.4 Glycérol ($\rho = 870 \text{ g/l}$), stérilisé à l'autoclave à $(121 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 15 min et conservé à l'abri de la lumière à température ambiante pendant un an au maximum.

6 Appareillage et verrerie

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ — Il convient de désinfecter les appareillages de terrain avant utilisation. Prendre les précautions de sécurité appropriées à la solution désinfectante utilisée. Certaines étapes du processus de concentration peuvent nécessiter l'application d'une pression hydrostatique ou pneumatique. Observer les précautions de sécurité appropriées.

Utiliser le matériel courant de laboratoire pour analyse microbiologique comme spécifié dans la méthode d'analyse des phages (Article 8) et dans le protocole de la méthode de concentration.

7 Échantillonnage

Des échantillons allant jusqu'à 10 l sont facilement transportables au laboratoire. Prélever les échantillons et les transmettre au laboratoire comme spécifié dans l'ISO 8199 (voir également l'ISO 19458^[2]). Pour des échantillons de plus grand volume, il est souhaitable d'effectuer la première étape de la procédure de concentration sur place. Ce processus peut durer plusieurs heures. Si parallèlement, une recherche d'indicateurs bactériens ou d'autres microorganismes est effectuée, prélever un échantillon proportionnel pour ces analyses, de préférence en remplissant un flacon d'échantillon par un écoulement latéral provenant de l'appareillage de concentration. Les filtres, précipités ou autres produits de la première étape de concentration peuvent par la suite être traités sur place, ou peuvent être transportés au laboratoire. Inclure les conditions de transport et de conservation des étapes intermédiaires du processus dans la procédure de validation.

[ISO 10705-3:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6ba99564-5127-4c26-92af-10705-3-2003)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6ba99564-5127-4c26-92af-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6ba99564-5127-4c26-92af-10705-3-2003)

8 Préparation des échantillons d'eaux usées pour le dopage

Se procurer un échantillon d'eaux usées primaires ou secondaires (traitées biologiquement) et le centrifuger à 1 000 g pendant 20 min ou le filtrer à travers une membrane filtrante de 8 μm à 12 μm . Conserver le surnageant ou le filtrat dans de la glace fondante. Dénombrer les bactériophages cibles dans des volumes de 1 ml selon la méthode choisie. Si nécessaire, diluer l'échantillon pour obtenir une concentration de 60 à 200 pfp (particules formant plages) par millilitre. Ajouter du glycérol pour obtenir une fraction volumique finale de 5 %; bien mélanger. Répartir en parties aliquotes de 10 ml dans des flacons en verre ou en plastique (ou bien des tubes, ou des fioles) et les congeler à $(-20 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ ou $(-70 \pm 10) \text{ }^\circ\text{C}$. Décongeler deux flacons à température ambiante. Pour chaque bouteille examiner deux parties aliquotes de 0,5 ml en vue de rechercher les bactériophages cibles. Il convient que le nombre moyen de bactériophages se situe dans les limites spécifiées ci-dessus (c'est-à-dire de 30 à 100 pfp). Analyser les comptages pour déterminer l'homogénéité intraflacons et interflacons comme suit:

$$T_1 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \left[\left(z_{ij} - \frac{z_{i+}}{J} \right)^2 / \left(\frac{z_{i+}}{J} \right) \right]$$

où

T_1 est le test statistique de dispersion de Cochran utilisé pour déterminer la variation en pfp pour une fiole de matériau de référence;

z_{i+} est le nombre total de plages des répliqués d'une fiole: $z_{i+} = \sum_{j=1}^J z_{ij}$

I est le nombre de fioles (dans ce cas, 2);

J est le nombre de réplicats (dans ce cas, 2);

les degrés de liberté pour T_1 sont égaux à $I(J-1)$;

et

$$T_2 = \sum_{j=1}^J \left[\left(z_{i+} - \frac{z_{++}}{I} \right)^2 / \left(\frac{z_{++}}{I} \right) \right]$$

où

T_2 est le test statistique de dispersion de Cochran utilisé pour déterminer la variation en pfp pour différentes fioles d'un même lot de matériau de référence;

Z_{++} est le nombre total de plages de toutes les fioles et réplicats: $z_{++} = \sum_{i=1}^I \left(\sum z_{ij} \right)$;

les degrés de liberté pour T_2 sont égaux à $I-1$.

Si les phages sont répartis au hasard dans et entre les fioles, T_1 et T_2 suivent approximativement une distribution de χ^2 avec des degrés de liberté respectifs de 2 et 1. Les échantillons sont acceptables si $0,01 < T_1 < 5,99$ et $T_2 < 3,84$.

(standards.iteh.ai)

NOTE Les coliphages somatiques, les bactériophages ARN F spécifiques et les bactériophages infectant *Bacteroides fragilis* naturellement présents dans les eaux usées brutes partiellement purifiées, comme indiqué ci-dessus, ne présentent pas d'inactivation significative lorsqu'ils sont congelés avec du glycérol à 5 % et ils peuvent être conservés congelés à des températures inférieures à $(-20 \pm 5)^\circ\text{C}$, et de préférence à $(-70 \pm 10)^\circ\text{C}$, sans baisse significative de leur nombre pendant au moins un an.

