

---

# **Incertitude statistique relative aux techniques d'analyse microbiologiques**

**Robert Abrams**

Tous droits réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite et/ou rendue publique ou être transmise sous n'importe quelle forme ou n'importe quel moyen, électronique, mécanique, photocopie, enregistrement ou autre, sans permission écrite préalable de l'AFSCA.

---

## **Table des matières**

1	Remarques préalables .....	4
2	Méthodes d'analyse microbiologiques .....	4
2.1	Méthodes d'analyse quantitatives (QN) .....	4
2.2	Méthodes d'analyse qualitatives (QL) .....	5
2.3	Méthodes d'analyse chimiques en lien avec la microbiologie .....	5
2.4	Méthodes physiques .....	5
2.5	Techniques alternatives utilisées lors de la réalisation des méthodes d'analyse QN et QL classiques. ....	5
2.6	Confirmation des micro-organismes .....	5
3	Définitions – facteurs statistiques qui jouent un rôle dans l'incertitude .....	6
3.1	Quelques notions générales de statistique .....	6
3.2	Populations .....	6
3.2.1	Types de populations .....	6
3.2.2	La distribution normale .....	6
3.2.3	Boxplot .....	9
3.3	Qu'est ce que l'incertitude .....	9
3.3.1	Incertaince .....	9
3.3.2	Précision .....	9
3.3.3	Justesse, biais .....	9
3.3.4	Fidélité .....	10
3.3.4.1	Répétabilité .....	11
3.3.4.2	Reproductibilité .....	11
3.3.4.2.1	Reproductibilité intra-laboratoire .....	11
3.3.4.2.2	Reproductibilité inter-laboratoire .....	11
3.3.5	Incertaince standard (u) .....	12
3.3.6	Incertaince étendue (u) .....	12
3.3.7	Facteur d'expansion (k) .....	12
3.3.8	Incertaince standard combinée ( $u_c$ ) .....	12
3.3.8.1	Règles principales pour la détermination de l'incertaince combinée .....	12
3.3.8.1.1	Règle de la somme .....	12
3.3.8.1.2	La règle du produit .....	12
3.3.9	Incertaince lors de tests microbiologiques QL .....	13
3.3.10	Distribution de Poisson .....	13
3.3.10.1	Distribution binomiale .....	13
3.3.10.2	Distribution de Poisson .....	14
3.3.11	Distribution de Poisson – relation avec la microbiologie .....	15
3.3.12	Pourquoi les dénombrements microbiologiques sont-ils distribués de façon logarithmiquement normale ? .....	16
3.3.13	Différence relative critique – Écart-type relatif géométrique .....	16
3.3.14	Observations aberrantes .....	16
3.3.14.1	les reprendre ou non dans les calculs ? .....	16
3.3.14.2	modos de détermination .....	17
3.3.14.2.1	Test de Dixon .....	17
3.3.14.2.2	Test de Grubb .....	17
3.3.15	Application de tests statistiques : .....	18
3.3.15.1	Test $X^2$ .....	18
3.3.15.2	Test F (Test de Fisher) .....	18
3.3.15.3	Test T (Test T de Student ) .....	19
3.3.15.4	autres tests statistiques .....	20
3.3.15.4.1	Youden-plot .....	20
4	Factos statistiques qui jouent un rôle dans les analyses microbiologiques .....	21
4.1	Considérations générales et préalables .....	21
4.2	Factos liés à l'environnement .....	22
4.2.1	Conditions d'entreposage (en partie préalables aux activités de laboratoire) .....	22
4.2.2	Milieus de culture et réactifs .....	22
4.2.3	Appareillage et matériel .....	22
4.2.4	Lié à l'analyse .....	23
4.2.4.1	Méthode d'analyse .....	23

4.3	Facteurs liés à l'échantillon (matrice).....	23
4.3.1	Préalablement aux activités de laboratoire.....	23
4.3.2	Matrice .....	24
4.4	Facteurs liés à la manipulation (laborantin).....	24
4.4.1	Échantillonner (représentativité de la prise d'essai).....	24
4.4.2	Peser.....	24
4.4.3	Diluer (QN).....	24
4.4.4	Ensemencer.....	25
4.4.5	Lire .....	26
4.4.6	Dénombrer et interpréter (incertitude de comptage) .....	27
4.4.7	Confirmer .....	27
4.4.8	calculer.....	27
4.5	Facteurs résiduels : .....	27
4.6	En résumé .....	28
4.7	A propos du biais.....	29
5	Points d'attention et exemples lors de la rédaction d'un plan d'analyse pour la détermination de l'incertitude de mesure .....	30
5.1	matrice et groupes de matrices .....	30
5.2	Contamination.....	31
5.2.1	quelles souches .....	31
5.2.2	quel niveau.....	31
5.2.3	contamination naturelle vs artificielle .....	31
5.3	Quelques techniques d'analyse particulières.....	32
5.3.1	Méthodes MPN .....	32
5.3.2	Autres.....	34
5.4	méthodes d'analyse qualitatives (QL) limite de détection .....	34
5.5	choix des techniques statistiques (QN).....	35
5.5.1	analyses indépendantes .....	35
5.5.2	échantillons doubles appariés .....	35
5.6	plans d'analyse .....	36
5.6.1	Tests quantitatifs (QN).....	36
5.6.2	Tests qualitatifs (QL).....	36
5.7	contrôle continu .....	36
5.8	quelques outils software astucieux pour le calcul et le contrôle (NMKL, autres).....	37
6	Critères réalisables et réalistes de l'incertitude de mesure.....	37
6.1	études, littérature, autres considérations .....	37
7	Relation avec l'évaluation des laborantins .....	38
8	Publications – ouvrages de référence .....	39

Huit figures et quatorze tableaux ajoutés.

La numérotation des formules est alignée à droite.

Les renvois à des références, comme mentionné au chapitre 7, sont ajoutés en *italique* et entre parenthèses.

Deux documents de travail Excel annexés :

- Document de travail Excel pour applications du présent syllabus
- Document de travail Excel de la Noorse School voor Diergeneeskundige Wetenschappen, basé sur la norme NMKL n° 8, 2002, deuxième édition. Measurement of uncertainty in microbiological examinations of Foods.

---

# 1 Remarques préalables

1. Dans ce syllabus, plusieurs symboles ou descriptions sont souvent utilisées pour les mêmes notions et définitions. Le but n'est certainement pas de créer la confusion. En fonction de la source de référence (associée à certains auteurs, à certains pays, à l'inventeur, etc.), ces différents symboles et définitions sont utilisés de manière préférentielle ou même exclusive. On sera donc inévitablement confronté à la consultation de plusieurs ouvrages de référence. Il est donc important de saisir la signification sous-jacente commune de ces notions.
2. Il est fréquent en statistiques que pour la même notion, il y ait deux (ou plusieurs !) expressions, la première exprimant plutôt la mesure de correspondance avec la valeur de référence, tandis que la deuxième met l'accent sur l'écart par rapport à cette valeur.

Quelques exemples importants :

- précision - incertitude
- justesse - biais
- précision – dispersion
- zone de probabilité – zone de rejet

Ces notions sont abordées plus en détails dans ce syllabus et sont intentionnellement confondues pour familiariser le lecteur aux deux modes de description. S'il existe encore d'autres modes de description courants, ceux-ci sont également ajoutés entre parenthèses dans le texte.

3. Dans les formules statistiques, les lettres grecques signifient que les résultats sont basés sur la totalité des distributions. Dans la pratique, ils sont presque toujours inconnus et les résultats doivent être basés sur une série limitée d'observations. Dans ce cas, on utilise alors les lettres normales en guise de symbole.
4. Pour une bonne exécution des techniques d'analyse bactériologiques et par conséquent également pour en déterminer l'incertitude de mesure, ce syllabus part du principe que toutes les techniques de base des bonnes pratiques de laboratoire, telles que décrites dans ISO7218 (16), sont bien appliquées.
5. Des tableaux sous forme Excel sont également disponibles dans le document de travail Excel spécialement annexé et peuvent être utilisés en guise d'exercice.
6. Le présent syllabus met systématiquement en avant la méthode de détermination de l'incertitude de mesure, telle que présentée dans la norme ISO 19306, comme méthode de 'premier choix' pour les techniques d'analyse quantitatives. Elle est décrite comme « global approach ». On y fait donc très régulièrement référence au travers de ce syllabus.

## 2 Méthodes d'analyse microbiologiques

### 2.1 Méthodes d'analyse quantitatives (QN)

Les méthodes d'analyse microbiologiques quantitatives (également appelées méthodes de dénombrement) ont en commun qu'elles déterminent le nombre de microorganismes viables dans une quantité donnée d'échantillon analysé.

Les méthodes de dénombrement classiques expriment généralement ce nombre en termes d'« unités formant colonies » (ufc) parce que ces unités sont en mesure de former des colonies observables de façon macroscopique sur un milieu de culture solide, ou dans un milieu liquide par la technique MPN. Pour cette dernière technique, la dénomination d'ufc n'est en réalité pas tout à fait correcte étant donné qu'aucune colonie n'est ici formée mais que l'on ne constate que la croissance (turbidité). Une interprétation statistique permet toutefois la conversion en « ufc ».

---

Les modes de détermination **alternatifs** peuvent avoir une autre base de dénombrement, mais celle-ci est le plus souvent reliée à l'unité « ufc » classique (ex. cytométrie fluorimétrique en guise d'analyse de la qualité du lait).

Le flux général des méthodes quantitatives peut être représenté comme en fig.8 à la fin de ce syllabus.

## **2.2 Méthodes d'analyse qualitatives (QL)**

Les méthodes d'analyse microbiologiques qualitatives démontrent si des micro-organismes viables d'une certaine espèce sont ou non présents dans une quantité donnée d'échantillon. On parle également de « possibilité de détection », « essai limite ». Il n'y a donc pas de quantification ici.

On peut affirmer qu'il n'existe en ce moment aucun réel consensus sur le mode de définition et d'expression de l'incertitude (de mesure) quant à la limite de détection pour ces méthodes.

Les méthodes d'analyse qualitatives ne relèvent donc pas de la portée du présent syllabus. Quelques considérations à ce sujet sont tout de même formulées plus loin (voir chapitre 5.4).

## **2.3 Méthodes d'analyse chimiques en lien avec la microbiologie**

Pour certaines matrices alimentaires, des méthodes d'analyse chimiques quantitatives sont également appliquées pour la détermination d'analytes formées par l'activité microbiologique. C'est principalement le cas dans les matrices de poisson et de crustacés (frais). Les effets de matrice peuvent provoquer ici une très grande variation. Ces analyses ne relèvent pas du cadre du présent syllabus.

## **2.4 Méthodes physiques**

Il existe également plusieurs méthodes alternatives de détermination (tant pour les techniques QN que pour les QL) basées sur les caractéristiques physiques, qui ont une corrélation avec l'activité biologique ou biochimique des micro-organismes analysés. Voici quelques techniques appliquées :

- Mesure ATP (luminescence par consommation de l'ATP formé par les microorganismes), et
- impédancemétrie (où l'on mesure l'influence de micro-organismes sur l'impédance du milieu de culture dans lequel ils se multiplient).

Ces techniques ne relèvent pas non plus du cadre de ce syllabus.

## **2.5 Techniques alternatives utilisées lors de la réalisation des méthodes d'analyse QN et QL classiques.**

En font partie par ex. l'utilisation de l'ensemencement en spirale (pour méthodes QN), l'utilisation de l'appareil VIDAS (pour les méthodes QL). Les méthodes d'analyse visées dans ce syllabus peuvent tout autant être appliquées en utilisant ces techniques.

## **2.6 Confirmation des micro-organismes**

La confirmation des micro-organismes joue souvent un rôle dans les méthodes d'analyse microbiologiques tant QL que QN. Dans les deux types d'applications, elle aura une influence sur l'incertitude de mesure. Ce point est traité plus en détail au chapitre 4.4.7.

---

## 3 Définitions – facteurs statistiques qui jouent un rôle dans l’incertitude

### 3.1 Quelques notions générales de statistique

La science des statistiques peut être subdivisée en deux grands chapitres :

- la **statistique descriptive**, qui définit et traite des faits observables
- la **statistique analytique**, qui établit un lien entre le **calcul des probabilités** et les faits observés.

La **probabilité** peut être exprimée comme la certitude relative :

- qu’un certain fait ou phénomène se produise, et/ou
- qui exprime la **valeur de référence** de l’observation.

### 3.2 Populations

Les grandeurs observables/mesurables peuvent être regroupées en **populations**.

#### 3.2.1 Types de populations

Les populations sont composées de variables par attributs ou de variables quantitatives en fonction des caractéristiques des unités qui les composent.

- **variables par attributs**: non quantifiable (comme par ex. le goût, la qualité du vin, etc.). On peut toutefois opérer une conversion vers la quantification (échelles de notes)
- **variables quantitatives** : quantifiable (s’exprime en chiffres)

Une variable peut également être discrète ou continue

- pour une variable **discrète**, les grandeurs ne peuvent avoir qu’un nombre limité de valeurs (comme par ex. le jet de dé)
- pour une **variable continue**, les unités constitutives peuvent (dans certaines limites) prendre n’importe quelle valeur (par ex. poids d’une pomme de terre)

Les résultats des **mesures microbiologiques quantitatives** peuvent être considérés comme des variables par attributs transposés en variables discrètes avec un nombre de résultats potentiels tellement grand qu’il peut être assimilées à des variables continues.

#### 3.2.2 La distribution normale

Les grandeurs que l’on rencontre dans la nature ont tendance – en tant qu’ensemble - à être **normalement réparties**. Cette distribution s’exprime le mieux sous **forme graphique**.

Une distribution normale est une distribution qui a un certain nombre de propriétés caractéristiques :

1. la distribution est partagée de façon symétrique, il y a donc autant de mesures en dessous qu’au dessus de la moyenne.
2. la *moyenne, la médiane (la mesure centrale) et le mode (le pic le plus élevé du graphique, donc la mesure qui se rencontre le plus) coïncident*

La **distribution normale** (ou la courbe de Gauss-Laplace) est une distribution qui peut être calculée sur base du calcul théorique des probabilités. Un exemple classique est la distribution de probabilité de résultats avec plusieurs jets de dé. Si l’on considère le résultat de plusieurs jets (déjà à partir de 4) dans un graphique, on obtient le graphique tel que représenté dans la figure 1 ci-dessous.

