Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 97 (2006)

Heft: 2-3

Artikel: Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie = Lignes directrices pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de leur inc...

Autor: Baumgartner, A. / Bischofsberger, T. / Bissig-Choisat, B.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982021

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 07.02.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie

Lignes directrices pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de leur incertitude de mesure dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de l'environnement

*A. Baumgartner[1], T. Bischofsberger[2], B. Bissig-Choisat[3], M. Dalla Torre[4], H. Emch[5], J.-L. Gafner[6], Ph. Hübner[7], R. Meyer[8], Ch. Müller[9], P. Scheffeldt[5], U. Spahr[1], R. Stephan[10], U. Wäspi[11]

[1]Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern
[2]UFAG Laboratorien AG, 6310 Sursee
[3]Bundesamt für Veterinärwesen, 3003 Bern
[4]Agroscope Liebefeld – Posieux, 3003 Bern
[5]METAS, 3003 Bern
[6]Agroscope Liebefeld – Posieux, 1725 Posieux
[7]Kantonales Laboratorium Basel Stadt, 4012 Basel
[8]NESTEC SA, 1350 Orbe
[9]Kantonales Laboratorium, 5000 Aarau
[10]Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, 8057 Zürich
[11]COOP Zentrallabor, 4133 Pratteln
*Autoren in alphabetischer Reihenfolge

Vorwort

Der Text dieser Richtlinie wurde von Mitgliedern einer Expertengruppe des Bundes, des Kantonalen Vollzugs und der Privatwirtschaft erarbeitet, welche unter der Leitung der METAS (Bundesamt für Metrologie und Akkreditierung) arbeitete.

Er basiert auf der Richtlinie EA-04/10 (1), prEN ISO/FDIS-Norm 16140 (2), ISO 7218:1996 (3), AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines (4, 5), und weiterer Literatur (6–31).

Préface

Le texte de cette directive a été rédigé par un groupe d'experts de la Confédération, des laboratoires cantonaux et du secteur privé qui a travaillé sous la direction du METAS (Office fédéral de métrologie et d'accréditation).

Il est basé sur les documents EA-04/10 (1), les normes EN ISO/FDIS 16140 (2), ISO 7218:1996 (3), AOAC International Committee Guidelines (4, 5) et d'autres publications (6–31).

Inhaltsverzeichnis/Table des matières

1.	**Einleitung**	**76**
2.	**Validierung**	**76**
2.1	Vorbemerkungen	76
2.2	Validierungskriterien	77
2.3	Anwendungsbereich	79
2.4	Spezifität	80
2.5	Sensitivität	80
2.6	Richtigkeit/Relative Richtigkeit	80
2.6.1	Bestimmung mit einer Zweitmethode	81
2.6.2	Bestimmung über künstliche Kontamination (Spiken)	81
2.6.3	Bestimmung mit einem Referenzmaterial	81
2.7	Wiederholpräzision (repeatability)	81
2.8	Nachweisgrenze	83
2.9	Bestimmungsgrenze	83
2.10	Statistische Übereinstimmung	83
2.10.1	Qualitative Methoden	83
2.10.2	Quantitative Methoden	84
3.	**Messunsicherheit**	**85**
3.1	Abschätzung der Messunsicherheit von qualitativen mikrobiologischen Prüfverfahren	85
3.1.1	Falsch-Positiv-Rate	86
3.1.2	Falsch-Negativ-Rate	86

3.2 Abschätzung der Messunsicherheit von quantitativen mikrobiologischen Prüfverfahren 86
3.3 Angabe der Messunsicherheit 87

4. Anhang – Definitionen aus Normen 87

1. Introduction 91

2. Validation 91
2.1 Remarques préliminaires 92
2.2 Critères de validation 93
2.3 Domaine d'application 94
2.4 Spécificité 95
2.5 Sensibilité 95
2.6 Exactitude/exactitude relative 95
2.6.1 Détermination à l'aide d'une deuxième méthode 96
2.6.2 Détermination à l'aide de contamination artificielle (dopage) 96
2.6.3 Détermination à l'aide de matériel de référence 96
2.7 Répétabilité 96
2.8 Limite de détection 98
2.9 Limite de détermination 98
2.10 Concordance statistique 98
2.10.1 Méthodes qualitatives 98
2.10.2 Méthodes quantitatives 99

3. Incertitude de mesure 100
3.1 Estimation de l'incertitude de mesure de méthodes microbiologiques qualitatives 100
3.1.1 Taux de faux-positifs 101
3.1.2 Taux de faux-négatifs 101
3.2 Estimation de l'incertitude de mesure de méthodes microbiologiques quantitatives 101
3.3 Indication de l'incertitude de mesure 102

4. Annexe – Définitions tirées des normes 102

Key words 105

Literatur/Bibliographie 105
Validierung/Validation 105
Probenahme/Echantillonage 106
Messunsicherheit/Incertitude de mesure 106
Weiterführende Literatur/Littérature complémentaire 106

1. Einleitung

Jeder experimentell erzeugte Messwert ist mit Unsicherheiten behaftet, welche der Aussagekraft der eingesetzten Methode Grenzen setzt. Die Validierung untersucht und charakterisiert Prüfverfahren auf diese Leistungsgrenzen. Sie belegt, dass ein Prüfverfahren sich unter Berücksichtigung der Unsicherheiten für die Erfüllung einer bestimmten Aufgabe eignet.

Dieser Leitfaden beschreibt die Vorgehensweise zur Validierung und Abschätzung der Messunsicherheit von mikrobiologischen Prüfverfahren.

Mikrobiologische Analysen bestehen in der Regel aus folgenden 7 Schritten:

1. Probenahme
2. Transport/Lagerung
3. Probenvorbereitung (z.B. Auswahl des Untersuchungsgutes, homogenisieren, verdünnen) — Präanalytischer Teil
4. Voranreicherung und Anreicherung (qualitative Analyse) oder dezimale Verdünnungsreihen (quantitative Analyse) — Analytischer Teil
5. Isolation, Auszählung
6. Bestätigung (Confirmation)
7. Auswertung

Ziel des präanalytischen Teils ist es, Proben derart zu erheben und gegebenenfalls aufzubewahren, dass der mikrobiologische Status nicht verfälscht werden kann und das zu entnehmende Aliquot repräsentativ für die Gesamtheit des Untersuchungsgutes ist. Dieser präanalytische Teil ist schwierig quantitativ zu erfassen. Die Unsicherheit bei der Probenahme ist in den meisten Fällen beträchtlich.

Der vorliegende Leitfaden behandelt nur den analytischen Teil; für die Aspekte des präanalytischen Teils wird auf die Literatur verwiesen [(z.B. spezifische Probenahme und Menge des Untersuchungsgutes: Codex alimentarius (18), ICMSF (19), PEV (20), Kap. 56 SLMB (14) und Badewasser (21, 22)]. Er beschreibt ein Vorgehen zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit durch ein Einzellabor (7).

2. Validierung

Die Validierung ist gemäss ISO/IEC 17025 (6) *«die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden»*.

2.1 Vorbemerkungen

Das Ziel der Validierung von Prüfverfahren ist nachvollziehbar den Nachweis zu erbringen, dass die vorgegebene, spezifische Prüfaufgabe erfüllt ist. Bei mikrobiologischen Prüfverfahren steht die Spezifität und Sensitivität im Vordergrund. Zusätzlich sind Aussagen über die Robustheit gegenüber äusseren Einflüssen und

die Querempfindlichkeit bedingt durch Matrixstörungen, sowie den Einfluss verschiedener Anwender (Laborpräzision) erforderlich.

Der beschriebene Validierungsaufwand erfüllt die Anforderungen für die Akkreditierung eines mikrobiologischen Prüfverfahrens, ist aber als Minimum anzusehen. Je grösser die Folgen eines Ergebnisses sind, desto grösser muss der Aufwand für die Absicherung sein.

Die Auswahl der Matrices und der Umfang der Validierung (Anzahl Proben, Aufwand für die einzelnen Validierungskriterien) richten sich deshalb nach dem Untersuchungsziel. Eine Validierung sollte spezifizierte Matrices umfassen und eine möglichst genaue Aussage über das gewünschte Untersuchungsziel (z.B. die Einhaltung einer Spezifikation) machen. Wird das Untersuchungsziel geändert (z.B. andere Matrices, neue Spezifikationen) ist die Validierung zu ergänzen.

Die laborinterne Einführung bereits bestehender, anderweitig validierter Methoden kann fallweise mit einem vereinfachten Validierungsverfahren durchgeführt werden. Dies bedingt jedoch eine entsprechende Erfahrung des Laborpersonals. Auch wenn genormte Prüfanweisungen (z.B. ISO, EN, SLMB, DIN, AOAC) als validiert gelten, muss ein Labor belegen können, dass die Methode intern beherrscht wird. Bei kommerziellen Kits muss der Anwender Validierungsunterlagen beilegen (z.B. AFNOR, firmeninterne Unterlagen) (1).

Der Umfang einer Validierung wird auch durch die der Methode zu Grunde liegenden Fragestellung bestimmt.

A.) Qualitative Verfahren (Ja/Nein Entscheid)

Bei qualitativen Verfahren (z.B. Nachweis pathogener Mikroorganismen) geht es um die Frage, ob die Mikroorganismen in einer bestimmten Matrix nachweisbar sind oder nicht.

B.) Quantitative Verfahren

Bei Methoden zur Überwachung von Limiten (Grenzwerte, Spezifikationen) konzentriert sich der Validierungsaufwand auf den Bereich um die fragliche Limite. Den grössten Validierungsaufwand benötigen Methoden, mit denen Analyten über einen grossen Bereich bestimmt werden müssen (z.B. Monitoring im Umweltmikrobiologiebereich).

2.2 Validierungskriterien

Bei der Validierung mikrobiologischer Nachweisverfahren ist zu unterscheiden zwischen neuen Verfahren, für die keine genormten Prüfanweisungen (Standard- bzw. Referenzmethoden) bestehen und Alternativverfahren (z.B. Schnellverfahren) zu bereits existierenden Referenzmethoden.

