
**Qualité de l'eau — Exigences pour
l'établissement des caractéristiques
de performance des méthodes
microbiologiques quantitatives**

*Water quality — Requirements for establishing performance
characteristics of quantitative microbiological methods*

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Concepts de base	7
4.1 Généralités.....	7
4.2 Caractérisation.....	7
4.3 Vérification.....	8
4.4 Comparaison des méthodes.....	9
4.5 Échantillons.....	9
5 Spécifications: quelques valeurs guides	10
6 Plans d'expériences pour la détermination des caractéristiques de performance d'une méthode	11
6.1 Considérations d'ordre général.....	11
6.2 Détermination de la sensibilité, de la spécificité, de l'efficacité, de la sélectivité, du taux de faux positifs et du taux de faux négatifs.....	11
6.2.1 Type d'échantillons à utiliser.....	11
6.2.2 Nombre d'échantillons.....	11
6.2.3 Mode opératoire.....	11
6.2.4 Caractéristiques de performance de catégories.....	12
6.2.5 Exemple pratique.....	13
6.3 Détermination de la limite supérieure et prise en considération de la limite inférieure de détection.....	15
6.3.1 Gamme de travail.....	15
6.3.2 Limite supérieure liée à la linéarité.....	15
6.3.3 Type et nombre d'échantillons à utiliser.....	15
6.3.4 Exemple pratique.....	16
6.3.5 Limite inférieure de détection.....	17
6.4 Estimation de la fidélité: détermination de la répétabilité et de la reproductibilité.....	17
6.4.1 Généralités.....	17
6.4.2 Répétabilité.....	18
6.4.3 Reproductibilité intralaboratoire.....	19
6.5 Robustesse.....	21
6.5.1 Généralités.....	21
6.5.2 Plans d'expériences pour les effets dus à la durée et à la température.....	21
6.6 Rendement relatif.....	22
6.6.1 Généralités.....	22
6.6.2 Détermination du rendement relatif.....	22
6.7 Incertitude de comptage.....	23
6.7.1 Généralités.....	23
6.7.2 Plan d'expériences pour l'évaluation de l'incertitude de comptage des colonies.....	23
6.7.3 Exemple d'incertitude individuelle (ou personnelle) de comptage des colonies.....	23
6.7.4 Exemple d'incertitude intralaboratoire de comptage des colonies.....	24
6.7.5 Exemple d'incertitude de lecture intralaboratoire de NPP.....	25
7 Plans d'expériences pour la vérification d'une méthode par un seul laboratoire	25
7.1 Considérations d'ordre général.....	25
7.2 Calcul de la sensibilité, de la spécificité, de l'efficacité, de la sélectivité, du taux de faux positifs et du taux de faux négatifs.....	26
7.2.1 Type d'échantillon à utiliser.....	26
7.2.2 Nombre d'échantillons.....	26
7.2.3 Procédure de confirmation.....	26

7.2.4	Caractéristiques de performance de catégories	26
7.3	Détermination de la répétabilité	27
7.4	Incertitude de comptage.....	28
7.5	Procédure pour la vérification par un seul laboratoire	28
Annexe A (informative) Modèles mathématiques de variation		31
Annexe B (normative) Évaluation des limites inférieures.....		41
Annexe C (normative) Évaluation de la limite supérieure.....		44
Annexe D (normative) Détermination de la variabilité opérationnelle dans des conditions de répétabilité et de reproductibilité intralaboratoire		45
Annexe E (normative) Incertitude de comptage		49
Annexe F (normative) Détermination de la variabilité opérationnelle (reproductibilité interlaboratoires) dans une étude collaborative de performances.....		51
Annexe G (informative) Glossaire des principaux symboles.....		59
Bibliographie		61

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/foreword.html.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

Cette première édition de l'ISO 13843 annule et remplace l'ISO/TR 13843:2000 qui a fait l'objet d'une révision technique.

Introduction

Les méthodes sont considérées comme étant microbiologiques lorsque l'estimation quantitative repose sur le comptage des particules microbiologiques, soit directement à l'aide d'un microscope, soit indirectement en se basant sur la croissance (multiplication) des colonies, l'apparition d'une turbidité, un changement de couleur ou la fluorescence. Les principes et les modes opératoires entrant dans le domaine d'application du présent document sont généralement le comptage à l'aide d'un microscope, le nombre le plus probable (NPP) et le comptage de colonies. La plupart des modes opératoires pour la détermination des caractéristiques de performance décrits dans le présent document, sont applicables aux trois types de méthodes. Toutefois, lorsque les modes opératoires ne sont pas applicables, des méthodes alternatives sont suggérées dans le corps du présent document ou aux [Annexes D](#) et [E](#) (pour la répétabilité, la reproductibilité et l'incertitude du comptage).

