

FIDELITE DES METHODES DE NUMERATION MICROBIOLOGIQUE :

les enseignements des essais interlaboratoires CECALAIT

Le regroupement des résultats de plusieurs années d'essais interlaboratoires organisés par CECALAIT en microbiologie a permis d'estimer les valeurs de répétabilité et de reproductibilité pour le dénombrement des microorganismes à 30°C, des coliformes et des staphylocoques coagulase +. Il est, dès lors devenu possible de définir par calcul les valeurs limites de fidélité correspondantes. Ensuite, la comparaison de ces valeurs observées ou calculées aux limites actuelles de conformité des essais interlaboratoire CECALAIT peut amener à s'interroger sur la pertinence des limites actuelles. C'est ainsi que la synthèse de ces observations et de ces calculs a conduit à constater qu'il est possible d'harmoniser les limites de répétabilité et de justesse sur des valeurs uniques, quelles que soient les flores considérées -ci-dessus-.

Dans les essais interlaboratoires de dénombrement microbien, les limites de conformité pour la fidélité ne peuvent pas être définies en fonction de valeurs de répétabilité et de reproductibilité fixées par les normes. En effet, l'introduction de paramètres de fidélité dans les méthodes microbiologiques n'a commencé que très récemment, dans le cadre d'un programme européen, et n'est achevée, pour l'heure, que pour *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* (cf La Lettre de CECALAIT, n°s 26 et 30). Dans tous les autres cas, ces limites de conformité sont définies par rapport à des objectifs de qualité souhaitable ou à des valeurs tirées de la littérature. Il en est ainsi dans les essais d'aptitude organisés par CECALAIT, où, par exemple, les valeurs limites pour le dénombrement des microorganismes à 30°C sont calquées sur celles des laboratoires interprofessionnels. Cependant, l'analyse d'un grand nombre de résultats obtenus au cours de différents essais interlaboratoires permet d'estimer de façon fiable la répétabilité et la reproductibilité des méthodes mises en œuvre. Il est possible alors de déterminer par calcul les valeurs limites de justesse correspondantes. La comparaison avec les valeurs fixées au préalable peut conduire alors à en reconsidérer le bien-fondé : celles-ci doivent-elles être maintenues ou au contraire réajustées ?

C'est précisément la question posée à l'issue du travail de synthèse sur la fidélité des méthodes de dénombrement microbien effectué par P. ROLLIER à partir des résultats des essais interlaboratoires de CECALAIT. Les méthodes considérées concernent les microorganismes à 30°C, les coliformes et les staphylocoques coagulase +. Il s'agit de méthodes de dénombrement **direct** sans repiquage, et non par NPP. Après les synthèses effectuées séparément pour le dénombrement des microorganismes à 30°C et des coliformes, d'une part et de *Staphylococcus aureus*, d'autre part, (La Lettre de CECALAIT n° 17, janvier 1996 & n° 20, octobre 1996), ce type de méthodes est ici considéré d'un point de vue plus global, presque indépendamment du critère microbien considéré.

Limites de conformité actuelles

Elles sont rappelées dans le tableau 1

avec

Sr : écart-type de répétabilité de la méthode, c'est à dire que 95% des résultats, transformés en log dans les essais microbiologiques, se répartissent dans une fourchette de $\pm 2Sr$ autour de la moyenne.

SL : estimation calculée de l'écart-type de répétabilité d'un laboratoire dans l'essai

limSL = 1,43 Sr, pour 10 échantillons (cas des microorganismes à 30°C et des coliformes)

limSL = 1,6 Sr, pour 5 échantillons (cas de *E. coli* et des staphylocoques), les facteurs « 1,43 et 1,6 » sont dérivés des tables de χ^2 , au risque $\alpha = 5\%$.

