






Procédure

MICROBIOLOGIE - ESTIMATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE

Mise en application	15/12/2008
Administration compétente	DG-laboratoires
Service responsable	Responsables qualité
Destinataires	Tous les laboratoires agréés par l'AFSCA pour les paramètres microbiologiques

	Nom – fonction / service	Date	Signature
Rédigé par :	Franck Defeijt Responsable qualité - LFSAGx	02/12/2008	
Vérifié par :	Frans De Volder DG labo – Responsable qualité	10/12/2008	
Approuvé par :	Geert De Poorter DG labo – Directeur-général	16/12/2008	

Aperçu des révisions

Révision par / date*	Raison de la modification	Partie de texte / portée de la révision

* La différence entre la date de mise en application et la date actuelle ne peut dépasser 5 ans.

Adapter le numéro de révision et, le cas échéant, l'année. Après validation, adapter la date de mise en application en tenant compte du temps nécessaire pour informer les collaborateurs concernés.

Destinataires

- Administration centrale des laboratoires
- Laboratoires agréés par l'AFSCA pour les paramètres microbiologiques

Les documents sont disponibles sur le site web de l'AFSCA (www.afsca.be > Professionnels > Laboratoires > Laboratoires agréés > Notes de services). Pour les collaborateurs de l'AFSCA les documents sont aussi placés sur le serveur central. Les versions du groupe A sont considérée comme les versions d'application.

Mots clés : Incertitude de mesure
Analyse microbiologique

TABLE DES MATIÈRES

1. BUT.....	3
2. DOMAINE D'APPLICATION.....	3
3. REFERENCES	4
4. DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS	4
5. ESTIMATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE	4
5.1. Principe.....	4
5.2. Mode opératoire.....	5
5.3. Calcul.....	6
5.4. Expression de l'incertitude de mesure	6
6. ANNEXES.....	8
6.1. Annexe 1 – Schéma du mode opératoire.....	8
6.2. Annexe 2 - Limites de confiance pour l'estimation des petits nombres de colonies	9
6.3. Annexe 3 tableau Excel	9

1. But

Ce document donne les instructions pour l'estimation et l'expression de l'incertitude de mesure liée aux résultats des analyses quantitatives en microbiologie.

2. Domaine d'application

- Produits destinés à la consommation humaine
- Produits destinés à l'alimentation des animaux
- Echantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de produits alimentaires.

L' instruction est applicable :

- aux analyses quantitatives effectuées selon les techniques de comptage des colonies

L' instruction n' est pas applicable :

- aux analyses quantitatives effectuées en utilisant la technique du Nombre le Plus Probable
- à l' analyse de faibles niveaux de micro-organismes (< 15 colonies sur la plus petite dilution comptable)

Note : pour les petits nombres le laboratoire peut se référer au tableau repris en annexe 2 : « Limites de confiance pour l'estimation des petits nombres de colonies ».

3. Références

ISO 19036 : 2006 « Microbiologie des aliments – Lignes directrices pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives ».

4. Définitions et abréviations

Incertitude de mesure: paramètre, associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande.

Incertitude type $u(x_i)$: incertitude du résultat d'un mesurage exprimé sous la forme d'un écart-type.

Incertitude type composée $u_c(y)$: l'incertitude d'un résultat de mesure pour lequel toutes les contributions des sources principales de l'incertitude ont été combinées suivant un modèle statistique.

Incertitude élargie U : grandeur définissant un intervalle autour du résultat d'un mesurage, dont on puisse s'attendre à ce qu'il comprenne une fraction élevée de la distribution des valeurs qui pourraient être attribuées raisonnablement au mesurande. L'incertitude élargie U est calculée à partir d'une incertitude type composée $u_c(y)$ et d'un facteur d'élargissement k .
 $U = k u_c(y)$

Facteur d'élargissement k : facteur numérique utilisé comme multiplicateur de l'incertitude type composée pour obtenir l'incertitude élargie (k étant typiquement compris entre 2 et 3 et = 2 dans cette instruction, correspondant approximativement à un niveau de confiance de 95 %)

Biais : la différence entre la moyenne de mesures et la valeur de référence.

5. Estimation de l'incertitude de mesure

5.1. Principe

Cette instruction est basée sur une approche globale pour estimer l'incertitude de mesure ; elle se fonde sur la variabilité globale du processus d'analyse.