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

Certaines des méthodes microbiologiques « plus récentes », telles que celles utilisant l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) ou l'amplification en chaîne par polymérase (PCR), peuvent être couvertes par le présent document. Cependant, il est possible qu'elles nécessitent une approche spéciale, selon la manière dont elles sont utilisées. Dans ces situations, les questions importantes comprennent le mécanisme de détermination des nombres de microbes présents (par exemple, la courbe d'étalonnage pour la qPCR ou le comptage microscopique pour la méthode FISH) et la viabilité des organismes détectés. Si de telles techniques sont utilisées pour la confirmation dans le cadre d'une méthode utilisée, tous les articles du présent document sont alors pertinents.

Bien que cela ne soit pas essentiel, il peut être intéressant, lors de la caractérisation des méthodes microbiologiques, de produire des données en utilisant des organismes stressés. Diverses méthodes peuvent être utilisées pour stresser des organismes, mais les deux méthodes les plus utiles pour l'eau sont celles qui utilisent les désinfectants pour stresser les organismes (habituellement stress au chlore) et l'épuisement des nutriments causé par les organismes dans un environnement pauvre en nutriments (c'est-à-dire, eau potable et autres eaux oligotrophes) pendant un intervalle de temps donné avant les essais. L'effet de certaines des caractéristiques de performance des organismes « stressés » dépend presque totalement du type et du degré de contrainte « stress » appliqués et l'ajout de tels détails dans le présent document est inapproprié. Cependant, des ouvrages de référence décrivent des modes opératoires que les laboratoires peuvent suivre lorsqu'ils souhaitent déterminer les caractéristiques de performance d'une méthode avec des cellules stressées.

Qualité de l'eau — Exigences pour l'établissement des caractéristiques de performance des méthodes microbiologiques quantitatives

1 Domaine d'application

Le présent document traite de la caractérisation des méthodes microbiologiques. Au sens du présent document, la caractérisation signifie l'étude de paramètres mesurables dans le but de décrire la manière dont les méthodes sont susceptibles d'être appliquées dans un ensemble donné de conditions, qui peuvent être décrits comme des caractéristiques de performance. Le document décrit les modes opératoires pour la détermination des caractéristiques de performance qui peuvent être utilisées pour la validation ou la vérification ultérieure de méthodes.

L'accent est mis sur les méthodes quantitatives sélectives et le présent document s'applique à tous les types d'eau. Pour les méthodes qui ne reposent pas sur un comptage microscopique direct, un comptage des colonies ou le nombre le plus probable, il convient de vérifier de manière approfondie l'applicabilité des modes opératoires décrits dans le présent document.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 17994:2014, *Qualité de l'eau — Exigences pour la comparaison du rendement relatif des microorganismes par deux méthodes quantitatives*

3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>;
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>.

3.1

exactitude

exactitude de mesure

étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur assignée d'un mesurande

Note 1 à l'article: L'exactitude de mesure n'est pas une grandeur et ne s'exprime pas numériquement. Un mesurage est quelquefois dit plus exact s'il fournit une plus petite incertitude de mesure.

Note 2 à l'article: L'exactitude de mesure est quelquefois interprétée comme l'étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées qui sont attribuées au mesurande.

[SOURCE: Guide ISO/IEC 99:2007, [16] 2.13, modifiée — remplacement de «... une valeur vraie» par «... une valeur assignée»; ajout des Notes 1 et 2 à l'article]

3.2

analyte

composant représenté au nom d'une grandeur mesurable

Note 1 à l'article: En microbiologie de l'eau, l'analyte est de préférence défini par une liste d'espèces définies de manière taxonomique. Dans la plupart des cas pratiques, l'analyte peut uniquement être défini par des désignations de groupe moins précises que les définitions taxonomiques.