\bar{d} est la moyenne des écarts à la valeur vraie par échantillon et par laboratoire, toujours pour des données transformées en log. Dans la présentation des résultats de chaînes d'analyses, le paramètre \bar{d} donne lieu à la définition de limites de justesse symétriques par rapport à l'écart nul (cf figures 3 et 4 en fin de texte).

tableau 1 : limites de conformité utilisées dans les essais interlaboratoires CECALAIT en microbiologie

dénombrement enumeration	Sr (log)	lim SL (log)	\bar{d} (log)
microorganismes à 30°C total flora at 30°C	0,08	0,11	$\pm 0,2$
Coliformes à 30°C coliforms at 30°C	0,14	0,20	$\pm 0,3$
<i>Escherichia coli</i>	0,14	0,22	$\pm 0,3$
Staphylocoques staphylococci coagulase +	0,25	0,4	$\pm 0,4$

table 1 : limits of acceptability in CECALAIT microbiological ringtests

With

Sr : standard deviation of repeatability for the method. It means that 95% of the results (log transformed in microbiology) are between mean value $\pm 2Sr$.

SL : calculated estimation of the standard deviation of repeatability for a laboratory in the study

limSL = 1.43 Sr, for 10 samples (total flora and coliforms)

limSL = 1.6 Sr, for 5 samples (*E. coli* and coagulase + staphylococci), the figures 1.43 and 1.6 being calculated from χ^2 tables, with a risk $\alpha = 5\%$.

\bar{d} is the mean of the differences between the true value and the results for each laboratory and for each sample.

Ces limites de conformité ont été définies, à la fois, en reprenant les données de la littérature et en tenant compte de la précision souhaitable pour des résultats d'analyse dans un environnement technique donné. Dans le cas des microorganismes à 30°C, les valeurs limites reprennent celles que se fixent les laboratoires interprofessionnels et correspondent donc à leurs observations de terrain et à leur niveau élevé d'exigence.

Observation des résultats des essais interlaboratoires

Depuis 1992, CECALAIT organise des essais interlaboratoires trimestriels pour les microorganismes à 30°C et les coliformes dans le lait. Depuis, des essais ont été étendus au fromage, ainsi qu'au dénombrement d'autres microorganismes, notamment aux staphylocoques coagulase+ et à *E. coli*.

Plus d'une dizaine d'essais interlaboratoires ont pu ainsi être utilisés pour estimer les écarts-types de répétabilité et de reproductibilité, respectivement S_r et S_R , puis pour déterminer par calcul la valeur limite de \bar{d} .

Le raisonnement suit les étapes ci-dessous

A partir de la formule, classiquement décrite dans les normes (par exemple ISO 5725) : $S_R^2 = S_{lab}^2 + S_r^2$, on calcule S_{lab} . S_{lab} correspond à la variance liée à l'effet laboratoire, pour une méthode donnée. Il s'agit donc d'une mesure de la dispersion des biais systématiques des laboratoires pour la méthode en question, tels qu'ils sont normalement observables dans l'état de l'art du moment.

Dans les essais d'aptitude, cette caractéristique de la méthode doit, en principe, être respectée quand la méthode est correctement maîtrisée par les participants. A un niveau individuel, chaque laboratoire doit voir son biais moyen \bar{d} situé dans la zone de plus forte probabilité définie à partir de $S_{\bar{d}}$, distribution théorique calculée de la moyenne des écarts.

NB : il ne faut pas le confondre avec la valeur Sd, qui fixe une des limites des cibles de conformité dans les essais d'aptitude -cf Fig 3 et 4 en fin de texte-

$S_{\bar{d}}$ tient donc compte de l'erreur S_{lab} et de l'erreur de répétabilité, mais pondère cette dernière, par rapport au nombre d'échantillons dans l'essai et au nombre de répétitions.

On a alors $S_{\bar{d}} = \sqrt{S_{lab}^2 + S_r^2/nq}$
avec n, le nombre de répétitions et q, le nombre d'échantillons

On peut alors déterminer la limite de conformité pour la moyenne des écarts à la valeur vraie (par échantillon et par laboratoire) : **limite de \bar{d}** .

limite de $\bar{d} = \pm 1,96 S_{\bar{d}} \approx \pm 2 S_{lab}$, dans le cadre des chaînes d'analyse CECALAIT.