Alternativmethoden werden grundsätzlich mittels Methodenvergleich validiert. Gemäss Hygieneverordnung (HyV) vom 26.6.1995 Art. 4 (11) sind andere Prüfverfahren mit Messgrössen analog zu Kap. 56 SLMB (14) für amtliche Untersuchungen

zulässig, wenn sie nachweislich zu gleichen Beurteilungen führen, wie die Referenzmethoden.

Für den qualitativen Methodenvergleich eignet sich in vielen Fällen der Vierfeldertest (29) (Abb. 1).

zu validierende Methode		+	-	Σ
Referenzmethode	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
	Σ	a+c	b+d	a+b+c+d = n

Abbildung 1 **Auswerteschema für Vierfeldertest (29)**

+: positiver Nachweis resp. positive Beurteilung
–: negativer Nachweis resp. negative Beurteilung
a: Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analysenergebnisse
b: Anzahl der falsch negativen Analysenergebnisse bezüglich Referenzmethode
c: Anzahl der falsch positiven Analysenergebnisse bezüglich Referenzmethode
d: Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analysenergebnisse
n: Gesamtanzahl Analysenergebnisse

Bei der Validierung von Methoden muss prinzipiell zwischen qualitativen und quantitativen Prüfverfahren unterschieden werden. In der Regel hat die vollständige Validierung und die Abschätzung der Messunsicherheit einer Methode nachfolgende Kriterien zu umfassen (Tab. 1).

Tabelle 1
Validierungskriterien und Messunsicherheit

Kriterium	*qualitative Methode*		*quantitative Methode*	
	Alternativ	*Neu*	*Alternativ*	*Neu*
Anwendungsbereich (Kap. 2.3)	X	X	X	X
Spezifität (Kap. 2.4)	X	X	X	X
Sensitivität (Kap. 2.5)	X	X	X	X
Richtigkeit (Kap. 2.6)		X		X
Relative Richtigkeit (Kap. 2.6)	X		X	
Wiederholpräzision (Kap. 2.7)	X	X	X	X
Nachweisgrenze (Kap. 2.8)	X	X		
Bestimmungsgrenze (Kap. 2.9)			X	X
Statistische Übereinstimmung (Kap. 2.10)	X		X	
Falsch-Positiv-Rate (Kap. 3.1.1)	X	X		
Falsch-Negativ-Rate (Kap 3.1.2)	X	X		
Messunsicherheit (Kap. 3.2)			X	X

Falls auf die Bearbeitung einzelner Punkte verzichtet wird, ist dies schriftlich zu begründen und festzuhalten (z.B. Anwendungsbereich ist weit von Nachweisgrenze entfernt, Hinweis auf Erfahrungswerte aus Laborvergleichsstudien).

2.3 Anwendungsbereich

In Abhängigkeit des vorgesehenen Anwendungsbereiches sind die Untersuchungen an einer bzw. mehreren Produkte- und Lebensmittelkategorien (Matrices) durchzuführen. Ist die Methode nur für den Nachweis von Mikroorganismen in einem Produkt (z.B. Trinkwasser) bestimmt, ist diese Matrix bei den Untersuchungen einzusetzen. Handelt es sich um eine horizontale Methode (z.B. Nachweis in allen Lebensmitteln) sind die Untersuchungen jeweils an mindestens 4 verschiedenen Produkte- und Lebensmittelkategorien durchzuführen.

Für einen Methodenvergleich sind pro jeweilige Produkte- und Lebensmittelkategorie mehr als 20 verschiedene natürlich kontaminierte und mehr als 20 verschiedene natürlich nicht kontaminierte Proben sowohl mit der zu validierenden Alternativ- als auch mit der Referenzmethode zu untersuchen. Ist es nicht möglich eine genügende Anzahl natürlich kontaminierter Proben aufzutreiben, ist eine künstliche Kontamination von Proben erlaubt. Das Vorgehen der künstlichen Kontamination ist genau zu beschreiben.

Bei neuen Methoden sind pro jeweilige Produkte- und Lebensmittelkategorie mindestens 20 mit verschiedenen Stämmen des Zielorganismus künstlich kontaminierte und mindestens 20 nicht mit dem Zielorganismus, jedoch mit anderen Keimarten kontaminierte Proben zu untersuchen. Dabei sollte die Keimzahl zehn Mal über der Nachweisgrenze (für qualitative Methoden) respektive der Bestimmungsgrenze (für quantitative Methoden) sein. Die künstlich kontaminierten Proben sollen das Spektrum der (natürlicherweise) vorkommenden Eigenflora abdecken.

Mögliche Lebensmittelkategorien sind in den Anhängen der AOAC Richtlinie (4, 5) und der ISO-Norm 16140:2000 (2) aufgeführt. Bei ihrer Auswahl für die Vali-

dierung eines mikrobiologischen Prüfverfahrens sind die Kenntnisse über Prävalenz der nachzuweisenden Mikroorganismen in einzelnen Lebensmittelkategorien, resp. in Umweltproben (Bodenproben, Klärschlamm, Abwasser), sowie deren Relevanz für die menschliche Gesundheit zu berücksichtigen.

2.4 Spezifität

Die Spezifität einer Methode bezeichnet das Mass der Beeinflussung der Methode durch weitere in der Probe vorhandene Keime.

Für qualitative Prüfverfahren berechnet sich die Spezifität als d/(c+d) 100 und gibt an, wie viel % aller sicher negativen Proben als negativ erkannt werden (vgl. Abb. 1).

Für quantitative Prüfverfahren wird die Spezifität durch die Fähigkeit bestimmt, das Vorhandensein (Konzentration) des Zielorganismus in einer Probe ohne Interferenz mit Nicht-Zielorganismen oder mit der Probenmatrix genau zu messen.

Es wird von der gleichen Spezifität einer zu validierenden Methode im Vergleich zur Referenzmethode ausgegangen, wenn der Zielorganismus auch mit der Referenzmethode nicht nachgewiesen wird.

2.5 Sensitivität

Die Sensitivität bezeichnet die Fähigkeit eines Prüfverfahrens innerhalb einer gegebenen Matrix leichte Änderungen in der Anzahl Mikroorganismen nachzuweisen.

Für qualitative Prüfverfahren berechnet sich die Sensitivität als a/(a+b) 100 und gibt an, wie viel % aller sicher positiven Proben als positiv erkannt werden (vgl. Abb. 1).

Bei quantitativen Methoden wird die Sensitivität als die minimale Änderung in der Keimkonzentration in der Probe bestimmt, welche für eine signifikante Änderung der Keimzahl nötig ist.

Es wird von der gleichen Sensitivität einer zu validierenden Methode im Vergleich zur Referenzmethode ausgegangen, wenn der Zielorganismus auch mit der Referenzmethode nachgewiesen wird.

2.6 Richtigkeit/Relative Richtigkeit

Die Richtigkeit ist das Ausmass der Abweichung des Messergebnisses vom «richtigen Wert», und berücksichtigt den systematischen Fehler *(englisch: trueness, Messabweichung, englisch: bias=lack of trueness).* Im Rahmen der Validierung ist die Richtigkeit die am schwierigsten zu bestimmende Unsicherheit einer Methode. Gründe dafür liegen beispielsweise in der mangelnden Kenntnis über Vermehrungsfähigkeit (viability) und Verteilung der Mikroorganismen in der Matrix. Die Richtigkeit ist experimentell bei mikrobiologischen Methoden in der Regel nicht erfassbar. Sehr oft wird darum die Abweichung vom robusten Mittelwert in Ringversuchen oder Proficiency Tests als Mass der Richtigkeit herangezogen.

2.6.1 Bestimmung mit einer Zweitmethode

Die Bestimmung der Richtigkeit kann mit einer validierten Zweitmethode, wenn möglich einer Referenzmethode, durchgeführt werden. Die relative Richtigkeit bezeichnet den Grad der Übereinstimmung der Resultate, welche mit der zu validierenden Methode und der Referenzmethode an mindestens 20 gleichen Proben erhalten werden.

Für qualitative Prüfverfahren berechnet sich die relative Richtigkeit als (a+d)/n 100 und gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die beiden Methoden des Methodenvergleichs die gleichen Resultate ergeben (vgl. Abb. 1).

Bei quantitativen alternativen Prüfverfahren wird der Mittelwert ($\bar{d}$) aller- Differenzen zwischen den Resultaten mit der Referenzmethode ($\bar{x}$R) -und mit der Alternativmethode ($\bar{x}$A) erhaltenen Resultate berechnet. Dieser Wert darf nicht signifikant von null verschieden sein.

2.6.2 Bestimmung über künstliche Kontamination (Spiken)

Wenn kein zertifiziertes Referenzmaterial und keine Zweitmethode zur Verfügung stehen, wird die Richtigkeit durch künstliche Kontaminationen («Spiken») bestimmt. Die nachzuweisenden Mikroorganismen werden zu 6–20 Proben zugegeben. Dann werden die Konzentrationen der allenfalls kontaminierten sowie der künstlich kontaminierten Proben bestimmt.

Für qualitative neue Prüfverfahren berechnet sich die relative Richtigkeit als (a+d)/n 100 und gibt die Häufigkeit an, mit welcher die neue, zu validierende Methode die reellen Kontaminationen der Probe nachweist (vgl. Abb. 1).

Bei quantitativen alternativen Prüfverfahren wird der Mittelwert ($\bar{d}$) aller Differenzen zwischen den reellen Kontaminationswerten und mit der neuen Methode erhaltenen Resultate berechnet (vgl. Tab. 3). Dieser Wert darf nicht signifikant von null verschieden sein (siehe 2.10.2).

2.6.3 Bestimmung mit einem Referenzmaterial

Die Richtigkeit kann auch mit zertifiziertem Referenzmaterial bestimmt werden. Im Allgemeinen genügen 6–10 Bestimmungen. Wenn kein zertifiziertes Referenzmaterial, aber ein gut beschriebenes Material (z.B. Proben aus Ringversuchen oder Proficiency Tests) vorhanden ist, sollte die Richtigkeit mit diesem überprüft werden (meist keine Lebensmittelmatrices).