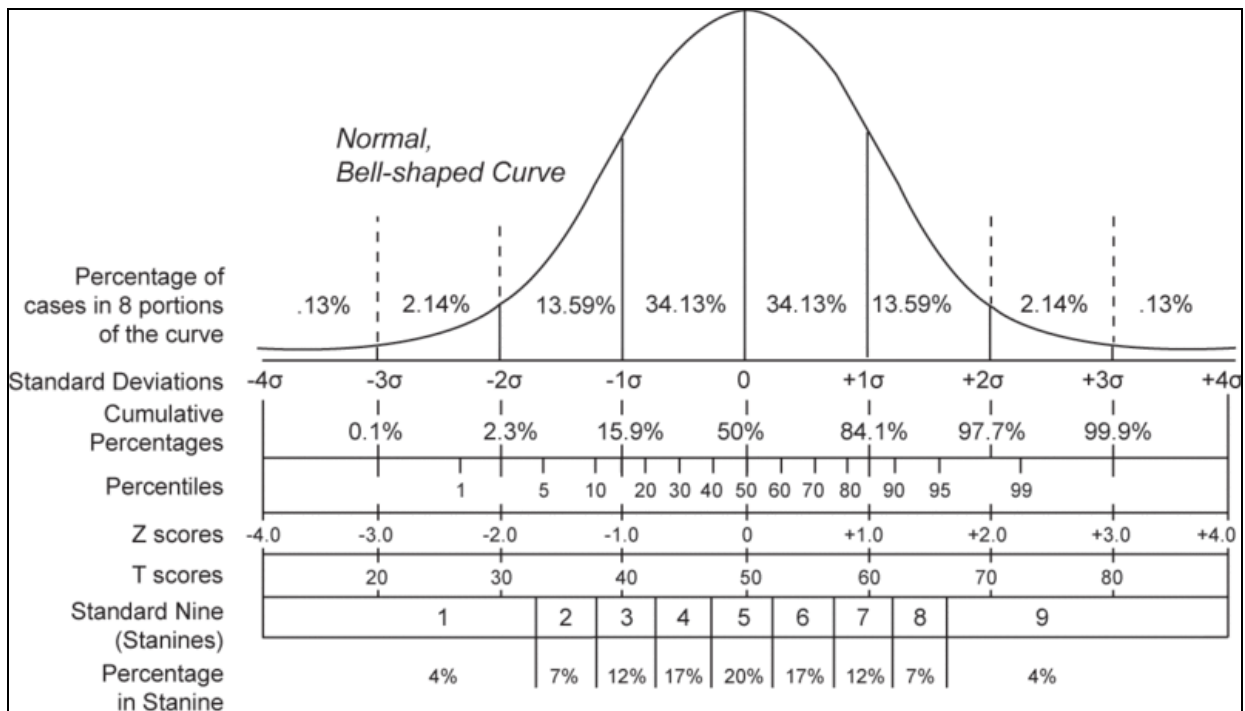


Figure 1 : Distribution normale (Courbe de Gauss) (17)

Cette figure rend également quelques autres répartitions de classe moins utilisées en relation avec la courbe de Gauss, comme les scores T et les Stanines. Cela ne relève toutefois pas de la portée du présent syllabus.

On parle également d'une part de la zone de rejet (aux extrémités de la courbe), et d'autre part de la zone de probabilité. (au centre).

La zone de rejet se situe aux extrémités de la distribution normale et suggère donc des résultats qui ne se rencontrent pas fréquemment (et qui sont donc peu probables).

La zone de probabilité est centrée au milieu de la distribution normale et concerne donc les résultats qui se rencontrent fréquemment (et qui sont donc probables).

L'incertitude est la mesure dans laquelle un résultat observé s'écarte de la valeur de référence (réelle) ou de la valeur moyenne (calculée). La valeur (moyenne) de référence n'est souvent pas connue et doit être calculée sur base de (nombreuses) observations. Le chapitre trois aborde ce point plus en détail. Quelques considérations générales préalables :

L'unité d'incertitude (également appelée dispersion) autour de la moyenne d'une distribution normale est exprimée en tant qu'écart-type (déviations standard, SD,  $\sigma$ ).

Il est calculé sur base de la variance ( $\sigma^2$ , VAR):

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum \delta^2 = \frac{1}{n} \sum (x - \mu)^2 = \frac{1}{n} \sum x^2 - \mu^2, \quad (1)$$

où  $\delta$  sont les différences entre les mesures individuelles  $x$ , et la moyenne  $\mu$ . La raison pour laquelle on calcule d'abord la variance (par les carrés des écarts), est que par calcul direct, on obtiendrait une valeur nulle. Les écarts positifs et négatifs devraient en effet s'annuler mutuellement.

L'écart-type  $\sigma$  est donc une mesure pour l'incertitude de mesure aléatoire. Il s'agit de la racine carrée de la variance.

Lorsque la distribution totale n'est pas connue mais qu'elle doit être évaluée sur base d'un test aléatoire – ce qui est toujours le cas dans la pratique pour les analyses microbiologiques – la formule de la variance est :

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum \delta^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x - \bar{x})^2 = \frac{1}{n-1} \sum x^2 - \frac{n}{n-1} \bar{x}^2, \quad (2)$$

ou encore si la moyenne n'est pas connue :

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \left( \sum x^2 - \frac{1}{n} (\sum x)^2 \right) \quad (3)$$

L'écart-type est alors appelé  $s$  et est la racine carrée de  $s^2$ .

on peut ici faire mention d'une troisième caractéristique de la distribution normale :

3. La courbe de la distribution normale montre une inclinaison des deux côtés de la moyenne  $\mu$  (ou la moyenne calculée sur base du test aléatoire) à une distance  $\sigma$  (ou  $s$ ) de celle-ci.

La figure ci-dessus est une **distribution normale « normalisée »**, c-à-d que la valeur moyenne est fixée à zéro et l'écart-type à 1 :

Le degré de l'écart des mesures individuelles (« probabilité de dépassement ») peut alors directement être exprimé proportionnellement à l'écart-type. Cela revient à la probabilité qu'une valeur mesurée présente, par pur hasard, un tel écart par rapport à la valeur (moyenne) de référence. Cela est exprimé par la **valeur Z**.

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}, \quad \text{où la moyenne de référence } (\mu) \text{ et l'écart-type } (\sigma) \text{ sont connus} \quad (4)$$

La plupart du temps, on tient compte de quelques probabilités de dépassement types importantes.

Celles-ci peuvent être exprimées de façon bilatérale (écart significatif) ou unilatérale (significativement plus grandes ou plus petites).

Le Tableau 1 ci-dessous reprend quelques valeurs souvent utilisées :

Niveau de probabilité	Valeur Z	
	bilatéral	unilatéral
95 %	1,96	1,64
95,4% *	2,00	
97,7%		2,00
99%	2,58	2,33
99,8%	3,00	
99,9%		3,00

Tableau 1 : Quelques probabilités de dépassement souvent utilisées. \*: ce niveau est retenu dans la norme ISO 19036.

### 3.2.3 Boxplot

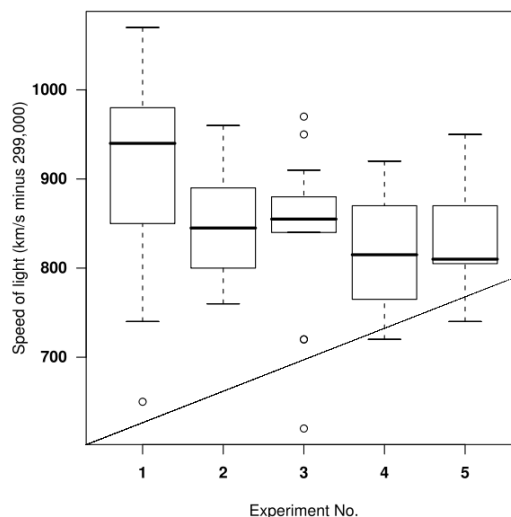
Une autre technique fréquemment utilisée pour la reproduction d'un ensemble de résultats de mesure obtenus, est le boxplot comme représenté dans la figure 2 ci-dessous.

Figure 2 : Boxplot

Sont indiqués :

- les observations aberrantes (petites boules)  
(voir 3.3.14 pour approche plus détaillée)
- la valeur inférieure (valable)
- le quartile inférieur (25%-limite)
- la médiane
- le quartile supérieur (75%-limite)
- la valeur supérieure (valable).

Voir également figure 1 pour la position relative des percentiles sur la courbe de Gauss.



## 3.3 Qu'est ce que l'incertitude

### 3.3.1 Incertitude

**L'incertitude** (« *uncertainty of measurement* ») est le degré de l'écart d'une observation de la valeur de référence.

L'incertitude est déterminée par deux sortes d'écarts : l'écart systématique et l'écart aléatoire.

L'incertitude agrégée totale détermine alors la **précision** (« *accuracy* ») d'une mesure (3, 10).

### 3.3.2 Précision

La précision est donc déterminée par les deux incertitudes mentionnées.

- l'accord (ou l'écart) **systématique** d'une mesure avec la valeur de référence est également appelé **justesse** (la mesure de conformité, « *trueness* ») ou **biais** (le degré de l'écart). C'est ce dernier terme qui est couramment utilisé pour désigner cet aspect de l'incertitude de mesure. Le biais peut être décrit comme l'écart de la moyenne des résultats d'un (grand) groupe de mesures par rapport à la valeur de référence.
- l'accord **aléatoire** (ou degré de l'écart potentiel), également appelé **fidélité** (« *precision* »). On peut également le définir comme le degré de dispersion (dispersion, « *dispersion* », « *scatter* ») des résultats individuels des mesures autour de la moyenne des mesures obtenues.

### 3.3.3 Justesse, biais

Le **biais** est difficile à définir dans le cadre de déterminations microbiologiques QN et encore plus pour les méthodes QL. On peut acheter du matériel de référence (certifié) et déterminer, sur base d'un certain nombre d'analyses, une moyenne qui soit une norme pour le biais. L'inconvénient de cette méthode est que l'on exclut un grand nombre de paramètres variables qui déterminent l'incertitude des

---

mesures microbiologiques lors d'analyses de routine. Des paramètres importants (ou leur absence) sont e.a. :

- la variation du niveau de contamination (qui influence l'incertitude des dilutions)
- la variation de la flore d'accompagnement (interférente)
- la variation de la composition de la matrice
- la préparation d'échantillon spécifique (chocolat, beurre,...)

La valeur exacte pouvant être associée au matériel de référence est de plus toujours définie de manière indirecte (par analyses inter-laboratoires ou par techniques microbiologiques comparatives), étant donné qu'il n'existe aucune méthode simple pour compter directement les micro-organismes viables.

Le biais peut également être déterminé avec un certain degré de fiabilité par des essais inter-laboratoires (contrôle de la 3<sup>ème</sup> ligne « *proficiency testing* »). Les mêmes inconvénients (manque de variation dans les paramètres qui influencent le résultat) se présentent la plupart du temps aussi pour ce mode de détermination.

On peut e.a. obtenir le matériel de référence auprès des institutions suivantes :

- VWA-CHEK ([http://www.vwa.nl/portal/page?\\_pageid=119,1639666&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL&\\_p\\_document\\_id=101846&\\_p\\_node\\_id=211840&\\_p\\_mode=BROWSE](http://www.vwa.nl/portal/page?_pageid=119,1639666&_dad=portal&_schema=PORTAL&_p_document_id=101846&_p_node_id=211840&_p_mode=BROWSE))
- PHLS ([http://www.hpa.org.uk/cfi/quality/referencematerials/reference\\_materials.htm](http://www.hpa.org.uk/cfi/quality/referencematerials/reference_materials.htm))
- EC Bureau des CRM ([http://www.irmm.jrc.be/html/reference\\_materials\\_catalogue/catalogue/RM\\_Catalogue\\_2may07.pdf](http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/RM_Catalogue_2may07.pdf))
- Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TablePage/9641467>)
- CRM de l'Institut Pasteur de Lille (Fr). Coordonnées : <http://www.pasteur-lille.fr/fr/accueil/index.htm>

Essais inter-laboratoires (quelques exemples) :

- VWA-CHEK ([http://www.vwa.nl/portal/page?\\_pageid=119,1639666&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL&\\_p\\_document\\_id=101846&\\_p\\_node\\_id=211837&\\_p\\_mode=BROWSE](http://www.vwa.nl/portal/page?_pageid=119,1639666&_dad=portal&_schema=PORTAL&_p_document_id=101846&_p_node_id=211837&_p_mode=BROWSE))
- Quality Management (<http://www.qualitymanagement.co.uk/products/schedules/2007/qms.htm>)
- FEPAS (<http://www.fapas.com/prog.cfm?currsch=fepas>)
- Schéma suédois (<http://www3.slv.se/absint/index.aspx?selected=start>)
- Smart QA (Lab M) ([http://www.labm.com/news\\_press\\_release\\_details.htm?news\\_id=7](http://www.labm.com/news_press_release_details.htm?news_id=7))
- PHLS (<http://www.hpa.org.uk/cfi/quality/eqa/default.htm>)
- KIWA (<http://www.kiwa.nl/index-W.asp?id=548>)
- Reama: <http://www.itp.asso.fr/produitstransformes/tout/interlabo.htm#microbio>

### 3.3.4 Fidélité

La fidélité ou dispersion peut être déterminée dans différentes circonstances. Au plus il y a de facteurs variables d'influence sur le résultat d'une mesure, au plus grande est la dispersion ou au moins précise la fidélité du résultat.

La plupart du temps, les conditions de détermination de la fidélité sont réparties selon les classes suivantes :

- les conditions de **répétabilité** (« *repeatability* »), où l'on s'efforce autant que possible de maintenir **identiques** les conditions de détermination ayant trait à une analyse.
- les conditions de **reproductibilité** (« *reproducibility* »), où l'on s'efforce autant que possible **de faire varier** les conditions de détermination.