[SOURCE: ISO 17511:2003, [14] 3.2]

3.3

prise analytique

prise d'essai

volume d'une suspension de particules (échantillon) inoculé dans une unité de détecteur (boîte de gélose, membrane filtrante, tube d'essai, grille carrée microscopique)

3.4

biais

biais de mesure

estimation d'une erreur systématique ou de la différence systématique entre la valeur quantitative assignée et la moyenne des résultats répétés d'un mesurage

3.5

caractéristiques de catégorie

caractéristique de performance de la méthode exprimée numériquement sous forme de fréquence relative basée sur une classification P/A ou $\pm$

3.6

unité formant colonie

UFC

particule formant colonie

PFC

organisme (ou groupe d'organismes) pouvant former une colonie dans certaines conditions spécifiées

Note 1 à l'article: 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. On considère, à tort, que le nombre de colonies observé est égal au nombre d'entités vivantesensemencées dans le milieu. L'unité de croissance, la particule viable, la propagule et le germe sont des termes ayant la même signification, mais qui transmettent mieux l'idée initiale et s'appliquent non seulement aux méthodes de comptage des colonies mais aussi au nombre le plus probable (NPP).

3.7

performances collaboratives d'une méthode

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

Note 1 à l'article: Il existe principalement deux types d'études collaboratives: les exercices d'intercalibration, qui sont effectués pour permettre aux laboratoires de comparer leurs résultats analytiques à ceux des autres laboratoires participants.

Note 2 à l'article: 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.

3.8

comptage de colonies confirmé

comptage de colonies vérifié

comptage de colonies présomptif, corrigé des faux positifs

Note 1 à l'article: Mathématiquement:

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

où

c est le comptage présomptif;

p est le taux de vrais positifs;

n est le nombre de positifs présomptifs isolés pour confirmation;

k est le nombre confirmé.

3.9

comptage corroboré

comptage obtenu en utilisant un mode opératoire de confirmation secondaire

3.10

niveau de détection

concentration minimale en organismes fournissant la preuve de la croissance avec une probabilité de $P = 0,95$ lorsqu'ils sont inoculés dans un milieu de culture spécifié et incubés dans des conditions spécifiées

Note 1 à l'article: Le niveau théorique conforme à cette définition est une moyenne de trois cellules viables dans un volume d'inoculum.

3.11

série de détection

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

Note 1 à l'article: La série de détection est la série de boîtes ou de tubes utilisée dans le cadre de l'estimation numérique d'une seule valeur.

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

3.12

détecteur

détecteur de particules

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

3.13

efficacité

E

fraction de colonies correctement assignées comme étant positives ou négatives

Note 1 à l'article: Mathématiquement:

$$E = \frac{a+d}{n}$$

où

- a est le nombre de colonies typiques confirmées comme étant l'organisme cible (vrais positifs);
- d est le nombre de colonies atypiques confirmées comme n'étant pas l'organisme cible (vrais négatifs);
- n est le nombre total de colonies testée pour confirmation.

3.14

faux négatif

résultat indiqué par la méthode d'essai comme étant négatif et qui s'est avéré par la suite contenir l'organisme cible

3.15

faux positif

résultat indiqué par la méthode d'essai comme étant positif et qui s'est avéré par la suite ne pas contenir l'organisme cible

3.16

germe

entité capable d'avoir une activité biologique (par exemple, respiration ou reproduction dans un milieu nutritif)

3.17

limite de détermination

concentration d'analyte la plus faible par prise analytique lorsque l'incertitude-type relative prévue est égale à une valeur spécifiée

3.18

comptage défini par la méthode

comptage obtenu en utilisant uniquement les modes opératoires de la méthode décrite

3.19

distribution binomiale négative

distribution statistique particulière «surdispersée» des comptages

Note 1 à l'article: Sa variance peut être exprimée comme étant $s^2 = \bar{x} + u_0^2 \bar{x}^2$ ($\bar{x}$ = moyenne).

Note 2 à l'article: Dans le présent document, le carré de l'écart-type opérationnel relatif (u_0) se substitue à l'inverse de l'exposant ($1/k$) de l'équation normalisée de la distribution binomiale négative.

3.20

valeur aberrante

valeur d'un ensemble de valeurs qui est incohérente avec les autres valeurs de cet ensemble

Note 1 à l'article: La probabilité d'apparition d'une telle valeur extrême est normalement inférieure à 1 % des essais répétitifs, mais augmente en cas de situations anormales. Des méthodes de test statistique peuvent être employées pour quantifier cette probabilité.

3.21

surdispersion

variation excédentaire du caractère aléatoire de Poisson

Note 1 à l'article: Détectée qualitativement par l'indice de dispersion de Poisson et mesurée quantitativement lors de l'estimation du paramètre u_0 (écart-type opérationnel relatif) de la distribution binomiale négative.