2.7 Wiederholpräzision (repeatability)

Die Präzision beschreibt die zufällige Abweichung von Werten um einen Mittelwert. Man unterteilt sie in Wiederhol-, Labor- und Vergleichpräzision. Unter Wiederholpräzision wird der Vergleich von Resultaten wiederholter Messungen derselben homogenisierten Probe (nach Stomacher) unter gleichen Bedingungen (gleiche Personen, Labors, Geräte, Reagenzien, Umgebungsbedingungen) verstanden. Die Wiederholpräzision (repeatability) wird mit r («klein r») angegeben.

Zur Abschätzung der Wiederholpräzision ist pro jeweilige Matrix eine oder mehrere Proben mit einem Gehalt des Zielkeimes nahe der Nachweisgrenze (für qualitative Methoden) resp. nahe der Bestimmungsgrenze (für quantitative Methoden) künstlich zu kontaminieren und 5 Mal unter gleichen Bedingungen zu untersuchen.

Bei qualitativen Prüfverfahren berechnet sich $r = \frac{x}{n}$

x = Anzahl übereinstimmende Resultate unter Wiederholbedingungen
n = Anzahl Messungen

Für quantitative Prüfverfahren gilt $r = 2{,}8 \cdot s_r$; s_r = Standardabweichung der unter Wiederholbarkeitsbedingungen erzielten Messresultate. Der Faktor 2,8 setzt sich zusammen aus: $2 \cdot \sqrt{2}$; 2 kommt von der Normalverteilung (95 % Konfidenzintervall); Wurzel 2 beruht darauf, dass sich r und R auf die Differenz von 2 einzelnen Prüfreihen beziehen (12).

Anmerkung 1:

Idealerweise gilt für die Standardabweichung der Anzahl ausgezählter Kolonien auf einer Platte die Poisson-Verteilung $\sigma = \sqrt{n}$. In der Praxis sind doppelt so grosse Standardabweichungen jedoch durchaus akzeptabel (9). Laboruntersuchungen zeigten des weiteren auf, dass mit 50 % bis 70 % der grösste Anteil an der Gesamtvarianz eines quantitativen mikrobiologischen Nachweisverfahrens auf die Komponente «Probe» fällt (Stichwort: Probeninhomogenität), während die methodenbedingte Varianz bei geübtem Laborpersonal nur 4 % bis 10 % und die aufgrund der Poissonverteilung unvermeidliche statistische Plattierungsvarianz ca. 25 % ausmacht (13). Die Wiederholpräzision ist in der Regel kleiner als die Vergleichpräzision (R, reproducibility). Anstelle der experimentellen Bestimmung der Wiederholpräzision kann deshalb bei der Validierung von quantitativen mikrobiologischen Prüfverfahren die bei internationalen mikrobiologischen Proficiency Tests für die Berechnung des z-score üblicherweise verwendete Standardabweichung von 0,5 $\log_{10}$ herangezogen werden.

Anmerkung 2:

Die Vergleichpräzision (R, reproducibility) ergibt sich aus Methodenvergleichsstudien. Falls solche Daten aus Ringversuchen und/oder Proficiency Tests vorhanden sind, sind diese in den Validierungsunterlagen aufzuführen. Die Vergleichspräzision ist jedoch nicht Gegenstand dieses Leitfadens, da sie die Mitwirkung mehrerer Laboratorien voraussetzt.

2.8 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze von qualitativen Prüfverfahren beschreibt die kleinste Anzahl Zielkeime, welche mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit entdeckt werden kann. Zur Abschätzung der Nachweisgrenze von qualitativen Prüfverfahren sind pro jeweilige Matrix Verdünnungsreihen von mindestens drei verschiedenen Konzentrationen (tief: 1 bis 10 KBE, mittel: 10 bis 100 KBE und hoch: grösser als 100 KBE) mit 4 verschiedenen Stämmen des Zielorganismus anzusetzen, die Matrices künstlich zu kontaminieren und mit der zu validierenden Methode zu untersuchen. Eine Negativkontrolle ist mitzuführen. Die Resultate der Untersuchungen der künstlich kontaminierten Proben werden mit der reellen Kontamination verglichen. Die Nachweisgrenze ist der tiefste Wert, bei dem alle Resultate positiv ausfallen.

2.9 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze ist die Anzahl der Keime, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann.

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze sind pro jeweilige Matrix Verdünnungsreihen von mindestens drei verschiedenen Konzentrationen mit 4 verschiedenen Stämmen des Zielorganismus anzusetzen, die Matrices künstlich zu kontaminieren und mit der zu validierenden Methode zu untersuchen. Eine Negativkontrolle pro Matrix ist mitzuführen.

Die Resultate der Untersuchungen der künstlich kontaminierten Proben werden mit der reellen Kontamination verglichen. Die Bestimmungsgrenze ist der tiefste Wert, bei dem die Richtigkeit und die Wiederholpräzision einen vorgegebenen Wert einhalten.

Im Kapitel 56 des Schweizerischen Lebensmittelbuches (14) werden für eine statistisch gesicherte numerische Auswertung jedes beschriebenen mikrobiologischen Nachweisverfahrens Angaben zur Gesamtbelegungsdichte und zur spezifischen Belegungsdichte gemacht. Eine numerische Resultatangabe erfolgt in der Regel nur bei Auszählung von mindestens 10 Kolonien (Ausnahme unverdünntes Untersuchungsgut wie Trinkwasser oder Milch).

Gemäss AOAC liegt die Bestimmungsgrenze quantitativer Plattierverfahren bei 2000–3000 KBE/g (4).

2.10 Statistische Übereinstimmung

2.10.1 Qualitative Methoden

Für den Vergleich qualitativer Methoden bieten sich zur statistischen Auswertung sogenannte «nicht-parametrische» Testverfahren wie der Vierfeldertest (z.B.: χ^2-Test nach McNemar) oder die Bestimmung des Konkordanzindex Kappa an. Da für die Anwendung des χ^2-Test nach McNemar die Summe der abweichenden Resultate (b+c, vgl. Abb. 1) grösser als 8 sein muss, was insbesondere beim Nachweis pathogener Bakterien nur durch eine hohe Anzahl Untersuchungsproben

und/oder durch klare Unterschiede in der Sensitivität der beiden Testverfahren erfüllt werden kann, wird die Berechnung des Konkordanzindex Kappa für die Validierung von mikrobiologischen Prüfverfahren als praktikable Alternative dem χ^2-Test nach McNemar vorgezogen.

Der Konkordanzindex Kappa zeigt das Mass der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren bezüglich eines Analyseparameters an und wird wie folgt berechnet:

Kappa=2 (ad−bc)/[(a+c)(c+d)+(a+b)(b+d)]; Bedeutung von a, b, c, d, vgl. Abb. 1

Die Bewertung erfolgt als Übereinstimmung je nach Wert von Kappa.

Tabelle 2
Bewertung des Konkordanzindex Kappa (28)

Kappa	*Übereinstimmung*
<0,10	keine
0,10–0,40	schwache
0,41–0,60	deutliche
0,61–0,80	starke
0,81–1,00	fast vollständige

2.10.2 Quantitative Methoden

Vergleiche quantitativer Methoden werden mittels parametrischer Testverfahren statistisch ausgewertet. Dabei handelt es sich um Tests für den Vergleich zweier abhängiger Stichproben bzw. für den Vergleich gepaarter Beobachtungen (z.B.: z-Test, t-Test). Akzeptanzkriterium ist Signifikanz mit Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0.05$.

Wenn Keimzahlen grösser als 100 KBE/g gemessen werden, sind vor der statistischen Auswertung die Keimzahlen zu logarithmieren.

Ergibt die zu validierende Methode die gleichen Resultate wie die Referenzmethode oder entspricht sie den reellen Kontaminationen, beträgt der Mittelwert der Differenzen der beiden Messresultate ($\bar{d}$) null.

Tabelle 3
Auswerteschema für quantitative Nachweisverfahren

Probe	*Abhängige Wertepaare (Resultate)* *Referenzmethode resp. reelle Kontamination (R)*	*zu validierende Methode (A)*	*Differenz (Methode A–R)*
1	x_{R1}	x_{A1}	d_1
..			
i	x_{Ri}	x_{Ai}	d_i
..			
n	x_{Rn}	x_{An}	d_n
Mittelwerte	$\bar{x}_R$	$\bar{x}_A$	$\bar{d} \pm s_d$

x_{Ri}: i-ter Messwert mit Referenzmethode
x_{Ai}: i-ter Messwert mit Alternativmethode

Der berechnete Mittelwert dieser Differenzen ($\bar{d}$) wird überprüft durch Berechnung des 95 % Vertrauensintervalls und dessen Vergleich mit dem theoretischen Wert Null:

Wenn $|\bar{d}| < \frac{t_{krit} \cdot s_d}{\sqrt{n}}$, dann besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen. Dabei bezeichnet t_{krit} den kritischen Wert aus Student's Test Tabelle für df_{n-1} (zweiseitig; 95 % Vertrauensintervall; $t_{dfn-1;\ 0.05;\ zweiseitig}$), s_d die Streuung der gemessenen Differenzen und n die Anzahl Wertepaare.

Zur Bestimmung der Korrelation zweier Methoden sind die durch beide Untersuchungsmethoden ermittelten Keimzahlen einer linearen Regressionsanalyse zu unterziehen. Die graphische Darstellung der durch die Referenz- und Alternativmethode gewonnenen Resultate von jeder Probe, wobei die x-Achse für die Referenz- und die y-Achse für die Alternativmethode zu verwenden ist, wird auf Ausreisser überprüft. Neben der graphischen Überprüfung bietet sich als Ausreissertest der Dixon-Test an (8, 10).

Beide Methoden sind äquivalent, wenn die berechnete Regressiongleichung nicht signifikant von der theoretischen Gerade «y=x» abweicht. Das 95 % Vertrauensintervall für die berechnete Steigung m der Regressionsgeraden beinhaltet bei äquivalenten Methoden den Wert eins:

Wenn $|m-1| < t_{krit} \cdot s_m$, dann ist die Steigung m der Regressionsgerade statistisch nicht von eins verschieden. Dabei bezeichnet t_{krit} den kritischen Wert aus Student's Test Tabelle für df_{n-2} (zweiseitig; 95 % Vertrauensintervall; $t_{dfn-2;\ 0.05;\ zweiseitig}$) und s_m die Streuung der Steigung der Regressionsgeraden.