On peut généralement affirmer qu'un laboratoire de microbiologie fonctionne comme un « instrument de détermination » global. C'est donc également la fidélité qui, au niveau du laboratoire en tant que tout,

---

influence l'incertitude associée à un résultat d'analyse. Cela est donc retenu comme point de départ dans la norme ISO 19036.

### **3.3.4.1 Répétabilité**

La détermination de la fidélité dans des conditions de répétabilité est, pour un laboratoire microbiologique, peu importante par rapport à la précision générale d'un résultat d'analyse.

L'incertitude quotidienne des résultats d'analyse est en effet déterminée par des conditions de reproductibilité.

Comme nous le verrons plus loin au chapitre 5 (Plan d'analyse), la détermination de la répétabilité des analyses microbiologiques ne jouera un rôle que dans la détection des causes éventuelles entraînant une dispersion (anormalement) élevée dans des conditions de reproductibilité. Cette répétabilité ne sera donc pas déterminée au niveau du laboratoire mais à un niveau inférieur (groupe de laborantins ou laborantins individuels) et – lorsque c'est possible – pour un facteur d'influence donné, tel que décrit au chapitre 5. Les gradations sont e.a. (liste non limitative !) :

- doubles analyses par le laboratoire en tant que tout
- doubles analyses par un même laborantin (ou groupe de laborantins)
- doubles analyses sur le même échantillon de laboratoire (deux sous-échantillons pour analyse)
- doubles analyses sur une même dilution initiale (le même sous-échantillon)
- déterminations de série (6 à 10) dans les conditions citées ci-dessus
- etc...

### **3.3.4.2 Reproductibilité**

Il est important de noter que la variation concerne principalement les facteurs qui ne sont pas (toujours) directement mesurables par le laboratoire, ou qui ne peuvent être contrôlés que de manière aléatoire, par ex. la qualité des milieux de culture.

Les paramètres définis dans l'instruction générale pour les analyses microbiologiques (16), ou dans les normes spécifiques doivent toujours être rigoureusement suivis et appliqués (temps, t°, techniques de mélange, techniques de refroidissement, etc...)

#### **3.3.4.2.1 Reproductibilité intra-laboratoire**

Comme stipulé précédemment, les conditions de reproductibilité reflètent la fidélité réelle des résultats d'analyse d'un laboratoire microbiologique. On tient ici compte de tous les facteurs variables (ou du plus de facteurs possible) qui influencent l'incertitude de mesure.

#### **3.3.4.2.2 Reproductibilité inter-laboratoire**

Il s'agit ici de l'incertitude de mesure associée aux résultats d'analyse obtenus lors d'essais inter-laboratoires ou d'études de validation auxquelles plusieurs laboratoires ont pris part. Cette forme de reproductibilité ne peut pas être comparée purement et simplement avec l'incertitude intra-laboratoire. Le niveau d'influence de plusieurs facteurs variables est en effet significativement différent. ex.

- la matrice est généralement une matrice idéalisée (aussi homogène que possible, le moins possible d'influences interférentes)
- la flore est souvent simplifiée (uniquement des souches bactériennes cultivées, pas de flore interférente)
- le niveau de contamination est souvent limité à une ou quelques valeurs discrètes et en concentration souvent très faible ce qui génère une grande incertitude supplémentaire.
- différents laboratoires peuvent également appliquer différentes méthodologies d'analyse qui ajoutent un facteur supplémentaire à l'incertitude de mesure.

Il est donc important que, si les résultats de tels essais inter-laboratoires sont utilisés pour exprimer l'incertitude de mesure, les échantillons de référence utilisés s'approchent le plus possible du statut de

---

matrices « naturellement » contaminées. C'est parfois l'unique moyen dont dispose un laboratoire car les matrices naturellement contaminées ne sont pas directement disponibles.

Dans la pratique, c'est la partie fidélité, déterminée au niveau intra-laboratoire dans des conditions de reproductibilité, qui est retenue comme incertitude. Le biais n'est pas retenu à cet effet. (ISO 19036, chapitre 5.2.1, 5<sup>ème</sup> alinéa)

### 3.3.5 Incertitude standard (u)

Il s'agit de l'incertitude exprimée en tant qu'écart-type(s).

### 3.3.6 Incertitude étendue (U)

Il s'agit de l'incertitude exprimée par s mais multipliée par un facteur d'expansion déterminé (k).

$$U = u.k$$

### 3.3.7 Facteur d'expansion (k)

Il s'agit d'un facteur qui détermine le degré de probabilité où se situe la valeur de référence d'une mesure. De manière standard (et également proposé dans ISO 19036), on applique le facteur 2 pour k. Cela correspond à une probabilité de dépassement (bilatérale) de 95,4% (voir tableau 1). De manière simplifiée et approximative, cela équivaut à **95%** (bilatéral).

### 3.3.8 Incertitude standard combinée (u<sub>c</sub>)

Il s'agit de l'incertitude agrégée, calculée sur base des incertitudes (connues), associée à certains facteurs. Ceux-ci sont traités plus en détail au chapitre 4.

Comme nous l'aborderons plus loin au chapitre 5 (Plan d'analyse) et comme cela a également été mentionné précédemment en 3.3.4.1 (répétabilité), cela est **peu ou pas appliqué** dans la pratique, sauf si la reproductibilité déterminée globalement aboutit à des valeurs anormalement élevées.

Il est cependant important de comprendre les principes statistiques qui contribuent à l'incertitude de mesure générale finale.

#### 3.3.8.1 Règles principales pour la détermination de l'incertitude combinée

##### 3.3.8.1.1 Règle de la somme

Il s'agit de la règle qui est couramment d'application en microbiologie. La variance composée d'une variable c est égale à la somme des variances des parties constitutives (ex. une pondération et une dilution)

$$\text{variance : } u_c^2 = u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + \dots, \text{ of,} \tag{5}$$

des variances calculées :

$$s_c^2 = s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + \dots \tag{6}$$

La racine carrée de u<sup>2</sup> donne l'incertitude combinée.

##### 3.3.8.1.2 La règle du produit

L'incertitude combinée est un produit. Moins fréquemment d'application en microbiologie.

Un exemple typique est l'incertitude composée de la dilution, la règle du produit devant être appliquée. Voir formule (9) plus loin dans le syllabus et le document de travail Excel, onglet « Dilutions ».

Vous trouverez de plus amples informations en *référence 4* de la bibliographie.

### 3.3.9 Incertitude lors de tests microbiologiques QL

Il n'existe en ce moment aucune approche statistique étayée pour la détermination de l'incertitude de mesure pour les méthodes QL. Le seul paramètre pouvant être considéré comme significatif est la **limite de détection** ("*detection capability*").

### 3.3.10 Distribution de Poisson

On a déjà mentionné au chapitre 2.2.2 que la distribution normale peut être calculée et nous y avons cité l'exemple des jets de dés. L'exemple est en fait une distribution binomiale qui dans le cas d'un grand nombre d'observations avoisine la distribution normale.

#### 3.3.10.1 Distribution binomiale

Une **distribution binomiale** est caractérisée par trois paramètres :

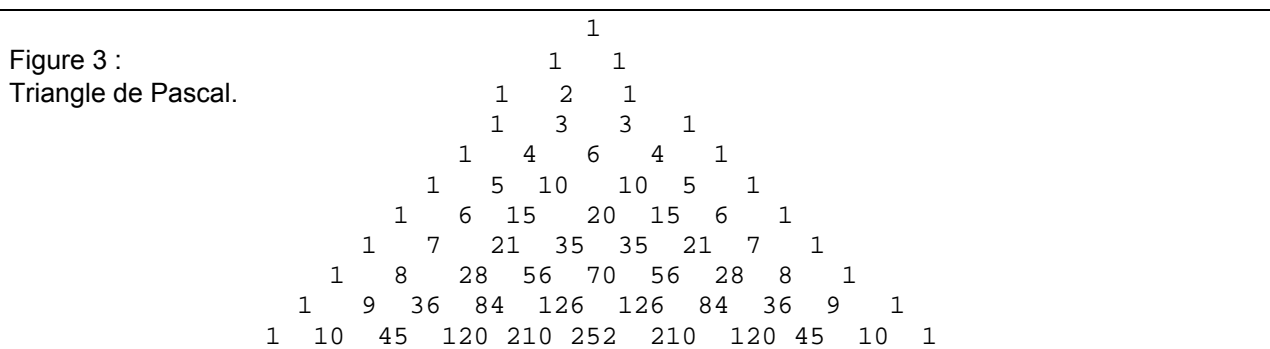
- la probabilité de succès : p
- la probabilité d'échec: q
- le nombre d'essais : n

et où  $p+q = 1$

Le développement algébrique de l'expression  $(p+q)^n$  donne la distribution binomiale avec n essais. Quelques exemples :

$$\begin{aligned}(p + q)^0 &= \mathbf{1} \\(p + q)^1 &= \mathbf{1}p + \mathbf{1}q \\(p + q)^2 &= \mathbf{1}p^2 + \mathbf{2}pq + \mathbf{1}q^2 \\(p + q)^3 &= \mathbf{1}p^3 + \mathbf{3}p^2q + \mathbf{3}pq^2 + \mathbf{1}q^3\end{aligned}$$

Ces composants peuvent également être développés dans le « triangle de Pascal », comme représenté en Figure 3. Dans ce cas particulier,  $p = q = 0,5$  (ex. tirer à pile ou face)



Ce triangle a pour particularité que chaque chiffre est la somme des deux chiffres qui se trouvent au dessus de ce dernier.

Les probabilités de se présenter se développent suivant le « binôme de Newton » et donnent une fonction qui, à partir de  $n.p > 6$  peut être calculée par approximation comme une distribution normale.

---

*NB. Attention : ces distributions sont discrètes. Il faut en réalité réaliser à cet effet une correction d'une demi unité vers le haut si on veut les présenter comme une distribution normale.*

La moyenne  $\mu$  d'une distribution binomiale est égale à  $n.p$  (également appelé  $\lambda$ )

La variance est égale à  $n.p.(1-p) = n.p.q$ . L'écart-type en est la racine carrée.

### 3.3.10.2 Distribution de Poisson

La **distribution de Poisson** est une distribution binomiale spéciale où  $p$  avoisine 0, et  $q$  avoisine 1.

Cela se produit lors de phénomènes naturels où la **probabilité de succès est beaucoup plus petite que la probabilité d'échec**.

Cette fonction s'applique par ex. au nombre de morts sur la route dans certaines circonstances, mais également à la probabilité de présence d'un certain **nombre d'ufc** dans des dilutions successives et finalement aussi dans les boîtes de Pétri avec la dilution finale, sur lesquelles les dénombrements sont effectués.

La variance est donc  $n.p.q \approx n.p.1 = n.p = \mu$  (également appelée  $\lambda$ )

L'écart-type est la racine carrée de  $\lambda$ .

Il en découle qu'au plus limitée est la quantité d'ufc dans une solution ou dans une boîte de Pétri, au plus important sera l'écart-type des résultats individuels. Cela joue surtout un rôle dans la dilution finale dans la boîte de Pétri ! La présence d'ufc est en effet beaucoup plus importante dans les dilutions précédentes.

Les figures 4 et 5 donnent quelques exemples de distributions de Poisson calculées pour diverses valeurs de  $\lambda$ , celles-ci admettant des valeurs discrètes (seules des "observations complètes" sont possibles).

Figure 4 : Distribution de Poisson calculée pour  $n.p (= \lambda)$  égal à 1, 4 et 10

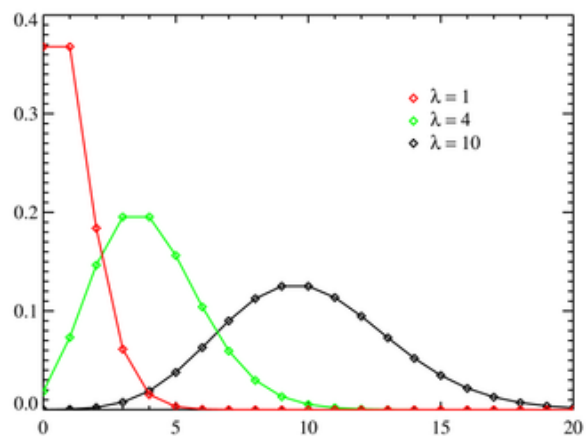
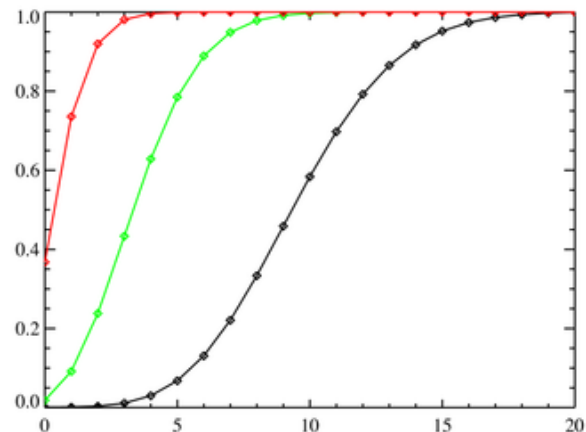


Figure 5 : Distribution cumulative de Poisson pour  $n.p (= \lambda)$  égal à 1, 4 et 10



### 3.3.11 Distribution de Poisson – relation avec la microbiologie

Comme déjà mentionné, le nombre de micro-organismes dans les solutions (séries de dilution) et dans les boîtes de Pétri, répond à la la distribution de Poisson (« *Poisson scatter* »). Cette incertitude se rencontre toujours et est indépendante de la précision de tous les autres facteurs qui définissent l'incertitude supplémentaire.

Au plus faible est la concentration en ufc, au plus important sera l'effet. C'est également la raison pour laquelle des nombres peu élevés ne peuvent pas être rapportés en tant que valeur de référence mais plutôt en tant que valeur « approximative » (nombre estimé).

Le tableau 2 est repris d'ISO 7218 :1996 et reproduit les limites de probabilité de 95% de la valeur de référence de nombres peu élevés d'ufc, calculées par la distribution de Poisson.