3.22

comptages parallèles

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

3.23**distribution de Poisson**

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

Note 1 à l'article: 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:

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

3.24**fidélité**

fidélité de mesure

étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées

Note 1 à l'article: La fidélité est en général exprimée numériquement par des caractéristiques telles que l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation dans les conditions spécifiées.

Note 2 à l'article: Les conditions spécifiées peuvent être, par exemple, des conditions de répétabilité, des conditions de fidélité intermédiaire ou des conditions de reproductibilité (voir ISO 5725-3[4]).

Note 3 à l'article: La fidélité sert à définir la répétabilité de mesure, la fidélité intermédiaire de mesure et la reproductibilité de mesure.

3.25**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 1 à l'article: La proportionnalité est calculée pour une évaluation statistique en tant que ratio de log-vraisemblance G^2 avec $n-1$ degrés de liberté.

3.26**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 sont «récupérés» par la méthode employée

Note 1 à l'article: Un autre terme similaire couramment employé est la productivité (voir ISO 11133[12]).

3.27**rendement relatif**

rapport des comptages de colonies obtenus par deux méthodes soumises à l'essai sur des prises d'essai équivalentes d'une même suspension

3.28**écart-type opérationnel relatif**

u_0

variabilité opérationnelle, exprimée comme une incertitude-type relative, associée aux étapes techniques du mode opératoire d'analyse

Note 1 à l'article: L'écart-type opérationnel relatif est souvent exprimé en pourcentage.

3.29**variance opérationnelle relative**

u_0^2

constante de surdispersion, le carré de l'écart-type opérationnel relatif

3.30
écart-type relatif

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

3.31
variance relative

u_{rel}^2
carré de l'écart-type relatif

3.32
répétabilité
répétabilité de mesure
fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité

3.33
conditions de répétabilité
condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps

3.34
reproductibilité
reproductibilité de mesure
fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de reproductibilité

Note 1 à l'article: Des termes statistiques pertinents sont donnés dans l'ISO 5725-1[2] et l'ISO 5725-2[3].

3.35
conditions de reproductibilité
condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires

3.36
robustesse
insensibilité d'une méthode d'analyse aux faibles modifications de la méthode

Note 1 à l'article: Pour étudier la robustesse, il est recommandé «d'abuser» de la méthode de manière contrôlée.

3.37
sensibilité
fraction du nombre total de cultures ou de colonies positives correctement attribuées lors de l'analyse de présomption

3.38
spécificité
fraction du nombre total de cultures ou de colonies négatives correctement attribuées lors de l'analyse de présomption

3.39
incertitude-type
incertitude du résultat d'un mesurage exprimée sous la forme d'un écart-type

3.40**incertitude de comptage**

écart-type relatif des résultats de comptages répétés des colonies ou des particules de la (des) même(s) boîte(s) ou du (des) même(s) champ(s) dans des conditions stipulées (même personne, personnes différentes dans un laboratoire)

3.41**vérification**

réalisation d'une seconde caractérisation par un laboratoire différent pour confirmer les résultats de la caractérisation initiale

4 Concepts de base**4.1 Généralités**

En ce qui concerne les calculs statistiques des particules, les comptages microscopiques obéissent aux mêmes lois que les comptages de cellules viables mais, à l'exception des méthodes de comptage des microcolonies, ne sont pas concernés par les problèmes biologiques liés à la croissance. Les colorants de différenciation, en particulier les complexes de marquage spécialement conçus à cet effet, ou autres agents utilisés pour identifier l'organisme cible, ne modifient pas les principes de base. Les mêmes principes que ceux utilisés pour les méthodes sélectives de comptage des colonies, peuvent être utilisés. Pour une explication plus approfondie de la théorie et de l'application des formules utilisées dans le présent document, la base mathématique de la variation rencontrée dans tous ces types de méthodes est décrite à l'[Annexe A](#).

4.2 Caractérisation

La caractérisation d'une méthode microbiologique repose en grande partie sur l'examen et l'expression des caractéristiques de performance de ladite méthode.

La caractérisation est un processus qui consiste à fournir des informations sur la performance probable dudit mode opératoire dans un ensemble spécifique de circonstances. Le présent document n'a pas pour vocation de fournir des valeurs guides pour chacune des caractéristiques de performance spécifiées; son but est de donner des lignes directrices sur les paramètres qu'il convient de déterminer et sur la meilleure manière de procéder pour les déduire à des fins de comparaison. Les méthodes donnant des caractéristiques de performance «médiocres» peuvent tout de même être utiles.