9 Mode opératoire

9.1 Préparation des échantillons dopés

9.1.1 Méthodes des lots

Se procurer des échantillons de tous les types d'eau mentionnés dans le domaine d'application de la procédure de concentration. Prélever les échantillons en des jours différents, de préférence représentatifs de saisons et de conditions climatiques différentes. Pour chaque type d'eau prélevée, au minimum cinq échantillons doivent être étudiés. Soit V_{\max} , le volume d'échantillon maximal à traiter par la méthode de concentration soumise à l'évaluation. On doit disposer d'un volume d'échantillon au moins égal à $3 \times V_{\max}$ pour la procédure de validation. Préparer des récipients avec les volumes d'échantillon suivants:

- $0,125 \times V_{\max}$;
- $0,250 \times V_{\max}$;
- $0,500 \times V_{\max}$;
- V_{\max} .

Ajouter à chaque récipient 1 ml de matériau de dopage (voir l'Article 8) préchauffé à température ambiante. Conserver le reste du matériau de dopage dans de la glace fondante.

9.1.2 Méthodes de concentration en continu

Effectuer des études sur le terrain pour tous les types d'eau mentionnés dans le domaine d'application de la procédure de concentration. Effectuer ces études en des jours différents, de préférence représentatifs de saisons et de conditions climatiques différentes. Pour chaque type d'eau, étudier au minimum cinq échantillons. Soit V_{\max} , le volume d'échantillon maximal analysable par la méthode de concentration. Effectuer des études sur le terrain avec les volumes d'échantillon suivants:

- $0,125 \times V_{\max}$;
- $0,250 \times V_{\max}$;
- $0,500 \times V_{\max}$;
- V_{\max} .

Traiter chaque volume comme décrit dans le protocole de la méthode de concentration. Ajouter 1 ml de matériau de dopage (voir l'Article 8) préchauffé à température ambiante à environ 10 ml de diluant (5.2). Faire fonctionner l'appareillage de concentration en conditions stables. Injecter ensuite la totalité du diluant et le matériau de dopage dans le débit entrant de l'appareillage de concentration (par exemple en insérant l'aiguille d'une seringue dans un tuyau flexible) en quatre fractions analogues, chacune après le passage d'environ un cinquième du volume d'eau à traiter.

9.2 Évaluation du taux de récupération

Traiter les échantillons dopés comme cela est décrit dans le protocole de la méthode de concentration étudiée, y compris pour les étapes de transport et de conservation des échantillons, en simulant autant que possible celles des échantillons réels. Analyser le volume total du concentré final par quantités de 1 ml ou moins si le volume final du concentré ne correspond pas à un nombre entier de millilitres. Quand cela est possible, il convient d'analyser les autres bactériophages retenus sur les surfaces de concentration, par exemple les phages retenus sur les filtres.

Parallèlement, analyser deux parties aliquotes de 0,5 ml de matériau de dopage. Les valeurs obtenues doivent être utilisées pour calculer l'efficacité de la concentration, ce qui permettra de connaître le nombre de phages introduits dans les différents volumes à concentrer et de calculer T_1 et T_2 pour chaque flacon par rapport aux autres. Si plus de 20 % (1 sur 5) des échantillons du matériau de dopage ne sont pas conformes aux valeurs acceptables de T_1 et/ou T_2 , éliminer le matériau de dopage. Si une quantité inférieure ou égale à 20 % des échantillons de matériau de dopage est non conforme à T_1 et/ou à T_2 , ne pas prendre en compte les résultats de cette analyse et procéder à une nouvelle analyse.

Des résultats anormaux ou extrêmes sont caractéristiques des mesurages microbiologiques. Il peut parfois être acceptable de rejeter un résultat sur la base d'une simple observation des données. Cependant, il est préférable de réaliser un test statistique approprié. Utiliser le test de Dixon pour rejeter les valeurs extrêmes.

Effectuer au minimum cinq expériences avec des résultats qui n'ont pas été rejetés avant l'analyse des données.

Si la méthode est évaluée avec de l'eau naturelle suspectée de contenir des phages détectables par le même hôte bactérien que les bactériophages de l'essai, compter alors le nombre de phages présents. Analyser une partie aliquote ou concentrer V_{\max} et dénombrer dans le concentré. Si l'échantillon contient un nombre de phages > 20 % du nombre de phages dopés dans l'échantillon, chauffer l'eau et la maintenir à 80 °C pendant 30 min, la laisser refroidir avant de l'utiliser. Si le nombre de bactériophages présents naturellement est < 20 % du nombre de phages ajoutés, les dénombrer et les prendre en compte dans l'analyse des données (Article 10).