Number of microorganisms <sup>1)</sup>	Confidence limit at 95 % level		Percent error for the limit <sup>2)</sup>	
	Lower	Upper	Lower	Upper
1	< 1	6	- 97	+ 457
2	< 1	7	- 88	+ 261
3	< 1	9	- 79	+ 192
4	1	10	- 73	+ 156
5	2	12	- 68	+ 133
6	2	13	- 63	+ 118
7	3	14	- 60	+ 106
8	3	16	- 57	+ 97
9	4	17	- 54	+ 90
10	5	18	- 52	+ 84
11	6	20	- 50	+ 79
12	6	21	- 48	+ 75
13	7	22	- 47	+ 71
14	8	24	- 45	+ 68
15	8	25	- 44	+ 65

1) Equal to the number of colonies.  
2) Compared to the microorganism count (1<sup>st</sup> column).

Tableau 2 : limites de probabilité de 95% pour la valeur de référence de dénombrements peu élevés.

*Attention : les limites de probabilités calculées dans le tableau 2 ne correspondent pas exactement aux probabilités posées dans la figure 4. Cela provient du fait que sur les limites de probabilité de 95% fixées (de façon bilatérale), on a arrondi les valeurs au nombre discret le plus proche.*

Que l'on effectue un dénombrement dans une ou deux boîtes de Pétri n'a au fond aucune importance par rapport à l'incertitude de Poisson : les résultats peuvent être simplement comptés ensemble.

### 3.3.12 Pourquoi les dénombrements microbiologiques sont-ils distribués de façon logarithmiquement normale ?

La raison pour laquelle l'expression **logarithmique** de résultats microbiologiques suit (plutôt) une distribution normale (au moins en ce qui concerne la forme symétrique de la distribution) et non les résultats arithmétiques, est en réalité à attribuer principalement à l'effet de Poisson.

**Soit :** un résultat de dénombrement dans une boîte de Pétri égal à 100, dilution  $-2$ . Le résultat calculé est 10.000. L'expression logarithmique est 4,00. Supposons que l'écart-type (calculé sur base de la formule 8) est égal à 0,15 log. La limite de probabilité inférieure est alors log 3,85. Cela équivaut numériquement à 7079. La limite de probabilité supérieure est log 4,15, soit 14125 numériquement. Selon la distribution de Poisson, l'écart-type est la racine carrée de la moyenne. Lorsqu'on le calcule sur les deux limites de probabilité et qu'on l'exprime logarithmiquement, on s'aperçoit qu'il est réparti proportionnellement autour de cette racine carrée, avec une dispersion équivalente. Le tableau 3 ci-dessous indique cela.

$\mu$	$\log_{10}(\mu)$		<i>base log</i>	$\sigma$
10.000	4	10.000	10	0,15
	3,85	7.079	84	1,925
	4,15	14.125	119	2,075
				<b>0,15</b>

Tableau 3 : Échiquier arithmétique Excel en guise de preuve que la distribution logarithmique des résultats microbiologiques suit une distribution normale.

### 3.3.13 Différence relative critique – Écart-type relatif géométrique

La différence relative critique est la différence en valeurs doubles d'un même échantillon (dans des conditions de reproductibilité) avec une limite de probabilité de 95%. Pour un  $s$  de 0,15 log (dispersion que l'on rencontre en général en microbiologie pour les matrices homogènes : voir plus loin au chapitre 6 critères réalistes), et basé sur la distribution normale (voir Figure 1), on obtient des limites de probabilité de  $2s = 0,3$  log. Exprimées de manière arithmétique, ces limites correspondent (environ) à la moitié et au double du résultat obtenu. La détermination double de 100 ufc ne peut donc pas être inférieure à 50 ou supérieure à 200.

Cette différence relative critique est également intégrée au contrôle de qualité des nouveaux (lots de) milieux de culture, la production (« *performance ratio* », « *PR* ») d'un nouveau lot d'un milieu non sélectif ne pouvant pas être inférieure à 50% d'un milieu de référence. Voir plus loin ISO 11133-2:2003.

*NB: en principe, elle ne devrait pas non plus pouvoir être supérieure à 200% ! On part toutefois facilement du principe que ce cas ne se présente pas.*

### 3.3.14 Observations aberrantes

#### 3.3.14.1 les reprendre ou non dans les calculs ?

On ne peut en principe **pas** fournir **de réponse univoque** à cette question.

---

### **Quelques considérations :**

- il est préférable d'ôter les observations aberrantes si des contrôles de qualité démontrent qu'elles ne reflètent pas un résultat « représentatif » (juste, véritable).
- si les analyses répétées ont pour objectif de déterminer avec le plus de précision possible la valeur de référence d'une contamination microbiologique dans un échantillon (comme par ex. la valeur de référence d'un CRM, ou d'échantillons dans des essais inter-laboratoires), les observations aberrantes doivent être exclues.
- si les résultats d'analyse obtenus sont destinés à calculer la reproductibilité du laboratoire et qu'il n'y a pas de cause manifeste ou de preuve objective, par contrôle de qualité, du comportement « déviant » de certains résultats, il est indiqué de reprendre les observations aberrantes dans le calcul de l'incertitude de mesure vu que ces résultats seraient également utilisés comme rapportage de résultats de routine.
- pas de détermination itérative d'observations aberrantes (après avoir ôté d'autres observations aberrantes)

### **3.3.14.2 modes de détermination**

#### **3.3.14.2.1 Test de Dixon**

Ce test est utilisé afin de vérifier s'il y a des observations aberrantes dans une série de mesures indépendantes (donc pas de doubles). On procède comme suit :

- condition : on suppose que la distribution est normale !
  - déterminer les valeurs x les plus éloignées (le minimum et le maximum des valeurs de mesure) de la moyenne
  - déterminer la moyenne  $\mu$  et l'écart-type s des autres valeurs de mesure
  - contrôler s'il s'agit d'une observation aberrante :
1. si x est plus grand que  $(\mu + 3s)$  ou plus petit que  $(\mu - 3s)$ , la valeur est alors une observation aberrante et elle est ôtée du set de données original. Vérifiez également si le minimum ou le maximum des données restantes sont des observations aberrantes.
  2. si x est plus petit que  $(\mu + 3s)$  ou plus grand que  $(\mu - 3s)$ , la valeur n'est alors pas une observation aberrante et aucune donnée n'est ôtée du set de données original.

#### **3.3.14.2.2 Test de Grubb**

Ce test part de toutes les données et est réalisé en calculant la valeur Z (voir précédemment dans la distribution normale normalisée) de l'observation aberrante supposée. Si pour un nombre de mesures donné (N), la valeur Z calculée d'un résultat suspect est supérieure à la valeur indiquée dans le Tableau 4, il est alors probable à plus de 95% (test unilatéral) qu'il s'agisse bel et bien d'une observation aberrante.

N	Critical Z	N	Critical Z
3	1.15	27	2.86
4	1.48	28	2.88
5	1.71	29	2.89
6	1.89	30	2.91
7	2.02	31	2.92
8	2.13	32	2.94
9	2.21	33	2.95
10	2.29	34	2.97
11	2.34	35	2.98
12	2.41	36	2.99
13	2.46	37	3.00
14	2.51	38	3.01

15	2.55	39	3.03
16	2.59	40	3.04
17	2.62	50	3.13
18	2.65	60	3.20
19	2.68	70	3.26
20	2.71	80	3.31
21	2.73	90	3.35
22	2.76	100	3.38
23	2.78	110	3.42
24	2.80	120	3.44
25	2.82	130	3.47
26	2.84	140	3.49

Tableau 4 : valeurs limites de Z pour probabilité 95 (unilatérale) d'observation aberrante dans N mesures (17).

### 3.3.15 Application de tests statistiques :

#### 3.3.15.1 Test $X^2$

Le **test  $X^2$**  est utilisé pour vérifier si une distribution obtenue de façon aléatoire correspond bien aux valeurs auxquelles on s'attend en théorie. La distribution théorique peut prendre différentes formes (distribution normale, binomiale,...)

Le principe du test  $X^2$  repose sur le calcul de probabilité que les fréquences de résultat obtenues (divisées en un nombre pertinent de classes) s'écartent des fréquences auxquelles on s'attend en théorie

$$X^2 = \sum_{i=1}^6 \frac{(N_i - e_i)^2}{e_i}$$

(quel que soit le type de distribution attendu) :

(7)

En principe, les résultats d'analyse microbiologiques sont distribués normalement. Ce test n'est donc en principe pas appliqué pour évaluer l'incertitude de certaines techniques d'analyse microbiologiques mais peut tout de même être utilisé si les résultats laissent supposer un écart par rapport à cette forme de distribution. Il n'est pas non plus possible d'appliquer ce test à des échantillons doubles appariés (comme proposé dans la norme ISO 19036).

La **distribution  $X^2$**  qui dépend du nombre de degrés de liberté (il s'agit du nombre de paramètres indépendants) n'est elle-même pas distribuée normalement. On procède à un test unilatéral (du côté supérieur de la courbe). Pour les tableaux on renvoie aux ouvrages de référence en statistiques (comme le cours Waarschijnlijkheidsberekening en statistiek de la VUB (12)). La formule peut être appliquée dans Excel (CHITEST).

#### 3.3.15.2 Test F (Test de Fisher)

Lorsqu'on part du principe que les résultats d'une certaine technique d'analyse microbiologique se comportent comme une distribution normale, il peut être utile de vérifier si les écarts-types de par ex. deux groupes de résultats d'analyse, obtenus par deux techniques d'analyse différentes, diffèrent de manière significative. On ne peut pour cela réaliser aucune analyse appariée (nous abordons cela plus loin dans la « global approach » au chapitre 4).

On peut toutefois appliquer cette technique à des analyses répétées sur le même échantillon, par deux méthodes de test différentes (de préférence dans des conditions de reproductibilité au laboratoire).

La **distribution F** est obtenue en calculant le rapport des variances des deux distributions (avec  $n_1$  et  $n_2$  résultats). La distribution n'est même pas répartie normalement et est déterminée par les deux degrés de liberté des deux distributions ( $n_1-1$  et  $n_2-1$ ). Les tableaux se trouvent dans la littérature et également

en tant que fonction standard dans Excel (FTEST). La plupart du temps, on procède à un test unilatéral au niveau 95% (grandes valeurs F). Un exemple a été développé dans le document de travail Excel, onglet Tests non appariés.

### 3.3.15.3 Test T (Test T de Student)

Si le Test F a démontré qu'il n'y a pas de différence significative entre les variances de deux distributions de résultats, on peut alors appliquer le **test T** afin de voir si les moyennes de ces deux distributions ne diffèrent pas de manière significative.

La **distribution T** est une distribution normale « aplatie » où l'on ne connaît pas les valeurs réelles des moyennes ni la dispersion de la distribution mais celles-ci doivent être calculées de manière approximative sur base des résultats trouvés. Cela entraîne une incertitude supplémentaire (l'aplatissement)

Le test T peut être appliqué de trois manières différentes :

- tester une mesure par rapport à une série d'autres mesures (est tout à fait analogue au test Z de la distribution normale et sera beaucoup plus appliqué dans la pratique vu que les valeurs réelles de  $\mu$  et  $\sigma$  ne sont pas connues)
- tester deux séries de tests non appariés (ex. comparaison de 10 mesures du même CRM avec deux méthodes différentes) (voir exemple dans le document de travail Excel, onglet Tests non appariés),
- tester deux séries de mesures appariées. On peut prendre en guise d'exemple les résultats obtenus tels que décrits dans le tableau 1 d'ISO 19036 et reproduits dans le tableau 5 ci-dessous. Le test T démontre que les résultats appartiennent à la même distribution. Voir également exemple dans le document de travail Excel, onglet Tests appariés. Une comparaison des variances individuelles n'est ici pas possible.

La formule de calcul de l'écart-type développée dans le tableau 5 est :

$$s_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

(8)

xiA	xiB	xiA-xiB	(xiA-xiB) <sup>2</sup> ./2	
4,83	4,94	-0,11	0,00605	<b>Uniquement pour comparaison de deux méthodes de test:</b>
6,85	6,79	0,06	0,0018	
5,54	5,64	-0,1	0,005	
7	6,63	0,37	0,06845	<b>Test T: tests appariés, testé bilatéralement</b>
7,28	7,23	0,05	0,00125	
5,36	5,18	0,18	0,0162	
8,72	8,61	0,11	0,00605	<b>43,76%</b>
4	4,08	-0,08	0,0032	
4,48	4,11	0,37	0,06845	→ <b>Probabilité que les moyennes ne diffèrent pas de manière significative</b>
8,04	8,34	-0,3	0,045	
			somme((xiA-xiB) <sup>2</sup> /2)	
			0,22145	
			somme((xiA-xiB) <sup>2</sup> /2)/10	
			0,022145	
			<b>racine(somme((xiA-xiB)<sup>2</sup>/2)/10)</b>	
			<b>0,15</b>	

Tableau 5 : exemple de détermination d'incertitude de mesure avec mesures appariées sur les mêmes échantillons dans des conditions de reproductibilité et test T pour déterminer si les valeurs appartiennent à la même distribution.

Ici aussi il peut être fait référence à la littérature (12) pour les tableaux avec des valeurs T. Les formules sont disponibles dans Excel (TTEST).