3. Messunsicherheit

Die Messunsicherheit ist ein *«dem Messergebnis zugeordneter Parameter, der die Streuung der Werte kennzeichnet, die vernünftigerweise der Messgrösse zugeordnet werden könnte»* (23). Die Messunsicherheit resultiert von experimentell bestimmten Unsicherheiten und/oder geschätzten Unsicherheiten. Sie muss das gesamte Prüfverfahren umfassen. Bezieht sich das Ergebnis auf eine homogenisierte Probe, umfasst die Messunsicherheit nur den analytischen Teil. Andernfalls muss auch der präanalytische Teil berücksichtigt werden. Es muss aus dem Prüfbericht hervorgehen, worauf sich die Messunsicherheit bezieht.

Der Aufwand für die Ermittlung der Messunsicherheit hängt von der analytischen Problemstellung ab (24–28).

3.1 Abschätzung der Messunsicherheit von qualitativen mikrobiologischen Prüfverfahren

Das Konzept der Unsicherheit kann nicht direkt auf qualitative Prüfergebnisse, wie man sie z.B. bei reinen Nachweistests oder der Bestimmung von Merkmalen/Kriterien zur Identifizierung erhält, angewandt werden. Dennoch sollten einzelne Variabilitätsquellen, wie Inoculum, Reagenzien, Matrixeffekte und Interpretation

des die Analyse durchführenden Mitarbeiters, identifiziert werden und es sollte nachgewiesen werden, dass diese unter Kontrolle stehen. Wichtige Anhaltspunkte liefern die Falsch-Positiv- und die Falsch-Negativ-Rate.

3.1.1 Falsch-Positiv-Rate

Die Falsch-Positiv-Rate errechnet sich über den Quotienten aus der Anzahl falsch positiver Resultate und der Anzahl negativer Proben beim Referenzverfahren bzw. Anzahl nicht mit dem Zielorganismus künstlich kontaminierter Proben.

Die Falsch-Positiv-Rate berechnet sich für qualitative Prüfverfahren als c/c+d 100 und gibt an, wieviel % der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch positive Befunde gewertet wurden (vgl. Abb. 1). Falsch positive Befunde müssen unbedingt als solche durch weitere Charakterisierung der Keime bestätigt werden.

3.1.2 Falsch-Negativ-Rate

Die Falsch-Negativ-Rate errechnet sich über den Quotienten aus der Anzahl falsch negativer Resultate und der Anzahl positiver Proben beim Referenzverfahren bzw. Anzahl mit dem Zielorganismus künstlich kontaminierter Proben.

Die Falsch-Negativ-Rate berechnet sich für qualitative Prüfverfahren als b/a+b 100 und gibt an, wieviel % der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch negative Befunde gewertet wurden (vgl. Abb. 1).

3.2 Abschätzung der Messunsicherheit von quantitativen mikrobiologischen Prüfverfahren

Gemäss EA-04/10 Guideline (1) fallen mikrobiologische Untersuchungen üblicherweise in die Kategorie, die eine strenge metrologisch und statistisch gesicherte Berechnung der Messunsicherheit ausschliesst. Im Allgemeinen kann die Schätzung der Unsicherheit allein auf die Daten aus der Wiederhol- und Vergleichspräzision gestützt werden, idealerweise allerdings sollte die Richtigkeit unter Einbeziehung von systematischen Abweichungen *(bias)* z.B. aus Ergebnissen von Eignungsprüfungen (Proficiency Tests) mitberücksichtigt werden (sofern Lebensmittelmatrices!).

Die einzelnen Komponenten der Unsicherheit sollten identifiziert werden und es sollte nachgewiesen werden, dass sie unter Kontrolle stehen, und deren Beitrag zur Variabilität der Ergebnisse sollte bewertet werden. Einige Komponenten (z.B. Pipettierung, Wäge- und Verdünnungseffekte) können leicht gemessen und einfach bewertet werden, um nachzuweisen, dass sie einen vernachlässigbaren Beitrag zur Gesamtunsicherheit beisteuern. Andere Komponenten (z.B. Probenstabilität und Probenvorbereitung) sind nicht direkt messbar und ihr Beitrag kann statistisch nicht bewertet werden, aber ihre Wichtigkeit für die Variabilität der Ergebnisse sollte auch berücksichtigt werden.

Gemäss SLMB Kap. 56 (14) *«ist in einem gesetzlich festgelegten Höchstwert für Mikroorganismen die verfahrensbedingte Streuung bereits mitberücksichtigt, so dass*

jedes über einem Höchstwert liegende Resultat immer eine Überschreitung desselben bedeutet».

Aufgrund der Erfahrungen aus Proficiency Tests lässt sich die Messunsicherheit von Plattenverfahren (Guss-, Spatel- und Tropftechnik) abschätzen. Diese beträgt erfahrungsgemäss ± eine halbe 10er Potenz.

3.3 Angabe der Messunsicherheit

Die Messunsicherheit muss gemäss ISO 17025 (6) auf dem Prüfbericht angegeben werden, wenn sie:

- für die Gültigkeit oder Anwendung der Prüfergebnisse von Bedeutung ist,
- vom Kunden verlangt wurde oder
- die Einhaltung von vorgegebenen Grenzen in Frage stellt.

Wird die Messunsicherheit angegeben so muss aus dem Prüfbericht hervorgehen worauf sie sich bezieht.

Beispiel für die Angabe eines Resultats mit der Messunsicherheit für ein Vertrauensintervall von 95 %:

Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl in Rohmilch: 3,4 log ± 0,5 log KBE/ml*

* Die angegebene Messunsicherheit auf den untersuchten Teil der Probe deckt ein Vertrauensintervall von 95 % ab.

4. Anhang – Definitionen aus Normen

Alternative Methode

Als alternative Methode werden Methoden bezeichnet zu welchen bereits Referenzmethoden bestehen.

Analyse

Mikroorganismen oder assoziierte Nebenprodukte (z.B. Enzyme oder Toxine), welche mittels der Analysemethode gemessen werden.

Bestimmungsgrenze (limit of determination, limit of quantification) (1)

Anwendbar auf quantitative mikrobiologische Prüfungen: die geringste Anzahl von Mikroorganismen, die innerhalb einer vorgegebenen Variabilität unter den experimentellen Bedingungen des eingesetzten Verfahrens bestimmt werden kann.

Collaborative study

2. Schritt der Validierung: insbesondere bei neuen Methoden wird mit einem Ringversuch (mehrere Proben, mehrere Konzentrationen) mit 8–10 weiteren Expertenlabors die Validierung abgeschlossen. Dieser Schritt ist nicht zu verwechseln mit einem Proficiency Test (siehe unten).

Comparative study

1. Schritt der Validierung: vergleichende Untersuchung, z.B. zwischen einer zu validierenden Alternativmethode und einer bereits existierenden Methode, falls vorhanden, Referenzmethode.

Messunsicherheit (uncertainty of measurement) (23)

Dem Messergebnis zugeordneter Parameter, der die Streuung der Werte kennzeichnet, die vernünftigerweise der Messgrösse zugeordnet werden könnte.

Anmerkungen:

1. Der Parameter kann beispielsweise eine Standardabweichung (oder ein gegebenes Vielfaches davon), oder die halbe Weite eines Bereiches sein, der ein festgelegtes Vertrauensniveau hat.
2. Messunsicherheit enthält im Allgemeinen viele Komponenten. Einige dieser Komponenten können aus der statistischen Verteilung der Ergebnisse einer Messreihe ermittelt und durch empirische Standardabweichungen gekennzeichnet werden. Die anderen Komponenten, die ebenfalls durch Standardabweichungen charakterisiert werden können, werden aus angenommenen Wahrscheinlichkeitsverteilungen ermittelt, die sich auf Erfahrung oder andere Information gründen.
3. Es wird vorausgesetzt, dass das Messergebnis der beste Schätzwert für den Wert der Messgrösse ist, und dass alle Komponenten der Unsicherheit zur Streuung beitragen, eingeschlossen diejenigen, welche von systematischen Einwirkungen herrühren, z.B. solche, die von Korrektionen und Bezugsnormalen stammen.

Nachweisgrenze (limit of detection) (1)

Anwendbar auf qualitative mikrobiologische Prüfungen: die geringste Anzahl von Mikroorganismen, die nachgewiesen werden können, deren Zahlenwert jedoch nicht exakt bestimmbar ist.

Negative Abweichung (1)

Tritt auf, wenn das Alternativverfahren ein nicht bestätigtes negatives Resultat ergibt und das Referenzverfahren zu einem positiven Ergebnis führt. Diese Abweichung führt zum **falsch-negativen Resultat,** wenn nachgewiesen ist, dass das richtige Ergebnis positiv ist.

Neue Methode

Als neue Methoden werden solche bezeichnet, die neu entwickelt wurden und zu welchen keine genormten Prüfanweisungen (Standard- bzw. Referenzmethoden) bestehen.

Positive Abweichung (1)

Tritt auf, wenn das Alternativverfahren ein nicht bestätigtes positives Resultat ergibt und das Referenzverfahren zu einem negativen Ergebnis führt. Diese Abweichung wird zum **falsch-positiven Resultat,** wenn nachgewiesen wird, dass das richtige Ergebnis negativ ist.

Proficiency Test (PT, P-Test)

Mit P-Tests wird vorab die Qualität der eigenen Resultate mit denen anderer Labors verglichen.

Referenzmethode (1)

Genauestens untersuchte Methode, die klar und exakt die notwendigen Bedingungen und Verfahrensweisen zur Messung eines oder mehrerer Merkmalswerte beschreibt, von der erwiesen ist, dass sie eine ihrer vorgesehenen Verwendung entsprechende Richtigkeit und Genauigkeit besitzt, und die daher dazu eingesetzt werden kann, die Richtigkeit anderer Methoden in Bezug auf die gleiche Messung zu bewerten, insbesondere durch ihren Einsatz zur Charakterisierung eines Referenzmaterials. Referenzmethoden sind international anerkannte und akzeptierte Methoden, wie z.B. ISO, CEN, NMKL und AOAC Methoden und gewisse Nationale Methoden, wie z.B. SLMB.