La caractérisation est un processus exploratoire dont l'objectif est de déterminer l'ensemble des caractéristiques de performance probables d'une méthode nouvelle, modifiée ou par ailleurs insuffisamment caractérisée. Il convient que cette caractérisation se traduise par des spécifications numériques et descriptives des performances et comprenne une description détaillée et univoque de la cible concernée (par exemple, colonie positives, tube ou puits d'une microplaque). Cependant, il convient de ne pas utiliser les valeurs obtenues comme des limites car elles sont susceptibles de varier en fonction du laboratoire, de la matrice, voire d'échantillons spécifiques.

La caractérisation est effectuée par un seul laboratoire pour déterminer tout d'abord les performances probables d'une méthode d'essai dans un laboratoire spécifique.

Une étude collaborative de la performance d'une méthode peut être effectuée en tant qu'étape supplémentaire pour évaluer les caractéristiques de performance interlaboratoires.

NOTE Il convient qu'un laboratoire développant sa propre méthode ou une variante d'une méthode normalisée existante puisse suivre les étapes de la caractérisation.

Il est impératif que les techniciens procédant à la caractérisation d'une méthode aient une grande expérience des autres méthodes microbiologiques.

Les caractéristiques de performance couvertes par le présent document sont énumérées dans le [Tableau 1](#).

Tableau 1 — Caractéristiques de performance décrites dans le document

Paramètre	Définition
Sensibilité ^{a,b,c}	fraction de tous les résultats positifs correctement attribuée ^e dans le comptage présomptif
Spécificité ^{a,b,c}	fraction de tous les résultats négatifs correctement attribuée ^f dans le comptage présomptif
Taux de faux positifs ^{a,b}	fraction de résultats positifs (par exemple colonies typiques) qui se sont, par la suite, révélés être dus à des organismes non cibles
Taux de faux négatifs ^{a,b}	fraction de résultats négatifs (par exemple colonies atypiques) qui se sont révélés être des organismes cibles
Sélectivité ^{a,b,c}	rapport entre le nombre de colonies cibles et le nombre total de colonies dans le volume d'échantillon
Efficacité ^{a,b}	fraction de toutes les colonies, correctement attribuée dans le comptage présomptif
Limite supérieure ^a	extrémité supérieure de la gamme de travail pour laquelle la méthode est utile (c'est-à-dire le nombre maximal de colonies pouvant être dénombré par boîte, ou autres systèmes de détection)
Répétabilité ^{a,b,c}	fidélité dans des conditions de répétabilité (mêmes opérateurs, mêmes conditions de fonctionnement, courte période, ...)
Reproductibilité ^a	fidélité dans des conditions de reproductibilité intralaboratoire ^d
Robustesse ^a	mesure de la capacité d'un essai à ne pas être affecté par des variations faibles mais délibérées des conditions d'essai (par exemple, température)
Rendement relatif ^a	efficacité avec laquelle une méthode récupère des organismes cibles à partir d'un échantillon, par rapport à un autre mode opératoire (Cette comparaison doit être réalisée lorsqu'il existe une autre méthode pour quantifier l'organisme ciblé. Il est conseillé de réaliser cette comparaison par rapport à une méthode de référence ISO).
Incertitude de comptage ^{a,b}	écart-type relatif de comptages répétés de la cible obtenus par comptage répété (boîtes, champs, tubes, etc.) dans des conditions stipulées (même personne, personnes différentes, même laboratoire, etc.)
^a Requis pour la détermination des caractéristiques de performance. ^b Requis pour la vérification par un seul laboratoire. ^c Spécifications et lignes directrices données. ^d Les méthodes concernant la reproductibilité et la fidélité interlaboratoires sont décrites à l'Annexe F. Il convient d'envisager l'utilisation de ces méthodes lorsque les performances interlaboratoires sont primordiales, par exemple lorsque des méthodes sont élaborées pour des raisons de conformité à la réglementation. ^e Les résultats positifs peuvent être des comptages de colonies, des unités réactionnelles positives (NPP) ou des comptages de cellules. ^f Les résultats négatifs peuvent être des colonies atypiques, des unités réactionnelles négatives (NPP) ou des cellules sans les caractéristiques spécifiques requises.	