### 3.3.15.4 autres tests statistiques

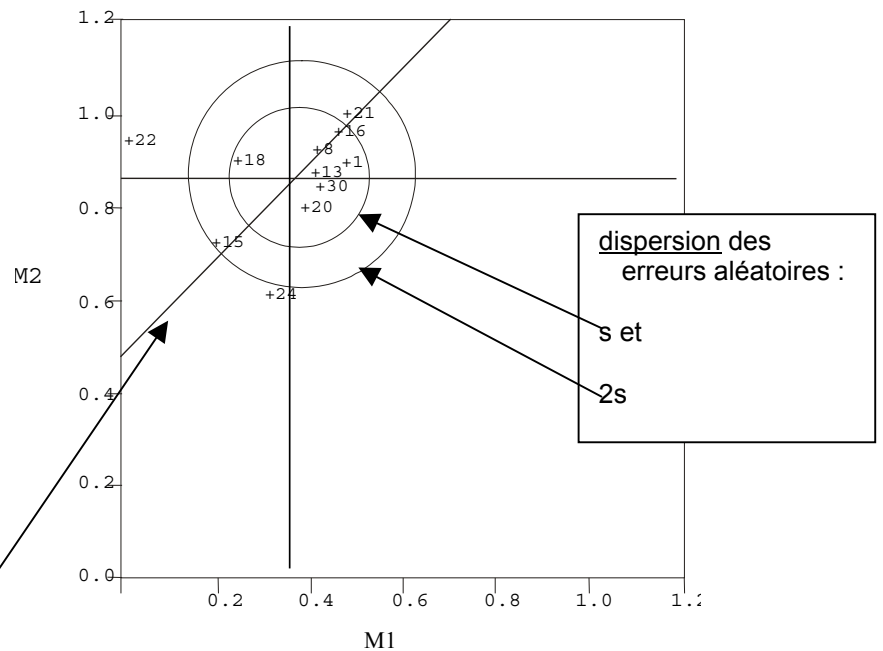
#### 3.3.15.4.1 Youden-plot

Figure 6 : Exemple d'un Youden-plot

Le Youden-plot reflète des résultats typiques des résultats de **deux échantillons indépendants** analysés par plusieurs laboratoires lors d'essais inter-laboratoires.

Si seules des erreurs aléatoires jouent un rôle, la dispersion de la différence entre les deux résultats sera également aléatoire et les résultats seront distribués de manière égale autour du point central (intersection des deux valeurs moyennes).

Si un labo présente un biais, son résultat combiné se situera le long de la bissectrice.



De plus amples informations peuvent être consultées dans la littérature et e.a. également dans un document explicatif de KIWA (15).

---

## 4 Facteurs statistiques qui jouent un rôle dans les analyses microbiologiques

Le classement des facteurs retenus dans ce chapitre se base principalement sur les facteurs décrits dans les références 2 et 4. L'estimation de l'importance des facteurs individuels coïncide avec l'estimation telle que décrite dans ISO 19036. Ils sont subdivisés en quatre plus grands groupes :

- lié à l'environnement (voir chapitre 4.2),
- lié à l'échantillon (matrice) (voir 4.3),
- lié à la manipulation (voir 4.4), et
- autres (voir 4.5)

Ces groupes sont également représentés dans les figures 7 et 8 (à la fin du syllabus) pour indiquer visuellement à quel niveau ces facteurs jouent un rôle significatif.

### 4.1 Considérations générales et préalables

La plupart des facteurs qui co-déterminent l'incertitude entraînent généralement une diminution du dénombrement ou une augmentation de la limite de détection. Certains paramètres peuvent cependant avoir un effet inverse (mauvais entreposage des échantillons, sélectivité insuffisante due à des conditions d'incubation mal appliquées comme par ex. une température trop basse, des techniques de confirmation erronées, etc...). On peut affirmer de manière générale que le risque d'un dénombrement trop faible ou d'une détermination négative erronée est plus grand que le risque d'un dénombrement trop élevé ou d'une détermination positive erronée.

Pour beaucoup de paramètres qui co-déterminent l'incertitude, on ne peut (de manière simple) estimer correctement ni même approximativement leur contribution dans le cadre de la détermination de l'incertitude de mesure.

Vu les influences très complexes sur l'incertitude de mesure (voir plus loin au chapitre 4), on opte en règle générale (comme stipulé dans ISO 19036) pour une **approche globale** (« *global approach* »). Cela signifie qu'il n'y a pas de breakdown pratique des composants potentiels pour en déterminer l'influence individuelle sur l'incertitude. La détermination se fait en une fois en calculant l'incertitude de mesure globale. Les auteurs/chercheurs ne sont pas tous d'accord avec cela. En référence 4 de la bibliographie (publiée par le Centre de Métrologie et d'Accréditation, Finlande) on préfère analyser les éléments individuels d'incertitude et ensuite déterminer l'incertitude générale par combinaison (voir plus loin au point 4.6). Attention : cela n'est possible que pour certains facteurs d'influence dont l'incertitude est facilement mesurable ou calculable (individuellement) et non pour la totalité de tous les facteurs ensemble. Nous faisons également référence à la discussion suivante sur les différents facteurs individuels.

Dans la discussion suivante sur les facteurs individuels qui entraînent une incertitude de mesure, on mentionne systématiquement s'ils sont mesurables (et dans quelle mesure) et s'ils contribuent de manière importante à l'incertitude totale. Les figures 8 et 9 donnent un exemple général du trajet pour les analyses microbiologiques QN et QL. On y indique également à quel niveau les groupes de facteurs décrits ci-dessous qui occasionnent l'incertitude ont/peuvent avoir une influence significative.

Au demeurant, les **directives générales** (ISO 7218) ou **spécifiques** (dans les normes d'analyse en la matière dont les normes de la série ISO 6887) pour l'application de techniques d'analyse microbiologiques doivent être rigoureusement suivies afin d'éliminer autant que possible l'influence de **tous** les facteurs qui agissent sur l'incertitude (tant les mesurables que les autres).

L'objectif principal de la détermination de l'incertitude de mesure est de démontrer dans quelles limites de probabilité se situe le résultat réel d'une analyse laboratoire. Un laboratoire doit continuellement s'efforcer – avec l'infrastructure, l'appareillage, le matériel, les réactifs, les milieux de culture, le

---

personnel et les techniques de test qui sont à sa disposition – de garder ces limites aussi étroites que possible.

Il faut indiquer que les facteurs d'influence qui se situent dans le laboratoire avant l'échantillonnage du sous-échantillon (mais à l'exception des caractéristiques intrinsèques de la matrice à analyser) ne sont pas systématiquement repris dans les protocoles d'essai pour la détermination de l'incertitude de mesure (2, voir figure 3). L'hétérogénéité de la qualité bactériologique, par ex. au travers d'un lot, et l'influence de la technique d'échantillonnage statistique de ce lot, ne jouent donc ici aucun rôle.

Comme déjà stipulé précédemment et comme nous le répétons plus loin dans ce chapitre, on peut déjà affirmer – en ce qui concerne la détermination de l'incertitude de mesure des analyses microbiologiques quantitatives – qu'il est pratiquement impossible de mesurer séparément tous les facteurs d'influence et de déterminer une incertitude de mesure commune calculée. Il faut clairement préférer l'approche, telle que présentée dans ISO 19036 (« *global approach* »).

L'analyse suivante de facteurs d'influence est (principalement) basée sur des analyses QN.

Le chapitre 4.4.2 aborde encore quelques facteurs importants pour les méthodes QL mais cela ne relève pas de la portée du présent syllabus.

## **4.2 Facteurs liés à l'environnement**

### **4.2.1 Conditions d'entreposage (en partie préalables aux activités de laboratoire)**

De mauvaises conditions d'entreposage peuvent occasionner aussi bien un dénombrement plus faible qu'un dénombrement plus élevé. Il est de notoriété publique que la congélation, l'entreposage dans des conditions de surgélation et la décongélation détruisent, dans une certaine mesure et avec effet variable, différents types de germes.

*Effet sur l'incertitude : très difficile à estimer individuellement → global approach.*

### **4.2.2 Milieux de culture et réactifs**

La composition et la qualité jouent un rôle crucial dans la performance, la sélectivité, l'électivité, la spécificité et la robustesse en général des différentes sortes de milieux de culture et réactifs. Pour des définitions plus détaillées, nous renvoyons à ISO 11133-2 (9).

La robustesse (*robustness, ruggedness*) (18) d'une technique d'analyse est la mesure dans laquelle (la précision du résultat de) la méthode de test en question est influencée par de "petites" variations de la technique. Quelques exemples : la qualité des réactifs, le pH des réactifs, les effets de matrice sur les milieux de culture, etc. C'est donc une définition générale qui ne s'avère pas facile à mettre à l'essai et qui ne peut pas non plus s'exprimer en grandeurs claires. Il est néanmoins vivement indiqué que la robustesse d'une technique d'analyse soit aussi grande que possible.

*Effet sur l'incertitude : très difficile à estimer individuellement → global approach.*

*Le contrôle de la qualité joue ici un grand rôle (voir e.a. précédemment au point 3.3.13 et différentes techniques de contrôle de la qualité comme e.a. l'écométrie, la détermination de l'indice de croissance relatif et autres applications comme décrites dans ISO 11133-2) (9)*

### **4.2.3 Appareillage et matériel**

Quelques règles générales importantes.

- Utiliser autant que possible un appareillage et du matériel dont la gamme d'utilisation se situe le plus près possible des limites maximales. Des pipettes, distributeurs, ballons gradués, aussi

- 
- petits que possible etc... Des balances, diluteurs automatiques aussi sensibles que possible, etc...
- Étalonner le plus possible
  - Toujours suivre les prescriptions d'utilisation (surtout t°, temps, etc...) (ISO 7218 !)

*Effet sur l'incertitude : très difficile à estimer individuellement → global approach.*

## **4.2.4 Lié à l'analyse**

### **4.2.4.1 Méthode d'analyse**

Il s'agit ici de l'ensemble de tous les paramètres (t°, temps, composition des milieux de culture, etc...). En fait, les mêmes critères que pour les milieux de culture considérés individuellement (performance, sélectivité, électivité, spécificité et robustesse en général) jouent ici aussi un rôle.

Il peut y avoir une interaction entre d'une part la méthode d'analyse et d'autres paramètres d'incertitude, par ex.

- le niveau de contamination
- les effets de matrice (interaction avec les milieux de culture et les réactifs)
- la flore bactérienne interférente

En outre, la méthode d'analyse a également une influence sur le choix et l'exécution d'une multitude d'autres parties de test qui influencent à leur tour l'incertitude de mesure :

- dilutions (nombre)
- niveau de dénombrement (pour analyses microbiologiques QN), qui dépend à son tour de la nature du milieu de dénombrement
- lecture (dénombrement)
- interprétation : robustesse des caractéristiques interprétatives pour l'électivité et la spécificité
- confirmer : d'une grande influence sur la précision en raison :
  - de nombres peu élevés (influence de Poisson !)
  - de la stabilité et de la reproductibilité des tests de réaction.

De telles interactions influencent fortement la robustesse et donc aussi l'incertitude de mesure de la méthode de test.

Les facteurs d'influence liés à la nature de la méthodologie d'analyse (non au choix !) ne relèvent pas de la compétence du laboratoire.

On sait finalement que la performance de certaines méthodes (mêmes officielles) n'est pas équivalente à celle d'autres méthodes.

*Effet sur l'incertitude : très difficile à estimer individuellement par le laboratoire même → global approach.*

*Les laboratoires peuvent toutefois faire une comparaison entre différentes sortes de techniques QL et QN. Nous faisons référence à l'exemple cité précédemment au point 3.3.15.3 (test T) dans le tableau 5. Deux méthodes d'analyse différentes peuvent être utilisées. Les méthodes de test QL peuvent également être comparées entre elles. Pour plus de détails, on fait référence au point 5.4.*

## **4.3 Facteurs liés à l'échantillon (matrice)**

### **4.3.1 Préalablement aux activités de laboratoire**

Comme stipulé précédemment, ces facteurs ne relèvent pas du cadre du présent syllabus.

*Plusieurs facteurs ont toutefois une influence significative sur la représentativité (des résultats d'analyse) d'un échantillon par rapport au lot ou au processus de production contrôlé :*

- 
- mode de production
  - lot – composition du lot
  - échantillonnage du lot
  - traitement de l'échantillon
  - transport vers le laboratoire

*Effet sur l'incertitude de l'analyse : très difficile voire impossible à estimer individuellement par le laboratoire même.*

### 4.3.2 Matrice

Les facettes (connues) suivantes co-déterminent l'effet de matrice sur l'incertitude des méthodes d'analyse microbiologiques :

- effets de matrice intrinsèques (inhibition, influence du milieu de culture,...)
- homogénéité
- représentativité des parties (importante lorsque l'on prélève l'échantillon d'analyse)
- flore d'accompagnement / interférente (qualitatif et quantitatif)

*Effet sur l'incertitude : très difficile à estimer individuellement par le laboratoire même → global approach. Les effets de différentes matrices doivent toutefois être déterminés au sein de cette global approach par le biais d'un protocole approprié (voir plus loin au chapitre 5.1).*

## 4.4 Facteurs liés à la manipulation (laborantin)

### 4.4.1 Échantillonner (représentativité de la prise d'essai)

Influence très changeante. La plupart du temps pas tellement important. D'une très grande influence sur l'incertitude de mesure pour certains types de matrices. Parfois très complexe. Influence parfois fortement en corrélation avec l'analyte (type ou groupe de bactérie) que l'on veut déterminer (ex. nombre de germes total dans les denrées fermentées,...).

La préparation spécifique de l'échantillon peut également jouer un rôle très significatif (chocolat, beurre, etc...)

Les laborantins doivent suivre des règles strictes (ISO 7218, ISO 6887).

*Effet sur l'incertitude : difficile à estimer individuellement par le laboratoire même → global approach. L'effet éventuel jouera un rôle dans les groupes de matrices où ces caractéristiques sont présentes (voir plus loin au chapitre 5.1).*

### 4.4.2 Peser

Influence très faible dans des conditions normales.

*Effet sur l'incertitude : **facile** à estimer individuellement par le laboratoire même → peut donc être examiné individuellement (répétabilité des conditions, au besoin pour les laborantins individuels) si l'incertitude globale est « anormalement élevée ».*

### 4.4.3 Diluer (QN)

Son importance augmente à mesure qu'il faut procéder à plusieurs dilutions pour arriver à des dénombrements quantifiables.