Relative Richtigkeit (1)

Das Mass für den Grad der Übereinstimmung zwischen den Resultaten der zu bewertenden Methode und jenen, die mit einer anerkannten Referenzmethode erhalten wurden.

Richtigkeit (trueness) (12)

Das Ausmass der Annäherung zwischen dem Mittelwert aus einer grossen Serie von Ermittlungsergebnissen und einem anerkannten Bezugswert.

Anmerkung: Das Richtigkeitsmass wird üblicherweise ausgedrückt mittels einer systematischen Abweichungskomponente

Ringversuch

Siehe collaborative study.

Robustheit (ruggedness, robustness) (12)

Relative Unempfindlichkeit eines Analysenverfahrens gegenüber Änderungen der analytischen Randbedingungen.

Sensitivität, Empfindlichkeit (sensitivity) (16)

Anteil positiver Kulturen oder Kolonien an der Gesamtzahl die in der vorläufigen Untersuchung korrekt zugeordnet wurden.

Spezifität (specificity) (16)

Anteil negativer Kulturen oder Kolonien an der Gesamtzahl, die in der vorläufigen Untersuchung korrekt zugeordnet wurden.

Validierung (validation) (17)

Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine spezifische beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind.

Vergleichspräzision (reproducibility, «R») (15)

Ausmass der gegenseitigen Annäherung zwischen Messergebnissen derselben Messgrösse, gewonnen unter veränderten Messbedingungen (verschiedene Personen, Orte, Geräte, Reagenzien, Umgebungsbedingungen).

Wiederholpräzision (repeatability, «r») (15)

Bezeichnet das Ausmass der gegenseitigen Annäherung von Resultaten, die durch aufeinanderfolgende Messungen derselben Messgröße unter identischen Messbedingungen (gleiche Personen, Laboratorien, Geräte, Reagenzien, Umgebungsbedingungen) erhalten werden.

1. Introduction

Toute mesure obtenue expérimentalement comporte une incertitude qui fixe les limites de la validité de chaque méthode. La validation analyse et caractérise les méthodes d'essai par rapport à ces limites de performance. En tenant compte des incertitudes, elle démontre qu'une méthode d'essai est appropriée pour remplir les conditions d'une tâche fixée.

Ces lignes directrices décrivent la marche à suivre pour la validation et l'évaluation de l'incertitude de mesure des méthodes microbiologiques.

En règle générale, les analyses microbiologiques comportent les 7 étapes suivantes:

1. échantillonnage
2. transport, entreposage
3. préparation de l'échantillon (p. ex. choix de la fraction à analyser, homogénéisation, dilution) — partie pré-analytique
4. pré-enrichissement et enrichissement (analyses qualitatives) dilutions décimales (analyses quantitatives) — partie analytique
5. isolation, dénombrement
6. confirmation
7. évaluation

Le but de la partie pré-analytique est de prélever de manière représentative, de stocker et de préparer le matériel à analyser de telle manière que les teneurs microbiennes à déterminer ne soient pas faussées, et que la fraction analysée soit caractéristique de l'ensemble du matériel à examiner. Les variations liées à cette partie pré-analytique sont difficiles à estimer quantitativement. Dans la majorité des cas, l'incertitude liée à l'échantillonnage est importante.

Le présent guide ne concerne que la partie analytique; pour ce qui est de la partie pré-analytique, se référer à la littérature [p. ex. échantillonnages spécifiques aux produits et quantité du matériel à analyser: Codex alimentarius (18), ICSMF (19), PEV (20) et Chapitre 56 du MSDA (14), et pour l'eau de bains publics (21, 22)]. Il décrit la marche à suivre pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et de l'évaluation de l'incertitude de mesure pour un laboratoire unique (7).

2. Validation

Selon la norme ISO/IEC 17025 (6), la validation est la *« confirmation par examen et apport de preuves tangibles que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu sont satisfaites. »*

2.1 Remarques préliminaires

Le but de la validation d'une méthode d'essai est de démontrer de manière retraçable qu'elle permet de réaliser sa fonction spécifique prescrite. Au premier plan d'une méthode microbiologique se trouvent la spécificité et la sensibilité. En outre, des indications concernant la robustesse par rapport aux influences externes, aux effets de matrice, de même que l'influence des différents opérateurs (précision intra-laboratoire) sont nécessaires.

La validation n'est pas un processus unique et définitif. Le travail de validation détaillé ci-après remplit les exigences de l'accréditation pour une méthode d'analyse microbiologique, mais doit être considéré comme étant un minimum. Plus les conséquences d'un résultat sont importantes, plus l'effort pour en assurer la qualité doit être important.

Le choix des matrices et l'ampleur de la validation (nombre d'échantillons, effort pour les critères individuels de validation) sont déterminés par conséquent par le but de l'analyse. Une validation doit tenir compte des matrices à analyser, de même qu'une déclaration aussi précise que possible sur les objectifs souhaités (p. ex. le respect d'une spécification). Si les objectifs de l'analyse sont modifiés (p. ex. autres matrices, nouvelles spécifications), la validation doit être complétée.

L'introduction de méthodes existantes déjà amplement validées au laboratoire peut, selon les cas, être réalisée à l'aide d'une procédure de validation simplifiée. Cela nécessite toutefois une expérience appropriée du personnel du laboratoire. De même, lorsque des modes opératoires normalisés (p. ex. ISO, EN, MSDA, DIN, AFNOR, AOAC) peuvent être considérés comme validés, un laboratoire doit démontrer que la méthode est maîtrisée en interne . Les trousses commerciales doivent comporter les documents de validation établies par les fabricants (AFNOR, interne) (1).

L'ampleur d'une validation est aussi déterminée par la question de base que pose la méthode.

A.) analyse qualitative (décision oui/non)

Lors d'analyses qualitatives (p. ex. détection de micro-organismes pathogènes), la question est de savoir si un organisme est détectable dans une matrice donnée ou non.

B.) analyse quantitative (en lien avec une limite fixée)

Pour les méthodes destinées à vérifier les limites (limites légales, spécifications), l'effort de validation se concentre au voisinage de la limite en question. L'effort de validation le plus grand est nécessaire pour des méthodes couvrant la teneur d'un micro-organisme sur un vaste domaine (par exemple le monitoring microbien dans l'environnement).

2.2 Critères de validation

Lors de la validation de méthodes microbiologiques de détection, il convient de distinguer les méthodes nouvelles, pour lesquelles il n'existe pas de méthodes normalisées (méthodes standardisées ou de référence), des méthodes alternatives, celles qui peuvent être appliquées à la place des méthodes de référence existantes (p. ex. tests rapides).

Les méthodes alternatives se valident en principe par comparaison de méthodes. Selon l'Ordonnance sur l'hygiène du 26.6.1995, art. 4 (11), les méthodes analogiques à celles du chapitre 56 du MSDA sont autorisées si leurs résultats conduisent aux mêmes jugements que ceux des méthodes de référence.

Pour la comparaison des méthodes qualitatives, on procède le plus souvent selon le tableau à 4 champs (29) (Figure 1).

Méthode à valider		+	-	Σ
Méthode de référence	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
	Σ	a+c	b+d	a+b+c+d = n

Figure 1 **Tableau à 4 champs (29)**

Interprétation du schéma à 4 champs
+: détection ou jugement positif
–: détection ou jugement négatif
a: nombre de résultats positifs pour les deux méthodes
b: nombre de résultats faux négatifs par rapport à la méthode de référence
c: nombre de résultats faux positifs par rapport à la méthode de référence
d: nombre de résultats négatifs pour les deux méthodes
n: nombre total de résultats d'analyse

Lors de la validation de méthodes, il faut distinguer entre les méthodes qualitatives et quantitatives. En général, la validation complète d'une méthode et l'évaluation de son incertitude de mesure doivent comporter les paramètres suivants:

Tableau 1
Critères de validation et d'incertitude de mesure

Paramètre de validation (§)	*méthode qualitative*		*méthode quantitative*	
	alternative	*nouvelle*	*alternative*	*nouvelle*
Domaine d'application (2.3)	X	X	X	X
Spécificité (2.4)	X	X	X	X
Sensibilité (2.5)	X	X	X	X
Exactitude (2.6)		X		X
Exactitude relative (2.6)	X		X	
Répétabilité (2.7)	X	X	X	X
Limite de détection (2.8)	X	X		
Limite de détermination (2.9)			X	X
Conformité statistique (2.10)	X		X	
Taux de faux positifs (3.1.1)	X	X		
Taux de faux négatifs (3.1.2)	X	X		
Incertitude de mesure (3.2)			X	X

Si certains paramètres ne sont pas traités lors de la validation, il faut le justifier par écrit et s'y conformer (p. ex. le domaine d'application est situé loin de la limite de détection, renvoi à des valeurs expérimentales obtenues lors de tests d'aptitudes ou d'analyses en chaîne).

2.3 Domaine d'application

Selon le domaine d'application prévu, les examens doivent être effectués sur une ou plusieurs catégories de produits ou de denrées alimentaires (matrices). Si la méthode ne concerne la détection de microorganismes que dans un seul produit (p. ex. l'eau potable), on utilisera cette matrice pour les examens. S'il s'agit d'une méthode horizontale, (p. ex. détection dans toutes les denrées alimentaires), les examens devront être effectués au minimum dans 4 différents produits ou denrées alimentaires.

Pour une comparaison de méthodes, par produit ou denrée alimentaire il faudra analyser plus de 20 échantillons différents contaminés naturellement et plus de 20 échantillons différents non-contaminés, aussi bien avec la méthode alternative à valider qu'avec la méthode de référence. S'il n'est pas possible de rassembler un nombre suffisant d'échantillons contaminés naturellement, il est permis d'effectuer une contamination artificielle. La marche à suivre des contaminations artificielles doit être décrite avec exactitude.