Même si la reproductibilité et la fidélité interlaboratoires ne font pas partie des caractéristiques de performance décrites dans le corps du présent document, il est hautement souhaitable dans certaines situations de connaître ces paramètres. C'est notamment le cas lorsque les méthodes sont utilisées pour des raisons de conformité à la réglementation ou lorsque les données de plusieurs laboratoires sont comparées pour une quelconque raison. C'est pourquoi des méthodes conseillées de détermination de la reproductibilité interlaboratoires sont décrites à l'[Annexe F](#).

4.3 Vérification

La vérification a lieu lorsqu'un laboratoire met en œuvre une méthode élaborée ailleurs. La vérification a pour principal objectif de réunir les informations permettant de démontrer que le laboratoire est en mesure de produire des données de performance similaires à celles obtenues lors de la caractérisation primaire. Il n'est pas utile d'établir des limites concernant les divers composants de la caractérisation d'une méthode car ces composants peuvent varier selon de nombreux aspects de la méthode, le

type d'échantillon et le laboratoire réalisant le travail. Il convient que les données de vérification soient utilisées pour déterminer le type et la qualité des données susceptibles d'être obtenues par le laboratoire avec un mode opératoire donné et quel que soit le type d'échantillon donné.

En règle générale, la vérification utilise des formes sélectionnées et simplifiées des mêmes modes opératoires que ceux utilisés pour la caractérisation de la méthode, mais parfois réparties sur une période prolongée. Les échantillons naturels constituent des matériaux d'essai par excellence et le travail consistera uniquement à traiter les aspects de la performance de la méthode présentant un intérêt pour le laboratoire. Les exigences relatives à la vérification par un seul laboratoire sont spécifiées dans [l'Article 7](#).

4.4 Comparaison des méthodes

Les performances de la méthode comportent de multiples aspects. Il n'existe ni essai unique pour la comparaison 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 caractérisation peuvent être utilisées pour la comparaison des méthodes. Il est nécessaire d'évaluer les méthodes en parallèle uniquement pour les comparaisons de rendement.

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 études portant sur le rendement relatif d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence, organisées conformément à l'ISO 17994, impliquent de préférence une vaste gamme d'échantillons et la participation d'un nombre important de laboratoires permettant l'extension de la gamme d'échantillons sur de vastes zones géographiques. Cependant, il peut être parfois nécessaire de vérifier le résultat d'une étude du rendement d'une méthode alternative dans des conditions écologiques ou dans une zone géographique non représentées dans l'étude collaborative précédente. Lorsqu'un laboratoire doit uniquement confirmer le résultat de comparaison d'une méthode déjà évaluée et officiellement acceptée, il peut tirer pleinement profit des précédents résultats d'essai. Il convient que le laboratoire ait accès au compte-rendu de la comparaison collaborative. En conséquence, il convient que le laboratoire puisse disposer d'estimations de la moyenne et de l'écart-type de la différence relative. La Formule (3) donnée dans l'ISO 17994:2014, 5.4.3, peut être appliquée pour estimer le nombre recommandé d'échantillons. Toutefois, quel que soit le résultat du calcul, il convient que le nombre d'échantillons ne soit pas inférieur à trente.

La méthode qui donne le rendement le plus élevé d'organismes cibles confirmés est évidemment la meilleure lorsqu'une confirmation est nécessaire pour une utilisation en routine. Il se peut qu'une méthode donnant 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 caractérisation ne peuvent être corrigés par des définitions de colonies cibles plus détaillées ou par d'autres modes opératoires, il est possible de considérer que la méthode n'est pas valable. Il convient que la comparaison de deux méthodes microbiologiques comprenne une comparaison de leurs caractéristiques de performance (c'est-à-dire de leur caractérisation) ainsi qu'une comparaison en parallèle du rendement, en utilisant des échantillons contaminés ou dopés tels que spécifiés dans l'ISO 17994.

4.5 Échantillons

Il est généralement admis que la caractérisation et la comparaison de méthodes soient effectuées avec des échantillons naturels avec des concentrations naturelles de microbes. Bien que cette idée soit bonne sur le principe, il existe des exceptions dans certaines circonstances.

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

Le dopage peut être utile voire nécessaire pour la vérification lorsqu'il est difficile de trouver des échantillons naturels contenant les organismes cibles. La gamme de concentration optimale pour la caractérisation des méthodes microbiologiques est plus restreinte que la gamme de travail prévue. Il