Chiffres « normaux » d'écart-type lors de dilutions (sans biais) (*propres constatations*) :

- pipettes jetables 1 ml – volume de pipette utilisé 1 ml : 3%
- pipettes jetables 1 ml – volume de pipette utilisé 0,1 ml : 8%
- tubes de dilution 9 ml avant autoclave : 1%
- tubes de dilution 9 ml après autoclave : 3 %

NB: L'incertitude des dilutions est calculée statistiquement comme la variance relative (RSD<sup>2</sup>, w<sup>2</sup>):

$$w_f^2 = \frac{1}{(a+b)^2} \left[ \frac{a^2 u_b^2 + b^2 u_a^2}{a^2} \right] = \frac{b^2}{(a+b)^2} (w_b^2 + w_a^2) \quad (4) \quad (9)$$

- Où :
- a = volume transféré
  - b = volume du tube servant à réaliser la dilution
  - w<sub>a</sub> = incertitude type relative de a
  - w<sub>b</sub> = incertitude type relative de b
  - u<sub>a</sub> = incertitude type de a
  - u<sub>b</sub> = incertitude type de b

Le tableau 6 en développe un exemple :

a	1	ml	b <sup>2</sup>	81	Pour <b>X</b> dilutions:	
b	9	ml	(a+b) <sup>2</sup>	100		
w <sub>a</sub>	3,0%		w <sub>b</sub> <sup>2</sup>	0,0009		X <b>4</b>
w <sub>b</sub>	3,0%		w <sub>a</sub> <sup>2</sup>	0,0009		w <sup>2</sup> <b>0,005832</b>
u <sub>a</sub>	0,03	ml	(w <sub>b</sub> <sup>2</sup> +w <sub>a</sub> <sup>2</sup> )	0,0018		w <b>0,07637</b>
u <sub>b</sub>	0,27	ml	w <sup>2</sup>	0,001458		w (%) <b>7,6 %</b>
			w	<b>0,03818</b>		
			s	<b>0,38 ml</b>		
			w (%)	<b>3,8 %</b>		

Tableau 6 : incertitude de mesure relative en rapport avec les dilutions.

w<sub>a</sub> et w<sub>b</sub> sont faciles à déterminer de manière expérimentale. Utiliser de préférence des méthodes non-microbiologiques (ex. pesée) : quantification beaucoup plus précise. w<sub>b</sub> est en réalité en elle-même aussi un facteur d'incertitude composé (pipette de dosage et influence de la préparation dans l'autoclave).

L'incertitude de mesure composée doit être calculée par application de la **règle du produit** (voir 3.3.8.1.2)

La dispersion relative pour quatre dilutions, dans l'exemple du tableau 6, correspond plus ou moins à l'écart-type de Poisson d'une concentration moyenne d'ufc dans une boîte de Pétri : 165 colonies (= (300+30)/2), écart-type 12,84 ufc et écart-type relatif (RSD) 7,78 %.

*Effet sur l'incertitude : **facile** à estimer individuellement par le laboratoire même → peut être examiné individuellement (répétabilité des conditions, au besoin pour les laborantins individuels) si l'incertitude globale est « anormalement élevée ».*

#### 4.4.4 Ensemencer

Comme déjà mentionné en 3.3.11, il y a une forte relation entre d'une part le nombre d'ufc dans une boîte de Pétri et l'incertitude qui y est associée suite à la distribution de Poisson.

L'erreur d'incertitude complémentaire de la dilution finale lors de l'ensemencement peut facilement être calculée sur base de celle calculée pour l'erreur de pipette, comme décrit en 4.4.3. La règle de la somme pour l'incertitude combinée est d'application pour l'ensemencement dans plusieurs boîtes de Pétri.

La règle du produit s'applique à l'incertitude cumulée de la dilution et de l'ensemencement (en dehors de l'effet de Poisson).

Lorsque l'on compare :

- d'une part un facteur d'incertitude « normal » qui se manifeste par quatre dilutions (voir Tableau 6), dont les troisième et quatrième sont utilisées pour le dénombrement (voir figure 8 à l'arrière du syllabus) et
- d'autre part le facteur d'incertitude par dispersion de Poisson,

on voit qu'à partir d'un dénombrement d'ufc inférieur à 175, l'influence de la dispersion est déjà plus grande que celle due aux dilutions. En effet, de la règle que la dispersion d'ufc pour  $\mu = 175$  est égale à la racine carrée (13,23), il découle un écart-type relatif ( $w$ ) de 7,6%

Comme déjà stipulé en 3.3.11, le dénombrement double a pour effet que la dispersion de Poisson diminue (avec un facteur 1,41, à savoir la racine carrée de 2), mais que l'erreur de dénombrement augmente (suivant la règle de la somme).

#### 4.4.5 Lire

La formule générale pour le calcul du nombre d'ufc lors de la lecture pour techniques QN, (comme présentée dans ISO (10)

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d} \quad 7218) \text{ est :}$$

- Où :
- deux dilutions sont reprises dans le calcul ( $n_1 = n_2 = 2$ )
  - $c$  représente les dénombrements individuels dans toutes les boîtes de Pétri
  - $v$  le volume qui est pipeté dans chaque boîte de Pétri (on suppose le même volume pour chaque boîte)
  - $n_1$  le nombre de boîtes comptées dans la première dilution
  - $n_2$  le nombre de boîtes comptées dans la deuxième dilution
  - $d$  est le facteur de dilution arithmétique (jusqu'à la première dilution (la plus faible) qui est incluse)

Le tableau 7 reprend une illustration de cela et l'influence de la réalisation d'un dénombrement double ou non et/ou du fait de reprendre deux dilutions successives dans le dénombrement.

Dilution	Boîtes		somme	d	n1	n2	r	N
	1	2						
3	156	174	371	3	2	2	0,1	<b>1,7E+06</b>
4	18	23						
<b>w (Poisson)</b>								
<b>5,2%</b>								

Tableau 7 : effet de dénombrement simple et double et d'une ou deux dilutions successives sur le résultat de dénombrement et la dispersion de Poisson qui l'influence.

---

Effet sur l'incertitude : **facile** à estimer individuellement : c'est un calcul théorique.

#### 4.4.6 Dénombrer et interpréter (incertitude de comptage)

L'incertitude de comptage est normalement faible mais peut, dans certains cas, tout de même avoir une influence, e.a. de par :

- des nombres élevés de germes, ce qui rend moins claires des caractéristiques éventuellement déterminantes pour l'interprétation, et/ou qui entraîne des chevauchements (et donc un sous-dénombrement)
- le non respect des temps prescrits
- les effets de matrice (contrôle dénombrement sans incubation)

Effet sur l'incertitude : **assez facile** à estimer individuellement pour la partie responsabilité du/des laborantin(s), mais pas pour les perturbations intrinsèques (ex. chevauchement). Tant au niveau du laboratoire que pour les laborantins individuels. A déterminer dans des conditions de reproductibilité (pas d'effet mémoire). Des chiffres peuvent être complétés et calculés dans le Tableau 5, chapitre 3.3.15.3.

#### 4.4.7 Confirmer

La confirmation (dans un dénombrement par boîtes uniques ou multiples) ajoute quelques facteurs d'incertitude à ceux qui existent déjà :

- erreurs de classification de par des caractéristiques insuffisamment claires (électivité, spécificité) qui doivent être lues et de par la variation biologique des germes. Souvent influencée par d'autres facteurs d'incertitude (matrice, concentration,...)
- un deuxième facteur très important est l'effet qui joue un rôle de par la distribution binomiale du test aléatoire (voir 3.3.10.1 et 3.3.10.2 : effet de Poisson). De la sorte – lors de tests de confirmation sur cinq colonies – dans le cas d'une valeur de référence de 10% de germes positifs, il y aura une imprécision relative de 13% avec 59% de probabilité qu'aucune colonie suspecte ne soit confirmée. Dans le cas de 50% positifs, ces valeurs s'élèvent respectivement à 22% et 3%.

Le tableau 8 illustre cela.

Nombre de confirmations	% de vrais positifs	Chance de tout "négatif"	Imprécision relative
5	10	59%	13%

Tableau 8 : exemple d'incertitude lors de tests de confirmation.

#### 4.4.8 calculer

Il ne devrait normalement y avoir aucune erreur ici. L'incertitude est de 0 par défaut.

### 4.5 Facteurs résiduels :

Quelques facteurs importants (associés partiellement ou non à d'autres facteurs susmentionnés)

- préparation de milieux de culture, réactifs,...
- facteurs présents de façon aléatoire dans l'échantillon (ex. substances inhibitrices)

- tous les autres facteurs (comme par ex. la bonne manière pour manipuler l'autoclave, pour entreposer les réactifs, pour utiliser les réactifs périmés, etc...)

Effet sur l'incertitude : très difficile à estimer individuellement par le laboratoire même → global approach.

## 4.6 En résumé

La **plupart** des facteurs d'influence ne sont **pas mesurables ou le sont insuffisamment** :

- trop complexes,
- trop variables,
- pas de protocole approprié,
- etc...

Certains facteurs sont valables **par définition** :

- l'influence de Poisson

Les facteurs qui sont **mesurables** (au niveau du laboratoire, ou bien pour les laborantins et dans des conditions de reproductibilité ou de répétabilité) sont les suivants :

- incertitude de pesée (4.4.2) ( influence négligeable)
- incertitude de dilution (4.4.3) ( $W_{dilution}$ )
- incertitude d'ensemencement (4.4.4) ( $W_{pipetting}$ )
- incertitude de lecture (y compris dispersion de Poisson) (4.4.5) ( $W_{reading}$ )
- incertitude de comptage (4.4.6) ( $W_{count}$ )
- incertitude de confirmation (4.4.7) ( $W_{confirmation}$ )

Certains de ces paramètres peuvent être comparés à des données connues de la littérature (4).

L'incertitude de mesure totale sera alors une incertitude combinée de nombreux facteurs inconnus et des facteurs mesurables cités ci-dessus. La **règle de la somme** est d'application. Un exemple est donné dans le Tableau 9.

				Comptage sur 4 boîtes, 4 <sup>ième</sup> dilution	
				Comptage total (colonies)	
				370	
	<b>Estimé selon</b>				
W (dilution)	4.4.3	7,60%	0,005776		
W (pipetting)	4.4.4	5,00%	0,0025		
W (reading)	4.4.5	5,20%	0,002702703		
W (count)	4.4.6	2,00%	0,0004		
W (confirmation)	4.4.7	22,00%	0,0484		
			0,059778703	<b>24,45%</b>	
				<b>Imprécision (log)</b>	
				<b>(par combinaison)</b>	<b>0,12</b>

Tableau 9 : Exemple de développement de l'incertitude composée, exclusivement basé sur des facteurs d'incertitude mesurables.

---

## 4.7 A propos du biais

Bien que le biais soit difficile à déterminer au laboratoire (voir 2.3.3), il est tout de même possible de déterminer (théoriquement) un biais de façon approximative. Le résultat d'un dénombrement peut alors être multiplié par certains **facteurs de correction** (« k ») pour donner une valeur plus exacte.

La question est toutefois de savoir si ces facteurs de correction sont toujours connus et le cas échéant, s'ils peuvent être correctement appliqués et s'ils le seront effectivement. En voici quelques exemples (déjà donnés précédemment) :

- matrice
- productivité des différents milieux de culture
- connaissance insuffisante pour la lecture (ne devrait pas être permis)
- mauvaise technique avec spatule de Drigalski

On a une idée générale des facteurs de correction suivants :

- chevauchement : on pourrait éventuellement appliquer un facteur de correction pour cela (voir Tableau 10) (4)

Coverage %	$K_L$
5	1.02
10	1.04
15	1.06
20	1.08
25	1.11
30	1.14
35	1.18
40	1.24

Tableau 10 : sous-estimation en rapport avec la proportion de couverture de la boîte de Pétri après incubation

**En général, ce facteur de correction n'est pas appliqué en microbiologie.**

---

## 5 Points d'attention et exemples lors de la rédaction d'un plan d'analyse pour la détermination de l'incertitude de mesure

**Remarque préalable :** la procédure telle que décrite dans ISO 19036 (associé aux déterminations doubles sur les échantillons de routine) doit être le premier choix pour rassembler des données pour le calcul de l'incertitude. Cela vaut principalement pour la validation dans le laboratoire de la maîtrise de nouvelles méthodes de test.

Lorsque cela est difficilement réalisable en raison des conditions (ex. aucun échantillon disponible), d'autres conditions, telles qu'abordées dans les chapitres suivants, peuvent offrir une alternative valable.

Lorsque l'on a obtenu des valeurs réalistes antérieures pour la mesure d'incertitude, celles-ci peuvent être conservées.

Finalement, on peut également indiquer que différentes techniques d'analyse (QN) peuvent aussi être comparées avec le même plan d'analyse pour échantillons de routine doubles.

### 5.1 matrice et groupes de matrices

Il ressort clairement de nombreuses études relatives à l'incertitude de mesure d'analyses microbiologiques que le type de matrice dans lequel les déterminations sont réalisées joue ici un grand rôle.

L'ISO 16140 (protocole de validation pour méthodes d'analyse alternatives) prescrit qu'au moins **cinq** matrices différentes sont utilisées pour la validation d'une méthode horizontale. Les échantillons de l'environnement peuvent être considérés comme un sixième groupe de matrice.

L'analyse inter-laboratoire décrite en annexe A d'ISO 19036 conduit à la conclusion (pour les méthodes de test quantitatives et par extrapolation aussi pour les qualitatives) que des matrices peuvent être subdivisées en quatre groupes et ce en rapport avec l'influence sur l'incertitude de mesure obtenue. C'est principalement **l'état physique** (homogénéité) de la matrice et pas tellement l'origine des ingrédients composés, qui joue ici un rôle décisif. Cette influence sur l'incertitude de mesure joue surtout un rôle lors de l'échantillonnage et lors de la dilution initiale (voir 4.4.1).

Le tableau 11 décrit les différentes catégories.

Classe de catégorie	Description	Exemples
I	liquides et poudres	lait, lait de coco, lait en poudre,...
II	substances solides bien mélangées	haché, MDM, crème fraîche, crème glacée, etc...
III	substances solides à fine granulométrie	morceaux de champignons séchés, carottes râpées, salade, crevettes, céréales pour petit-déjeuner, aliments pour animaux à fine granulométrie, noix hachées, etc...
IV	autres substances solides	viande, fromage, pâtisserie, etc... non moulus

Tableau 11 : groupes de matrice devant être examinés pour la détermination de l'incertitude de mesure (suivant ISO 19036).