Dans cette variabilité globale, seulement la fidélité observable (composante aléatoire) est prise en compte et pas le biais, étant donné la nature empirique des dénombrements microbiens.

L'approche globale est dérivée d'une estimation expérimentale de l'écart-type de reproductibilité du résultat final du processus complet de mesurage. Cet écart-type correspond à l'incertitude type composée.

L'approche globale peut être considérée comme un système de « boîte noire ». Les principales sources d'incertitudes en microbiologie des aliments sont :

- a) l'échantillonnage
- b) l'échantillon de laboratoire
- c) la matrice
- d) les équipements, le milieu de culture et réactifs
- e) les erreurs aléatoires résiduelles
- f) le sous échantillonnage – suspension mère
- g) l'opérateur, le temps
- h) le biais

Par le protocole expérimental utilisé dans cette instruction, l'échantillonnage et le biais ne sont pas repris comme sources d'incertitude.

L'écart-type de reproductibilité est estimé par l'écart-type de reproductibilité intralaboratoire sur base d'un protocole expérimental et est estimé pour chaque groupe de micro-organismes cibles (ou groupe cohérent de micro-organismes cibles) et pour chaque matrice (ou groupe cohérent de matrices) pour une méthode donnée. Il est nécessaire que les résultats soient obtenus selon des méthodes bien maîtrisées.

5.2. Mode opératoire

Pour chaque micro-organisme (ou groupe de micro-organismes) et pour chaque type de catégorie donné de matrice, le protocole expérimental décrit dans le schéma en annexe 1 doit être réalisé pour au moins 10 échantillons de la même catégorie. Il convient de répéter ce protocole des jours différents afin d'obtenir une accumulation de résultats dans le temps. Les laboratoires qui ont un scope « toutes denrées » doivent au moins calculer leur incertitude de mesure pour les 4 catégories de matrices reprises dans le tableau 1.

Tableau 1 : définition des catégories

Catégories	Type de matrice
catégorie (1) : liquides et poudres	lait, lait en poudre, etc...
catégorie (2) : mélanges de solides	viande hachée, viande séparée mécaniquement, chair à saucisse, viande broyée, crème fouettée, etc...
catégorie (3) : petits (ou très petits) solides	Persil, champignon déshydraté, carotte, céleri-rave râpé, salade, crevette, céréale, aliment pour bétail, noisette hachés, etc..
catégorie (4) : autres solides	viande non hachée, fromage, pâtisserie, etc

Dans chaque catégorie, il convient que les matrices soient représentatives des types de matrices analysées par le laboratoire.

Au sein d'une catégorie, le laboratoire peut analyser des échantillons de matrices différentes. Par exemple pour la catégorie 1, le laboratoire peut analyser 2 échantillons de lait, 3 échantillons de lait en poudre et 5 échantillons de lait de coco.

Le nombre de catégories de matrices utilisées pour l'estimation de l'incertitude de mesure peut être adapté en fonction du scope du laboratoire et de la diversité des matrices faisant l'objet d'analyse de routine par le laboratoire ou lorsque le laboratoire redoute un problème particulier avec un type de matrice (présence de substances inhibitrices, flore de compétition,...)

Les écart-types sont calculés sur base des données transformées en log, ce qui permet de stabiliser la variance de la reproductibilité quel que soit le niveau de contamination, étant donné que les faibles niveaux ne sont pas pris en considération dans cette instruction.

Il n'est donc pas nécessaire d'estimer l'écart-type de reproductibilité par niveau de contamination. Cependant il convient de choisir les échantillons et/ou les dilutions rencontrées lors des essais de routine.

S'il est nécessaire de recourir à une contamination artificielle, cette dernière doit être maîtrisée.

Pour chaque échantillon (annexe 1), 2 opérateurs prélèvent chacun une prise d'essai et préparent une suspension mère qui est analysée une seule fois. Il convient que les conditions A et B soient les plus différentes possible (opérateurs différents, lots de milieux de culture différents, agitateurs, balances, bain marie, incubateurs, durées d'analyse différentes,....)