Pour des méthodes nouvelles, il faudra analyser, par produit ou denrée alimentaire, au moins 20 échantillons différents contaminés avec des souches différentes du microorganisme-cible et au moins 20 échantillons contaminés non pas avec le microorganisme-cible, mais avec d'autres microorganismes. La teneur doit se situer au décuple de la limite de détection (méthodes qualitatives), respectivement de la limite de détermination (méthodes quantitatives). Les échantillons artificiellement contaminés doivent recouvrir le spectre de la flore microbienne naturelle.

Les catégories de denrées alimentaires sont indiquées dans les annexes de la directive AOAC (4,5) et dans la norme ISO 16140:2000 (2). Lors du choix des catégories spécifiques de denrées alimentaires pour la validation d'une méthode microbiologique, il faut tenir compte des connaissances de la prévalence du microorganisme en question dans ces groupes spécifiques d'aliments, de même que de leur signification pour la santé humaine.

2.4 Spécificité

La spécificité d'une méthode décrit la mesure des influences sur la méthode par d'autres micro-organismes présents dans un échantillon.

Pour une méthode qualitative, la spécificité se mesure par $d/(c+d)\times 100$ et donne le pourcentage de tous les échantillons négatifs qui sont reconnus comme négatifs (voir Fig. 1).

Pour une méthode quantitative, la spécificité désigne la faculté de mesurer précisément la teneur en micro-organismes cibles dans l'échantillon sans interférence avec d'autres micro-organismes ou avec la matrice.

Cette spécificité désigne la même faculté d'une méthode à valider, en comparaison de la méthode de référence, de ne pas détecter l'organisme cible lorsqu'il n'est pas détecté par la méthode de référence.

2.5 Sensibilité

La sensibilité désigne la faculté d'une méthode à détecter, dans une même matrice, de faibles variations dans le nombre de micro-organismes présents.

Pour une méthode qualitative, la sensibilité se calcule par $a/(a+b)\times 100$ et donne le pourcentage de tous les échantillons positifs qui sont reconnus comme positifs (voir Fig. 1).

Pour une méthode quantitative, la sensibilité désigne la variation minimale dans le nombre de micro-organismes qui produit une variation significative dans leur dénombrement.

Cette sensibilité désigne la même faculté d'une méthode à valider, en comparaison de la méthode de référence, de détecter l'organisme cible lorsqu'il est aussi détecté par la méthode de référence.

2.6 Exactitude/exactitude relative

L'exactitude est la mesure de l'écart entre la valeur obtenue et la « valeur vraie », et prend en compte l'erreur systématique (anglais: *trueness,* écart de mesure: *bias= lack of trueness).* Dans le cadre d'une validation, l'exactitude est le paramètre d'incertitude d'une méthode le plus difficile à déterminer. Les raisons de cette difficulté reposent par exemple sur le manque de connaissances au sujet de la capacité de multiplication (viabilité) et de la répartition des micro-organismes dans la matrice. L'exactitude n'est en règle générale pas déterminable expérimentalement pour les méthodes microbiologiques. Pour cela, la mesure de l'exactitude est très souvent

tirée de l'écart à la moyenne robuste dans les tests d'aptitude (proficiency tests) ou les analyses en chaîne.

2.6.1 Détermination à l'aide d'une deuxième méthode

La détermination de l'exactitude peut s'obtenir par l'utilisation d'une seconde méthode validée, si possible une méthode de référence. L'exactitude relative exprime le degré de concordance des résultats obtenus à l'aide de la méthode à valider et de la méthode de référence pour au moins 20 échantillons identiques.

Pour des méthodes qualitatives, l'exactitude relative est calculée par $(a+d)/n \times 100$ et donne la probabilité que les deux méthodes de comparaison donnent les mêmes résultats (voir Figure 1).

Pour des méthodes quantitatives alternatives, on calcule la moyenne de toutes les différences ($\bar{d}$) entre les résultats de la méthode de référence ($\bar{x}_R$) et ceux de la méthode alternative (x_A). Ce résultat ne doit pas être significativement différent de zéro.

2.6.2 Détermination à l'aide de contamination artificielle (dopage)

En absence de matériel de référence certifié et s'il n'existe pas de deuxième méthode, l'exactitude est déterminée à l'aide de contaminations artificielles (dopage). On ajoute le micro-organisme à déterminer (une seule souche) à 6 à 20 échantillons. Puis les teneurs des échantillons éventuellement naturellement contaminés et ceux artificiellement contaminés sont déterminées.

Pour les méthodes qualitatives nouvelles, l'exactitude relative se calcule également par la formule $(a+d)/n \times 100$ et donne la probabilité avec laquelle la nouvelle méthode à valider détermine la contamination réelle de l'échantillon (voir Figure 1).

Pour des méthodes quantitatives alternatives, on calcule la moyenne de toutes les différences ($\bar{d}$) entre les valeurs des échantillons réellement contaminés ($\bar{x}_R$) et les résultats de la nouvelle méthode ($\bar{x}_A$). Ce résultat ne doit pas être significativement différent de zéro.

2.6.3 Détermination à l'aide de matériel de référence

L'exactitude peut aussi être calculée à l'aide de matériel de référence certifié. En règle générale, 6 à 10 déterminations suffisent. Lorsqu'il n'y a pas de matériel de référence certifié disponible, mais qu'il existe un matériel bien décrit (p. ex. échantillons d'une analyse en chaîne ou d'un test d'aptitude), l'exactitude peut être déterminée à partir de ce matériel (la plupart du temps, il ne s'agit pas de denrée alimentaire).

2.7 Répétabilité

La précision décrit les écarts aléatoires des valeurs autour d'une moyenne. On distingue la précision de répétabilité, de laboratoire et de reproductibilité. Par précision de répétabilité, on comprend la comparaison de résultats provenant de mesures

répétées du même échantillon homogénéisé (après Stomacher) dans les mêmes conditions (mêmes personnes, laboratoires, équipements, réactifs, conditions d'environnement). La répétabilité (« repeatability ») est abrégée r.

Pour estimer la répétabilité, on choisit pour chaque matrice un ou plusieurs échantillons contenant une teneur en micro-organismes cibles proche de la limite de détection (méthodes qualitatives), respectivement proche de la limite de détermination (méthodes quantitatives), que l'on contamine artificiellement et que l'on analyse 5 fois dans les mêmes conditions.

Pour les méthodes qualitatives, on calcule $r = \frac{x}{n}$

x = nombre de résultats concordants dans des conditions de répétabilité
n = nombre de mesures

Pour les méthodes quantitatives, on calcule $r = 2.8 \cdot s_r$; s_r est l'écart-type des résultats obtenus dans des conditions de répétabilité. Le facteur 2.8 se réfère à $2 \cdot \sqrt{2}$; 2 étant issu de la distribution normale (avec un intervalle de confiance de 95 %); la racine de 2 reposant sur le fait que r et R se base sur la différence entre 2 séries de mesures (12).

Remarque 1:

Idéalement, pour l'écart-type, la distribution de Poisson $\sigma = \sqrt{n}$ s'applique au nombre de colonies comptées sur une boîte de milieu de culture. En pratique toutefois, des écarts-types allant jusqu'au double sont acceptables (9). Des essais en laboratoire ont montré pour les méthodes microbiologiques quantitatives, qu'avec 50 % à 70 %, la part la plus importante de la variance totale est constituée de la composante « échantillon » (mot clé: inhomogénéité de l'échantillon). La variance liée à la méthode exécutée par du personnel entraîné ne représente que 4 % à 10 %. Celle liée à la variance inévitable de l'ensemencement selon la distribution statistique de Poisson est de 25 % (13). En général, la répétabilité est plus petite que la reproductibilité (« reproducibility »). En lieu et place de la détermination expérimentale de la répétabilité, on peut, lors de la validation de méthodes microbiologiques quantitatives, utiliser l'écart-type de 0.5 $\log_{10}$ appliqué au calcul du z-score lors de tests d'aptitude internationaux.

Remarque 2:

La reproductibilité R (reproducibility) est obtenue à partir d'études de comparaisons de méthodes. Lorsque de telles données sont disponibles à partir d'analyses en chaîne ou de tests d'aptitude, elles doivent être mentionnées dans les documents de validation. Comme cette reproductibilité ne peut être évaluée que lorsque plusieurs laboratoires sont impliqués, elle ne fait donc pas partie de ces lignes conductrices.

2.8 Limite de détection

La limite de détection de méthodes qualitatives décrit le plus petit nombre de microorganismes-cibles qui peut être mis en évidence avec une assurance statistique donnée. Pour l'estimation de la limite de détection de méthodes qualitatives, il faut tester pour chaque matrice au minimum trois concentrations de 4 souches différentes du microorganisme-cible (teneur basse: de 1 à 10 UFC, teneur moyenne: de 10 à 100 UFC, teneur élevée: plus de 100 UFC). Les différentes matrices sont contaminées artificiellement, puis analysées à l'aide de la méthode à valider. Un contrôle négatif doit être analysé en parallèle.Les résultats obtenus de l'analyse des échantillons contaminés artificiellement sont comparés avec la contamination réelle. La limite de détection est la valeur la plus basse pour laquelle tous les résultats s'avèrent être positifs.

2.9 Limite de détermination

La limite de détermination est le nombre de microorganismes qui puisse être déterminé quantitativement avec une exactitude et une précision données.

Pour évaluer la limite de détermination, il faut tester par matrice des dilutions décimales d'au moins trois concentrations différentes à l'aide de 4 souches distinctes du microorganisme-cible. Les différentes matrices sont contaminées artificiellement, puis sont analysées à l'aide de la méthode à valider. Un contrôle négatif par matrice doit être analysé en parallèle.

Les résultats des analyses des échantillons contaminés artificiellement sont comparés avec la contamination réelle. La limite de détermination est la valeur la plus basse pour laquelle l'exactitude et la répétabilité se trouvent dans les limites fixées.

Dans le Chapitre 56 du Manuel suisse des denrées alimentaires (14), on indique pour chaque méthode microbiologique décrite la manière d'obtenir des évaluations numériques statistiquement assurées, selon les densités microbiennes totales et spécifiques. Un résultat numérique n'est accepté généralement que lorsqu'au moins 10 colonies sont dénombrées (à l'exception de produits d'analyse non dilués comme des eaux potables ou du lait).