Il ressort d'ISO 19036 que la contribution de l'effet de matrice à l'incertitude de mesure (reproductibilité intra-laboratoire, sR) peut être fixée, pour les deux premières catégories, à environ 0,1 log. Pour les troisième et quatrième catégories, cette contribution est considérablement supérieure mais également plus variable de sorte que l'on ne peut pas prévoir de valeur moyenne.

---

*Note : en principe, des échantillons des catégories III et IV peuvent être finement mixés et ils appartiennent ensuite, par conséquent, à la catégorie I ou II. Cela n'est toutefois pas une pratique courante dans les laboratoires microbiologiques. La préparation spécifique d'échantillon (comme par ex. fondre du chocolat) peut également entraîner un changement de catégorie.*

Le niveau de contamination est abordé plus loin en 5.2.2. On peut toutefois déjà affirmer que le type de matrice ne joue aucun rôle dans le cadre du niveau de contamination à analyser en rapport avec la détermination de l'incertitude expérimentale, puisque les laboratoires analysent des échantillons contaminés naturellement avec un niveau de contamination variable et que cela est donc repris dans le protocole. En d'autres termes : il ne faut tenir aucun compte du choix de matrice en rapport avec le niveau de contamination.

On peut déduire du tableau 11 ci-dessus et des considérations qui y sont associées que tous les types d'eau potable peuvent être considérés comme une matrice et toutes les formes d'eau environnante comme une autre. Les laboratoires sont naturellement libres de subdiviser leurs matrices en groupes plus petits, définis de manière plus stricte, pour déterminer l'incertitude de mesure.

## **5.2 Contamination**

### **5.2.1 quelles souches**

Cela ne joue naturellement un rôle que lors de contamination artificielle (voir plus loin au point 5.2.3).

Il faut faire un choix raisonnable en fonction de l'organisme cible (groupe, famille, genre, espèce, sérotype, type de phage,...). La préférence va toujours aux souches (confirmées) isolées à partir d'échantillons naturellement contaminés.

Le nombre d'organismes différents qu'il est préférable d'utiliser ici n'est pas bien défini. Il est considérablement élevé dans les validations inter-laboratoires (voir ISO 16140). Il est recommandé de tout de même utiliser à cet effet deux (à trois) souches différentes (par ex. trois différents isolats d'*E.coli*, groupés)

Pour le choix de la flore d'accompagnement (si celle-ci doit également être ajoutée artificiellement) il n'y a pas non plus de règles fixes. Il est ici aussi préférable d'ajouter plusieurs organismes. Pour faire un choix, on peut entre autres considérer les organismes de contrôle inventoriés dans ISO 11133-2 pour le contrôle de la sélectivité de milieux de culture.

De plus amples explications et directives se trouvent dans ISO 16140, annexe G.

### **5.2.2 quel niveau**

Dans le cas de contamination artificielle, le niveau de contamination, pour les méthodes de test QN, doit être choisi de telle sorte qu'il reflète le niveau que l'on rencontre à l'état naturel. Le niveau de contamination joue naturellement un rôle dans l'incertitude de mesure (e.a. plus de manipulations pour les dilutions). Il faudrait au moins préparer deux niveaux de contamination reflétant la gamme inférieure et la gamme supérieure des contaminations naturelles. Ces deux niveaux doivent être représentés (proportionnellement) dans le plan d'analyse (pour sa rédaction, voir 5.4).

*Note : on entend par « faiblement contaminé » et « fortement contaminé » la contamination de l'échantillon d'analyse – avec influence sur le nombre de dilutions – et non un dénombrement faible ou élevé dans la dilution finale.*

Le niveau de contamination pour tests qualitatifs est abordé au point 5.2.4.

### **5.2.3 contamination naturelle vs artificielle**

Pour la détermination (initiale) de l'incertitude de mesure, les échantillons contaminés naturellement sont à préférer à ceux contaminés artificiellement ou aux échantillons de référence (certifiés). On prend de

---

ce fait en compte la gamme des niveaux de contamination que l'on rencontre à l'état naturel. La détermination de l'incertitude de mesure par la « global approach » et par des analyses doubles le permet aussi. La variation du niveau de stress des germes à analyser est également prise en compte.

Une contamination artificielle n'est souhaitable (*doper*) que lorsque l'on ne dispose pas de suffisamment d'échantillons contaminés naturellement (dans la gamme nécessaire à la détermination de l'incertitude de mesure suivant un mode statistique pertinent). Toutes sortes de gradations différentes sont possibles :

- échantillons naturels où le micro-organisme cible (voir 5.2.1) à déterminer n'est pas présent et qui sont contaminés par celui-ci à différents niveaux
- échantillons pour analyse qui sont entièrement contaminés (par l'organisme cible et par la flore d'accompagnement « naturelle »)

Le moment du dopage est également important car il doit occasionner le moins possible de variation supplémentaire. Le moment idéal pour le dopage est lors de la première dilution. Un *dopage* réalisé à un stade précoce (sur des échantillons qui sont entre-temps conservés, éventuellement longtemps) entraînera toujours une plus grande variation.

Les échantillons de référence (certifiés) ont un seul niveau de contamination, la diversité de leur flore d'accompagnement est pauvre et ils n'ont qu'un seul « niveau de stress ». C'est pourquoi ils sont moins appropriés pour une utilisation dans un protocole de test suivant une « *global approach* ». Ils peuvent toutefois être utilisés pour déterminer certaines facettes spécifiques de l'incertitude de mesure.

## **5.3 Quelques techniques d'analyse particulières**

### **5.3.1 Méthodes MPN**

Les méthodes MPN dépendent tellement de l'influence inhérente à la dispersion de Poisson que la validation de ces tests peut exclusivement être évaluée par comparaison entre les protocoles d'essais avec concentration faible connue (avec en soi déjà une grande marge d'erreur !) et les tableaux publiés à ce sujet dans les normes officielles concernées où cette technique est appliquée.

Le tableau 12 indique pour les intervalles de probabilité de 95%, les limites entre lesquelles la valeur de référence d'un résultat MPN se situe. Ce tableau est basé sur la réalisation du test MPN avec trois tubes par dilution décimale et est une application pour la matrice eau.

Le tableau 13 est un tableau analogue pour l'analyse d'autres matrices par la méthode MPN.

Le Bacteriological Analytical Manual entre autres, répertorie des tableaux d'interprétation pour protocoles de test plus détaillés (avec 5 et même 10 tubes par étape de dilution)  
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html> (19).

MPN DETERMINATION FROM MULTIPLE TUBE TEST					
NUMBER OF TUBES GIVING POSITIVE REACTION OUT OF			MPN INDEX per 100 ml	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS	
3 of 10 ml each	3 of 1 ml each	3 of 0.1 ml each		LOWER	UPPER
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

FROM: STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, TWELFTH EDITION. (NEW YORK: THE AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, INC., p. 608)

Tableau 12. Méthode MPN pour la détermination du « nombre le plus probable » en utilisant trois tubes par dilution (matrice eau).

Table 1. For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.											
Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94

1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

Tableau 13. Tableau MPN général pour la méthode avec séries de 3 tubes pour les denrées alimentaires. Provient de BAM (19)

### 5.3.2 Autres

On peut finalement encore répéter que l'utilisation de techniques alternatives et/ou automatisées (ex. ensemencement en spirale, Tempo® de BioMérieux) peut faire varier l'importance relative des facteurs d'incertitude individuels. Le principe de « *global approach* » reste néanmoins de vigueur.

## 5.4 méthodes d'analyse qualitatives (QL) limite de détection

Cela ne relève pas de la portée du présent syllabus.

*Quelques considérations facultatives de l'auteur.*

*La « *global approach* » est valable ici aussi.*

*Il est difficile de déterminer avec précision la limite de détection avec des dilutions décimales. A cet effet, il est par exemple préférable d'utiliser une série de **dilutions doubles**, en partant d'une dilution dont le nombre d'ufc est faible et connu.*

*On peut par exemple la préparer en partant d'un (C)RM ou d'une culture que l'on a préparée soi-même (par ex. partir d'une dilution 10<sup>7</sup> d'un bouillon BHI incubé après inoculation par Salmonella fournit en général entre 10 et 100 ufc/ml) Les séries de dilution peuvent se faire en même temps que les analyses QL ou avant celles-ci (avec dénombrement préalable et conservation dans le congélateur dans des conditions adéquates).*

*Après (décongélation et) inoculation de la matrice appropriée (si nécessaire également par la flore d'accompagnement naturelle), on peut alors risquer une expérience permettant de déterminer la limite de détection jusqu'à un niveau de 2 ufc. Avec 11 dilutions doubles, on peut déjà atteindre une gamme de 3 log (1 → 2 → ... → 1.024). Les analyses sont effectuées en parallèle aux QN (sur milieu sélectif) et sont menées en QL simple ou double. Elles peuvent en outre être comparées à une méthode QL validée/accréditée/officielle. Pour 11 dilutions et deux doubles cela revient donc à 44 recherches et 11 dénombrements.*

---

*Une erreur souvent commise est d'utiliser des concentrations trop élevées pour les méthodes d'analyse QL. Cela ne dit en réalité rien sur la performance de détection de la méthode.*

## **5.5 choix des techniques statistiques (QN)**

On part de la « *global approach* » telle que décrite dans ISO 19036.

Dans la mesure où, dans un plan d'analyse, on travaille avec des séries d'échantillons avec le même profil microbiologique ou avec des déterminations doubles sur différents échantillons, l'approche statistique varie.

### **5.5.1 analyses indépendantes**

Elles peuvent par exemple être utilisées si la reproductibilité de l'analyse d'une série de sous-échantillons est réalisée dans différentes conditions de reproductibilité.

Les inconvenients de ces méthodes ont déjà été abordés (pas de niveaux de contamination différents, pas de variation dans la matrice, la flore d'accompagnement, stabilité des échantillons, etc...). Lorsque cette méthode est tout de même appliquée, la reproductibilité est très simple à calculer par la formule pour l'écart-type dans Excel (STDEV).

Un exemple est donné dans le document de travail Excel, onglet « tests non appariés ».

### **5.5.2 échantillons doubles appariés**

La technique des échantillons doubles appariés est appliquée dans la norme ISO 19036 et il faut donc lui accorder la préférence.

La figure 7 est reprise de cette norme et décrit le protocole d'essai pour la détermination de la reproductibilité intra-laboratoire.

La variation des conditions de reproductibilité entre les deux différents groupes de laborantins est maintenue aussi grande que possible en faisant varier au maximum tous les critères d'influence (traité au chapitre 4).

Le calcul de la reproductibilité se fait alors suivant le document de travail Excel, onglet « tests appariés ». Les formules doivent être quelque peu adaptées si le nombre d'échantillons appariés n'est pas égal à dix.

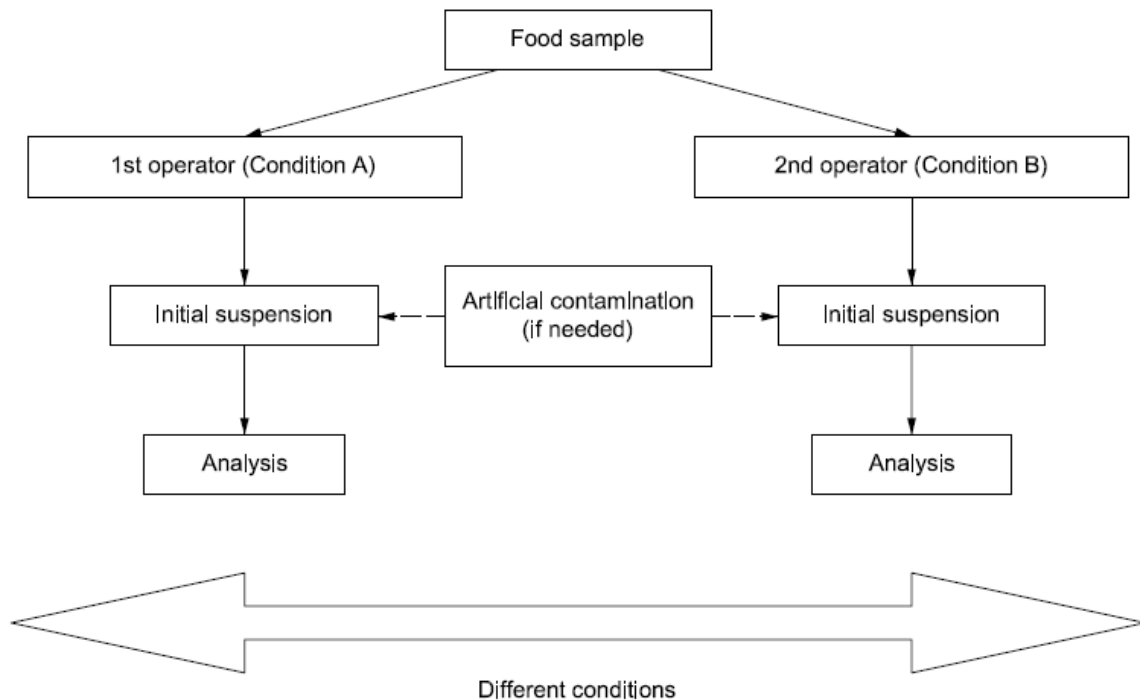


Figure 7 : Protocole d'essai pour la détermination de la reproductibilité intra-laboratoire pour les méthodes d'analyse quantitatives. Par « 1st operator » et « 2nd operator », on entend en réalité deux groupes de laborantins (d'ISO 19036).

## 5.6 plans d'analyse

Sur base de ce qui a déjà été abordé dans le présent syllabus, nous faisons ici un bref résumé des parties pertinentes d'un plan d'analyse pour la détermination intra-laboratoire de l'incertitude de mesure.