5.3. Calcul

Les données exprimées en ufc/g doivent être transformées en log(ufc/g)

Calculer l'écart-type de reproductibilité intralaboratoire s_R pour les n échantillons d'une matrice comme suit :

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

où

y_{ij} sont les données log-transformées en \log_{10} (ufc/g)

i est l'indice de l'échantillon, $i=1$ à n ($n \geq 10$)

j est l'indice de la condition de reproductibilité, j = A ou B

le fichier en annexe 3 donne un modèle de feuille de calcul dans Excel

En notant le résultat d'essai $y = \log x$ et l'écart-type de reproductibilité s_R , l'incertitude élargie U est donnée par $2s_R$

5.4. Expression de l'incertitude de mesure

Le résultat d'essai peut être exprimé de différentes manières ($y = \log_{10} x$)

- $y \pm U$ (log)
- $y \log (y-U, y+U)$
- x ufc/g ou x ufc/ml (10^{y-U} ; 10^{y+U})

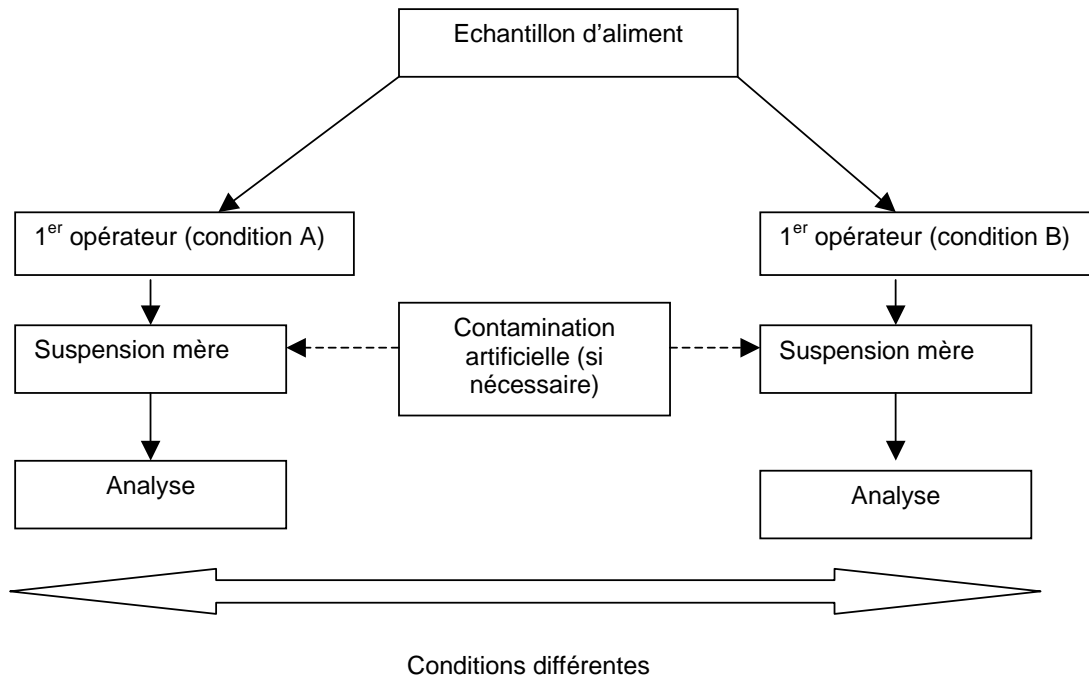
où $U = 2u_c = 2s_R$

Par exemple, un écart-type de reproductibilité s_R de $0.15 \log_{10}$ a été trouvé. L'incertitude élargie U , avec un facteur d'élargissement de 2 (niveau de confiance à 95%) est de $0,15 \times 2 = 0.3 \log_{10}$. Le résultat d'essai est de $5.0 \log_{10}$ ufc/g. Le résultat d'essai peut être exprimé selon une des possibilités suivantes :

- $5.0 \log \pm 0.3 \log$
- $5.0 \log (4.7 ; 5.3)$
- $10^5 \text{ cfu/g} (5 \times 10^4 ; 2 \times 10^5)$
- $100.000 \text{ cfu/g} (50.000 ; 200.000)$

6. Annexes

6.1. Annexe 1 – Schéma du mode opératoire



6.2. Annexe 2 - Limites de confiance pour l'estimation des petits nombres de colonies

Lorsque le nombre de colonies retenu est inférieur à 15, les limites de confiance au niveau de 95% de l'estimation des petits nombres sont données par le tableau suivant.

Nombre de microorganismes	Limites de confiance à 95%	
	Limite inférieure	Limite supérieure
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

6.3. Annexe 3 tableau Excel