Selon AOAC, la limite de détermination pour les méthodes quantitatives se situe entre 2000 et 3000 UFC/g (4).

2.10 Concordance statistique

2.10.1 Méthodes qualitatives

Pour la comparaison de méthodes qualitatives on dispose pour l'évaluation statistique de méthodes non-paramétriques comme le test des 4 champs (par exemple: le test χ^2 selon McNemar) ou de la détermination de l'index de concordance kappa. Comme dans l'application du test du χ^2 selon McNemar, la somme des résultats non concordants doit être plus grande que 8 (voir Tableau 1, b+c), le calcul de l'index de concordance kappa pour la validation de méthodes microbiologiques est proposé.

En effet la détection de bactéries pathogènes nécessite un grand nombre d'échantillons à analyser et/ou des différences nettes dans la sensibilité des deux méthodes.

L'index de concordance kappa est une mesure de la concordance de deux méthodes pour un paramètre analytique et se calcule de la manière suivante:

Kappa=2 (ad−bc)/[(a+c) (c+d)+(a+b) (b+d)] (voir Figure 1).

La concordance est évaluée suivant la valeur kappa d'après le tableau suivant:

Tableau 2
Evaluation du degré de concordance kappa (28)

kappa	*concordance*
<0.10	aucune
0.10–0.40	faible
0.40–0.60	nette
0.60–0.80	forte
0.81–1.00	presque complète

2.10.2 Méthodes quantitatives

La comparaison de méthodes quantitatives se fait statistiquement à l'aide de tests paramétriques. Il s'agit de tests pour la comparaison de deux échantillons dépendants, respectivement pour la comparaison de paires d'observations (p. ex. z-test, t-test). Le critère d'acceptation est la signification avec une probabilité d'erreur $p=0.05$.

Lorsque le nombre des microorganismes mesurés dépasse 100 UFC/g, il doit être exprimé sous forme logarithmique.

Lorsque la méthode à valider donne des résultats identiques à la méthode de référence ou est conforme à la contamination réelle, la moyenne ($\bar{d}$) des différences des deux méthodes est zéro.

Tableau 3
Évaluation de méthodes quantitatives

	Paires de valeurs dépendantes (résultats)		
échantillon	*Méthode de référence, resp. contamination réelle (R)*	*Méthode à valider (A)*	*Différence (méthodes A–R)*
1	x_{R1}	x_{A1}	d_1
..			
i	x_{Ri}	x_{Ai}	d_i
..			
n	x_{Rn}	x_{An}	d_n
moyennes	$\bar{x}_R$	$\bar{x}_A$	$\bar{d} \pm s_d$

x_{Ri}: i-ème valeur obtenue avec la méthode de référence
x_{Ai}: i-ème valeur obtenue avec la méthode alternative

La moyenne calculée des différences ($|\bar{d}|$) est vérifiée en calculant l'intervalle de confiance de 95 % et sa comparaison avec la valeur théorique zéro:

Si $|\bar{d}| < \frac{t_{krit} \cdot s_d}{\sqrt{n}}$, alors il n'existe pas de différence significative entre les deux séries de mesures. t_{crit} désigne la valeur critique des tableaux du test de Student pour df_{n-1} (distribution normale, intervalle de confiance 95 % ; $t_{dfn-1;\,0.05;\,\text{distribution normale}}$), s_d est le degré de variation des différences mesurées et n le nombre de paires de valeurs.

Pour estimer la corrélation entre deux méthodes, on peut aussi, à l'aide des dénombrements obtenus, effectuer une analyse de régression. La représentation graphique des résultats obtenus pour chaque échantillon par la méthode de référence et la méthode alternative, en utilisant l'abscisse pour la méthode de référence et l'ordonnée pour la méthode alternative, permet de déceler des valeurs aberrantes. Outre le graphique, le test des valeurs aberrantes de Dixon peut être appliqué (8, 10).

Les deux méthodes sont équivalentes si l'équation de régression ne diffère pas significativement de la droite théorique « x=y ». Pour un intervalle de confiance de 95 %, la pente m de la droite de régression vaut 1.

Si $|m-1| < t_{crit} \cdot s_m$, alors la pente m de la droite de régression n'est pas statistiquement différente de 1. Dans ce cas, t_{crit} désigne la valeur critique des tableaux du test de Student pour df_{n-2} (distribution normale, intervalle de confiance 95 % ; $t_{dfn-2;\,0.05;\,\text{distribution normale}}$), s_m étant le degré de variation de la pente de régression.

3. Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure est « un paramètre lié au résultat d'une mesure, qui décrit le degré de variation des valeurs qui peuvent être raisonnablement associée à la grandeur mesurée » (23). L'incertitude de mesure résulte d'incertitudes déterminées expérimentalement et/ou d'incertitudes estimées. Elle doit tenir compte de l'ensemble du processus de la méthode. Si le résultat provient d'un échantillon homogénéisé, l'incertitude de mesure ne concerne que la partie analytique. Dans les autres cas, la partie pré-analytique doit aussi être prise en compte. Le rapport d'essai doit spécifier à quoi l'incertitude de mesure se rapporte (p. ex. la quantité d'échantillon).

L'investissement nécessaire à la détermination de l'incertitude de mesure dépend du problème analytique posé (24–28).

3.1 Estimation de l'incertitude de mesure de méthodes microbiologiques qualitatives

Le concept de l'incertitude ne peut pas être appliqué directement aux résultats de méthodes qualitatives, comme p. ex. lors de tests de détection ou lors de la détermination de caractères/critères nécessaires à une identification. Des sources individuelles d'incertitudes, comme p. ex. l'inoculum, l'état des réactifs, les effets de matrice ou l'interprétation de l'analyste doivent toutefois être identifiées, et il faut démontrer que ces éléments sont maîtrisés. Les taux de faux-positifs et faux-négatifs procurent des indications importantes.

3.1.1 Taux de faux-positifs

Le taux de faux-positifs se calcule par le quotient du nombre de résultats faux-positifs sur le nombre de résultats négatifs obtenus par la méthode de référence, ou du nombre des échantillons non-contaminés artificiellement avec le microorganisme-cible.

Pour les méthodes qualitatives, le taux de faux-positifs se calcule par c/c+d. 100 et donne le pourcentage des échantillons qui ont été considérés faussement positifs avec la méthode alternative (voir Figure 1). Les résultats faux positifs doivent absolument être confirmés par des caractérisations supplémentaires des microorganismes.

3.1.2 Taux de faux-négatifs

Le taux de faux-négatifs se calcule par le quotient du nombre de résultats faux-négatifs sur le nombre de résultats positifs obtenus par la méthode de référence, respectivement le nombre d'échantillons contaminés artificiellement avec le microorganisme-cible.

Pour les méthodes qualitatives, le taux de faux-négatifs se calcule par b/a+b·100 et donne le pourcentage des échantillons qui ont été considérés faussement négatifs avec la méthode alternative (voir Figure 1).

3.2 Estimation de l'incertitude de mesure de méthodes microbiologiques quantitatives

Selon le Guide EA-04/10 (1), les analyses microbiologiques se classent généralement dans la catégorie d'essais qui exclut le calcul de métrologie et de statistique rigoureux de l'incertitude des mesures. En général, il est approprié de baser l'estimation de l'incertitude seulement sur les données de répétabilité et de reproductibilité (si disponibles). Idéalement l'exactitude (écart systématique, biais) devrait prendre en compte p.ex. les données tirées des résultats d'un plan d'un test d'aptitude (dans le cas où les matrices sont des denrées alimentaires !).

Les composantes individuelles de l'estimation de l'incertitude doivent être identifiées, et la démonstration qu'elles sont sous contrôle doit être faite, de même que leur contribution à la variabilité des résultats doit être évaluée. Certaines composantes (p. ex. le pipetage, la pesée et les effets de la dilution) peuvent être mesurées d'emblée et facilement évaluées dans la démonstration qu'elles ont une part négligeable dans l'incertitude globale. D'autres composantes (p. ex. la stabilité de l'échantillon, la préparation de l'échantillon) ne peuvent pas être mesurées directement et leur contribution ne peut pas être évaluée d'une manière statistique, mais leur importance dans la variabilité des résultats devrait aussi être prise en compte.

Selon le MSDA, chapitre 56 (14), « *dans une valeur maximale pour des teneurs en microorganismes fixée dans une norme, il est déjà tenu compte de la variabilité des mesures liées à la méthode, de sorte que chaque résultat qui se situe en dessus d'une limite maximale est toujours un dépassement de cette dernière.* »

Sur la base d'expériences provenant de tests d'aptitude, on peut estimer l'incertitude de mesure pour les méthodes en boîtes de petri (boîte coulée, inoculation en surface, technique par goutte). Cette incertitude de mesure, exprimée en écart-type, équivaut en règle générale à une demi valeur $\log_{10}$.

3.3 Indication de l'incertitude de mesure

L'incertitude de mesure doit être indiquée sur le rapport d'essai conformément à la norme ISO 17025 (6) lorsque:

- elle est importante pour la validité ou l'application du résultat d'analyse
- elle est exigée par le client
- elle pose la question du respect d'une limite donnée.

Si l'incertitude de mesure est communiquée, le rapport d'essai doit mentionner sur quoi elle repose.

Exemple d'indication d'une incertitude de mesure avec un intervalle de confiance de 95 %:

Germes totaux aérobies mésophiles dans le lait cru: 3.4 log ± 0.5 log UFC/ml*

*L'incertitude indiquée sur la partie homogénéisée de l'échantillon couvre un intervalle de confiance de 95 %

4. Annexe – Définitions tirées des normes

Analyse

Micro-organismes ou produits associés (p. ex. enzymes ou toxines) qui sont mesurés grâce à la méthode d'analyse.

Analyse en chaîne

(voir Collaborative study)

Collaborative study

2ème étape de la validation: spécialement pour des méthodes nouvelles, une analyse en chaîne (plusieurs échantillons, plusieurs domaines de concentration) entre 8 à 10 laboratoires conclut la validation. Cette étape ne doit pas être confondue avec un test d'aptitude (voir plus bas).