### 5.6.1 Tests quantitatifs (QN)

1. Décider de la méthode d'analyse à appliquer. Cela dépend évidemment de l'objectif, du souhait ou de l'exigence du client, etc...
2. Déterminer le mode d'approche statistique du protocole d'essai. De préférence avec des échantillons appariés (voir 5.5.2)
3. Si vous dopez vous-même les échantillons, définissez-en les conditions le plus précisément possible (voir les différentes parties de 5.2)
4. Définir le plus précisément possible les conditions de reproductibilité devant être appliquées (voir 5.5.2)
5. Traiter les résultats suivant le mode d'approche statistique choisi (Document de travail Excel, onglet tests non appariés ou appariés).

### 5.6.2 Tests qualitatifs (QL)

Cela ne relève pas de la portée du présent syllabus.

## 5.7 contrôle continu

Les laboratoires doivent introduire suffisamment de contrôles de qualité (première et surtout deuxième ligne) et les évaluer statistiquement afin de pouvoir démontrer un contrôle continu de leur performance

---

en matière d'incertitude de mesure. Cela ne doit évidemment pas être réalisé à la même fréquence pour toutes les méthodes de test. Voici quelques fils conducteurs :

- analyse double de certains échantillons de routine (par série, par jour, par semaine,...). Être attentif à l'application des conditions de reproductibilité (pas de répétabilité)
- analyser régulièrement les échantillons de contrôle que l'on prépare soi-même (ou échantillons de référence) quant à certains paramètres (transformation suivant 5.5.1). Pour les méthodes de test QL, il faut obtenir un score positif suffisamment élevé (80 à 90% moyenne progressive) pour les échantillons de contrôle avec niveau de contamination légèrement supérieur à la limite de détection, par ex. Salmonella 5 ufc par échantillon pesé pour analyse.

## 5.8 quelques outils software astucieux pour le calcul et le contrôle (NMKL, autres)

Le 2<sup>ème</sup> document de travail Excel (NMKL) annexé présente encore quelques autres applications statistiques pour les analyses microbiologiques.

# 6 Critères réalisables et réalistes de l'incertitude de mesure

## 6.1 études, littérature, autres considérations

Les résultats relatifs à l'incertitude de mesure inter-laboratoire peuvent e.a. être retrouvés dans les publications des essais inter-laboratoires. Certaines données de la littérature peuvent également être retrouvées à ce sujet (voir les publications e.a. de Diane Roberts, et Jarvis e.a.) (7, 11). Dans certaines normes d'analyse ISO officielles, on peut également retrouver de tels résultats (ISO 6888, 7932, 7937, 11290, et 6579).

Les données concernant l'incertitude intra-laboratoire sont rarement publiées. Une bonne source est [Annexe A dans l'ISO 19036](#).

Le tableau 12 rend quelques dispersions typiques de  $s_R$  (il s'agit de l'écart-type intra-laboratoire dans des conditions de reproductibilité).

Classe de matrice	Germes totaux	Coliformes	<i>E. coli</i>	Staph. Coag. +	Autres flores
I	0,05 – 0,14	0,18			0,14 – 0,23
II	0,07 – 0,24	0,15 – 0,20	0,11 – 0,44		0,04 – 0,25
III	0,14 – 0,45	0,78	0,31	0,13	0,25 – 0,36
IV	0,12 – 0,78	0,19 – 0,35	0,12 – 0,47	0,14 – 0,48	0,24 – 0,75

Tableau 14 : dispersion des écarts-types, comme publié dans l'Annexe A d'ISO 19036.

Pour les méthodes de test qualitatives, peu de chiffres statistiques sont disponibles. Les notions d'accordance et de concordance ont été proposées par Langton en 2002, dans le cadre des tests QL, respectivement en guise de pendants de reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoire pour les méthodes de test QN. L'AOAC (en collaboration avec le CFSSAN) affirme toutefois qu'aucune plus-value statistique n'y est associée en comparaison avec les données brutes obtenues lors des essais inter-laboratoires et comme cela a e.a. été publié dans ISO 6579:2002 pour la détection de la Salmonella.

Pour les méthodes de test QL courantes, on peut affirmer que la limite de détection avoisine la plupart du temps l'établissement de 1-2 ufc dans l'échantillon pondéré pour analyse.

---

## 7 Relation avec l'évaluation des laborantins

Avant de faire intervenir un nouveau laborantin dans les activités d'un laboratoire microbiologique, il faut démontrer par une épreuve pratique qu'il maîtrise suffisamment toutes les parties d'analyse pour lesquelles il est déclaré compétent.

Dans la pratique, on peut à cet effet appliquer une « global approach » - tout comme pour la validation des méthodes de test.

On peut de plus affirmer qu'il n'est pas nécessaire que cette validation soit entièrement effectuée pour toutes les méthodes de test pour lesquelles il est déclaré compétent. S'il prouve qu'il a suffisamment de précision pour quelques tests QN (sélectifs et non sélectifs) et QL ainsi qu'une limite de détection acceptable pour les tests QL, il aura suffisamment prouvé son aptitude à être repris dans l'équipe de laboratoire. Il peut évidemment y avoir des évaluations partielles supplémentaires pour des activités spécifiques comme la connaissance de techniques de confirmation, la manipulation de certains appareils, etc...

Lors de l'évaluation pour la déclaration de compétence, il faut toujours s'efforcer de minimiser l'exécution d'analyses supplémentaires pour l'évaluation et de maximiser la possibilité de tirer des conclusions de ces analyses.

Dans le cadre de l'évaluation du nouveau laborantin, on peut choisir entre différentes approches, par ex. (non limitatif !) :

1. l'exécution entièrement individuelle des méthodes de test choisies (comme décrit en 5.5.1),
2. la mise en marche de la validation continue (comme décrit en 5.7)
3. L'exécution individuelle de parties spécifiques (comme décrit dans les différentes parties de 4.4 et résumé en 4.6)

Le troisième point n'est bien souvent nécessaire que s'il ressort de l'évaluation statistique intermédiaire que des écarts significatifs ont été constatés. On peut, pour ce faire, appliquer les feuilles de calcul des deux documents de travail Excel annexés.

Il faut toujours veiller à ce que le traitement statistique se fasse dans des conditions de reproductibilité et non de répétabilité ou que – le cas échéant – on en tienne tout de même compte. On peut affirmer de façon empirique que les résultats obtenus dans des conditions de répétabilité doivent être multipliés par un facteur **1,6** pour être comparés à ceux de la reproductibilité (*18, chapitre 2.2.4, point b*). Il faut toutefois clairement accorder la préférence à la détermination effective de l'incertitude de mesure dans des conditions de reproductibilité plutôt qu'à l'approche empirique.

---

## 8 Publications – ouvrages de référence

1. ISO 16140 (2003): Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.
2. ISO 19036 (2006): Microbiology for food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations
3. ISO (1995): Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure
4. Incertitude lors de déterminations quantitatives de micro-organismes (centre de Métrologie et d'Accréditation, Finlande, 2002)
5. Modèle mathématique pour l'évaluation statistique de paramètres de précision de méthodes microbiologiques (AOAC, 1991)
6. NPHS Wales – NHS – HPA (2005): incertitude de mesure dans les méthodes de test
7. Diane Roberts (1998): Proficiency testing in the food microbiology laboratory
8. ISO 11133-1:2000: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
9. ISO 11133-2:2003: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media
10. AOAC: article relatif à l'incertitude de mesure en microbiologie (Appendix J – STWG Part 3 – Uncertainty 7-8-06)
11. Jarvis e.a. (J.A.M. - 2007 - ISSN 1364-5072): Estimates of measurement uncertainty from proficiency testing schemes, internal laboratory quality monitoring and during routine enforcement examination of foods
12. Cursus Waarschijnlijkheidsberekening & Statistiek, VUB, 2003
13. Praktische statistiek voor het laboratorium. J.W.A. Klaessens en J.A. van Leeuwen. Ten Hagen & Stam, 1996. ISBN 90-71694-52-6
14. Verklarende statistiek. M.L. Wijvekate. Het Spectrum, 1983. ISBN 90 274 4824 8
15. Document explicatif KIWA portant sur le but du rapportage d'essais inter-laboratoires (d'internet)
16. ISO 7218:1996 (et amendement 1:2001) Microbiologie des aliments - Règles générales pour les examens microbiologiques
17. Wikipedia (version anglaise): tout ce qui a trait à la distribution normale : [http://en.wikipedia.org/wiki/Normal\\_distribution](http://en.wikipedia.org/wiki/Normal_distribution)
18. De Ware(n)-chemicus, themanummer, februari 1996, Validatie van methoden.
19. Bacteriological Analytical Manual On-line, février 2006, FDA/CFSAN.

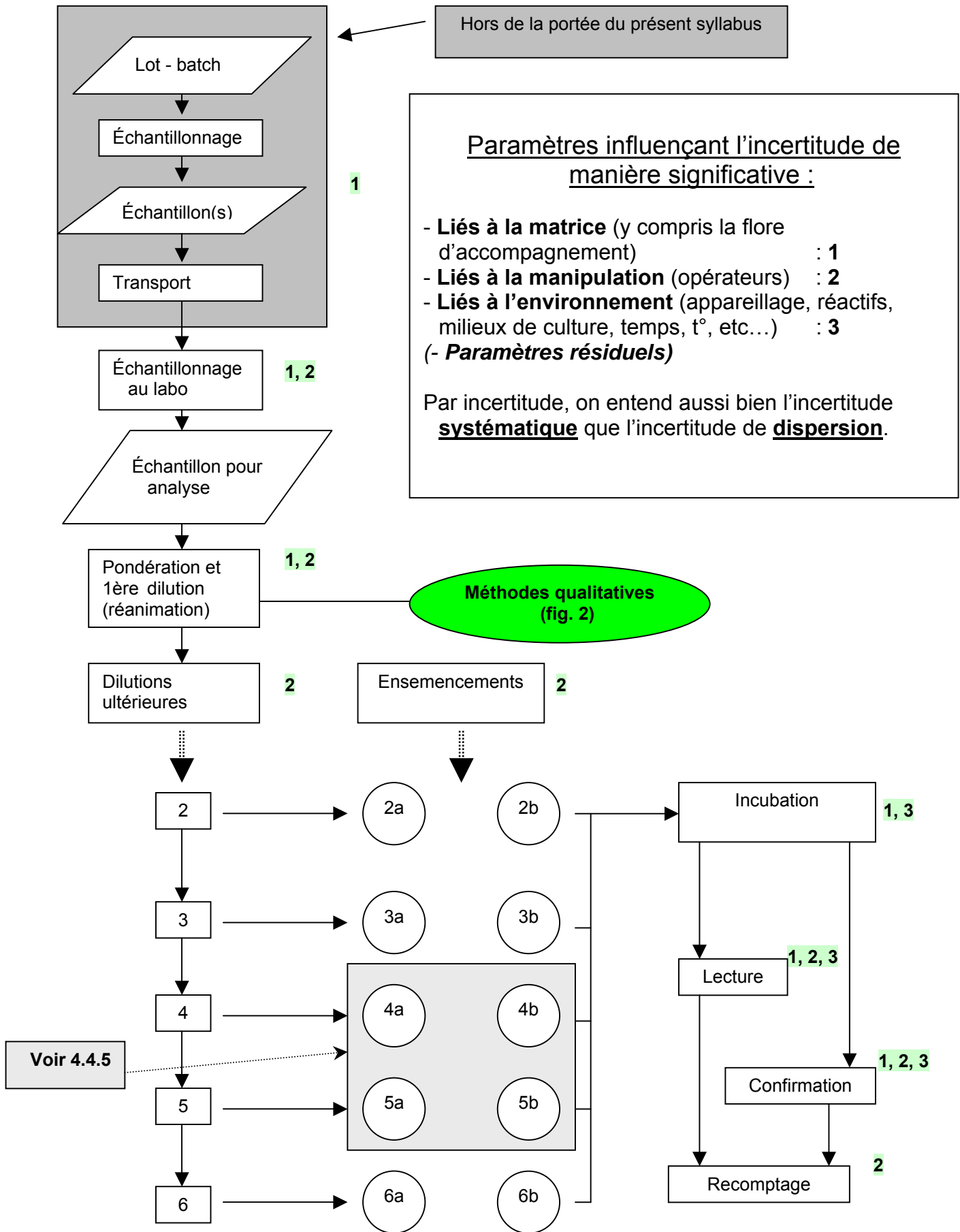


Figure 8. Diagramme général des méthodes de dénombrement microbien

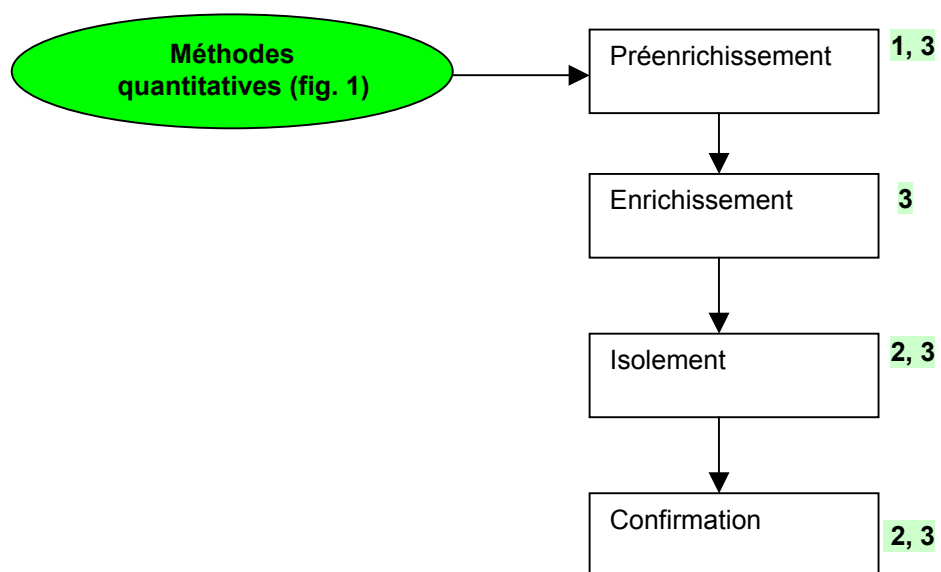


Figure 9. Sous-diagramme général des méthodes de détection microbienne.