Comparative study

1ère étape de la validation: analyse comparée p. ex. entre une méthode alternative à valider et une méthode existante, si disponible une méthode de référence.

Déviation positive (1)

Se produit lorsque la méthode alternative donne un résultat positif non confirmé alors que la méthode de référence donne un résultat négatif. Cette déviation devient un **résultat faux-positif** s'il est démontré que le vrai résultat est négatif.

Déviation négative (1)

Se produit lorsque la méthode alternative donne un résultat négatif non confirmé alors que la méthode de référence donne un résultat positif. Cette déviation devient un **résultat faux-négatif** s'il est démontré que le vrai résultat est positif.

Exactitude (trueness) (12)

Exprime la dimension du rapprochement entre la moyenne d'une grande série de résultats et une valeur de référence reconnue.

Remarque:La mesure de l'exactitude est exprimée habituellement à l'aide d'une composante systématique de déviation.

Exactitude relative (1)

Exprime le degré de correspondance entre les résultats de la méthode à évaluer et ceux d'une méthode de référence reconnue.

Incertitude de mesure (uncertainty of measurement) (23)

Paramètre associé au résultat d'une mesure, qui définit la dispersion des valeurs et pouvant être raisonnablement associé à la grandeur mesurée.

Remarques:

1. Le paramètre peut par exemple être un écart-type (ou un multiple donné de cet écart-type) ou la demi valeur d'un domaine qui dispose d'un niveau de confiance donné.
2. L'incertitude de mesures comporte en général de nombreuses composantes. Certaines de ces composantes peuvent être définies par la distribution statistique des résultats d'une série de mesures et être caractérisée par un écart-type empirique. Les autres composantes, qui peuvent aussi être caractérisées par des écarts-types, sont définies par des distributions probables basées sur l'expérience ou d'autres informations.
3. Il est supposé que le résultat de la mesure est la meilleure valeur estimée de la valeur du mesurande et que toutes les composantes de l'incertitude contribuent à la dispersion, y compris celles qui proviennent des effets systématiques, p. ex. celles qui viennent de corrections et d'étalons de référence.

Limite de détection (limit of detection) (1)

Applicable aux méthodes microbiologiques qualitatives, c'est le plus faible nombre de micro-organismes qui puisse être détecté mais dont la valeur numérique n'est pas déterminable.

Limite de détermination (limit of determination, limit of quantification) (1)

Applicable aux méthodes microbiologiques quantitatives, c'est le plus faible nombre d'organismes qui, à l'intérieur d'une variabilité donnée dans les conditions expérimentales de la méthode, puisse être déterminé.

Méthode alternative

Une méthode alternative décrit une méthode pour laquelle une méthode de référence existe déjà.

Méthode de référence

Méthode la plus précisément évaluée, qui décrit clairement et exactement les conditions nécessaires et la procédure pour mesurer un ou plusieurs mesurandes, possédant dans son application prévue la précision et l'exactitude correspondante, pouvant être mise en œuvre pour évaluer l'exactitude d'autres méthodes appliquées pour effectuer les mêmes mesures, particulièrement pour leur utilisation pour la caractérisation d'un matériel de référence. Les méthodes de référence sont des méthodes reconnues et acceptées sur le plan international comme p. ex. les méthodes ISO, CEN, NMKL et AOAC et certaines méthodes nationales, comme p. ex. celles du MSDA.

Répétabilité (repeatability, r) (15)

Décrit la dimension du rapprochement réciproque de résultats provenant des mesures successives du même mesurande dans des conditions de mesures identiques (par la même personne, dans le même laboratoire et au moyen des mêmes équipements, réactifs, environnement).

Reproductibilité (reproducibility, R) (15)

Précision dans des conditions de reproductibilité.

Les conditions de reproductibilité sont celles où l'on obtient des résultats indépendants les uns des autres en appliquant les mêmes procédures à des objets d'analyse identiques dans différents laboratoires, par différentes personnes et au moyen d'équipements différents.

Robustesse (ruggedness, robustness) (12)

Insensibilité relative d'une procédure analytique envers des modifications des conditions analytiques marginales.

Sensibilité (sensitivity) (16)

Pourcentage des cultures ou colonies positives par rapport à l'ensemble des résultats préliminaires ayant été correctement classés (ISO 13843:2000).

Spécificité (specifity) (16)

Proportion des cultures ou colonies négatives par rapport à l'ensemble des résultats préliminaires ayant été correctement classés (ISO 13843:2000).

Test d'aptitude (Proficiency Test (PT, P-Test)

Avec des tests d'aptitude, on contrôle d'abord la qualité de ses propres résultats avec ceux d'autres laboratoires.

Validation (17)

Confirmation par examen et apport de preuves tangibles que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu sont satisfaites.

(ISO/IEC 17025:2000).

Key words

Guideline, microbiological testing, food-stuffs, validation, measurement uncertainty

Literatur/Bibliographie

Validierung/Validation

1 EA-04/10 Accreditation for Microbiological Laboratories, 07/2002 rev02. http://www.european-accreditation.org/pdf/EA-4-10rev02.pdf
2 ISO 16140:2000(E) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the Validation of Alternative Microbiological Methods
3 ISO 7218:1996(E) Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations
4 AOAC INTERNATIONAL Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation, J. AOAC Int. **82**, 402–415 (1999)
5 *Feldsine P., Abeyta C. and Andrews W.H.:* AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J. AOAC Int. **85**, 1187–1200 (2002)
6 ISO/IEC 17025 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025: 2005)
7 *Hübner P., Gautsch S. and Jemmi Th.:* In House validation (Single Laboratory Validation) of Microbiological Methods. Mitt. Lebensm. Hyg. **93**, 118–139 (2002), http://www.bag.admin.ch/verbrau/pub/x/mitteil/2002/Heft%2093_2_2002.pdf
8 MICROVAL-WG 3 Dokument Technical rules for validation criteria. Oktober 1995
9 AFNOR Richtlinie Validation AFNOR des méthodes rapides d'analyses. April 1994
10 NordVal Validation: Protocol for the validation of alternative microbiological methods (2002) http://www.nmkl.org/NordVal/Validation-protocol%20-2002-10-22.pdf
11 Verordnung des EDI vom 26. Juni 1995 über die hygienischen und mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchsgegenstände, Räume, Einrichtungen und Personal (Hygieneverordnung, HyV) SR 817.051. http://www.admin.ch/ch/d/sr/8/817.051.de.pdf
12 Statistik und Ringversuche, SLMB, Kapitel 60 A-C, http://www.bag.admin.ch/slmb/pdf_d/60_Statistik.pdf; http://www.bag.admin.ch/slmb/info/aktuell/d/60C_Validierung%20und%20Messunsicherheit.pdf
13 *Berg C., Dahms S., Hildebrandt G., Klatwchka S. und Weiss H.:* Microbiological collaborative studies for quality control in food laboratories: Reference material and evaluation of analyst's errors. Int. J. Food Microbiology **24**, 41–52 (1994)
14 Mikrobiologie. SLMB Kapitel 56, http://www.bag.admin.ch/slmb/pdf_d/56_Mikrobiologie.pdf
15 VIM: 1993, ISO international vocabulary of basic and general terms in metrology
16 ISO 13843:2000, Water quality – Guidance on validation of microbiological methods
17 ISO 9000:2000, Quality management systems – fundamentals and vocabulary

Probenahme/Echantillonage

18 Codex Alimentarius CX/MAS 02/3: Proposed draft general guidelines on sampling. 24th Session, Budapest, Hungary, 18–22 November 2002, ftp://ftp.fao.org/codex/ccmas24/ma02_03e.pdf

19 International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): Microorganisms in Foods 2 – Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. Second edition, 1986. University of Toronto Press, Toronto, Canada. http://www.foodscience.afisc.csiro.au/icmsf/icmsf2.pdf

20 Verordnung vom 4. Juni 1984 über die Probenerhebung von Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen (Probenerhebungsverordnung, PEV) Artikel 6. SR 817.94. EDMZ, 3000 Bern. http://www.admin.ch/ch/d/sr/8/817.94.de.pdf

21 Empfehlungen für die hygienische Beurteilung von See- und Flussbädern, Jan. 1991, Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Verband der Kantonschemiker der Schweiz, Verband der Kantonsärzte der Schweiz

22 SIA-Norm 385/1, Wasser und Wasseraufbereitungsanlagen in Gemeinschaftsbädern, 2000

Messunsicherheit/Incertitude de mesure

23 Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), ISO, Genf, ISBN 92-67-10188-9 (1993)

24 EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, second edition (QUAM:2000.P1). http://www.measurementuncertainty.org/mu/guide/index.html; EURACHEM/CITAC Leitfaden Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen, Zweite Auflage, (2. Entwurf), Stand: Mai 2003, http://www.uni-stuttgart.de/eurachem/pdf/quam2000de_v2.pdf

25 SN ENV 13005 Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen (Ausgabe 2000–05)

26 Draft ISO Technical Specification 19036. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (December 2004)

27 *Niemelä S.I.:* Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Advisory Commission for Metrology, MIKES Publication J4/2003. http://www.mikes.fi/documents/upload/J4_2003.pdf
CCFRA. Microbiological measurement uncertainty: a practical guide. Guideline No. 47 (2004). http://www.campden.co.uk/publ/pubfiles/g47.htm

Weiterführende Literatur/Littérature complémentaire

28 *Sachs L.:* Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin, 8. Auflage 1997

29 *Pichhardt Klaus:* Lebensmittelmikrobiologie – Grundlagen für die Praxis. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 4. überarb. Aufl. (1998)

30 International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): Microorganisms in Foods 7 – Microbiological testing in food safety management. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht, Norwell MA, New York, London 2002

Korrespondenzadresse: Andreas Baumgartner, Bundesamt für Gesundheit, Sektion Mikrobiologie und Biotechnologie, 3003 Bern, Schweiz, Phone: 041 31 322 95 82, E-Mail: andreas.baumgartner@bag.admin.ch