Le tableau 2 montre les résultats ainsi obtenus

tableau 2 : limites de justesse **calculées** à partir de la répétabilité et de la reproductibilité des essais interlaboratoires CECALAIT en microbiologie dans le lait

table 2 : limits of accuracy **calculated** from repeatability and reproducibility in CECALAIT microbiological ringtests in milk

dénombrement enumeration	Sr (log)	SR (log)	lim $\bar{d} \approx$ $\pm 2 S_{lab}$ (log)
microorganismes à 30°C total flora at 30°C	0,065	0,181	$\pm 0,34$
coliformes à 30°C coliforms at 30°C	0,064	0,160	$\pm 0,29$
staphylocoques staphylococci coagulase + BP + coag.	0,183	0,398	$\pm 0,70$
RPF	0,066	0,152	$\pm 0,27$

Légende / caption :

S_r : écart-type de répétabilité / see table 1

S_R : écart-type de reproductibilité / standard deviation of reproducibility

\bar{d} : moyenne des écarts à la valeur vraie par échantillon et par laboratoire / see table 1

$\lim \bar{d} = \pm 1,96 S_{\bar{d}} \approx \pm 2 S_{lab}$, (pour le calcul, voir les explication données avant le tableau)

$\lim \bar{d} = \pm 1,96 S_{\bar{d}} \approx \pm 2 S_{lab}$, in CECALAIT's ringtests (see summary text for further explanations)
($S_{\bar{d}}$ is the standard deviation of the distribution of the means of deviations.)

Caution : $S_{\bar{d}}$ is different from Sd, which gives one of the limits of the acceptability area - see figs 3 and 4 below-

BP + coag. : milieu de Baird Parker, puis confirmation par le test de la coagulase / Baird Parker medium, followed by confirmation using the coagulase test

RPF : milieu Baird Parker, additionné de supplément RPF, càd plasma de lapin, fibrinogène / Baird Parker medium, supplemented with RPF, ie rabbit plasma, fibrinogen

Pour les coliformes, S_r est largement inférieur à la valeur limite actuelle et \bar{d} est en bon accord avec la limite de conformité rappelée ci-dessus.

Pour les staphylocoques, aucune des valeurs limites n'est respectée si le protocole utilisé est la méthode avec confirmation (BP + coagulase). Cependant, nous avons déjà souligné (cf Lettre de CECALAIT n° 20) que ce protocole expérimental lourd

et long subit des allègements considérables dans la pratique, d'où une diminution inévitable de la fidélité. En revanche, l'utilisation de la méthode RPF permet de respecter largement les limites de conformité, quel que soit le produit analysé. D'ailleurs, il faut noter qu'il s'agit de la méthode la plus utilisée maintenant dans les laboratoires.

Pour les microorganismes à 30°C, la répétabilité apparaît satisfaisante. En revanche, par suite d'un écart-type de reproductibilité élevé, la limite calculée de \bar{d} est sensiblement supérieure à la limite, d'origine interprofessionnelle, actuellement en usage. Cette différence est sans doute liée à la participation de laboratoires d'origine et d'objectifs différents, peut-être moins impliqués et moins entraînés que les laboratoires interprofessionnels. Certains utilisent, en outre, des méthodes alternatives ou, pour les utilisateurs de méthodes normalisées, ne suivent pas tous la même norme. Or, la norme FIL préconise, par exemple, une température de gélose de 45 ± 1 °C, alors que la norme AFNOR recommande 47 ± 2 °C. Ceci a vraisemblablement une incidence sur le développement des colonies dans les boîtes de Petri.

Vers des limites de conformité communes à tous les critères microbiologiques

Les résultats ainsi observés font apparaître que la plupart des limites de conformité actuelles sont trop larges, mais qu'en revanche, la norme de justesse actuelle pour les microorganismes à 30°C est trop étroite dans le cadre de nos essais interlaboratoires. La fixation de nouvelles valeurs, plus conformes à la réalité s'appuie à nouveau sur le tableau 2. Celui-ci montre en effet, de manière somme toute assez surprenante, que S_r et $\lim \bar{d}$ tendent chacun vers une valeur commune, quel que soit le critère microbiologique considéré. C'est pourquoi, il est proposé, à l'avenir, d'harmoniser les limites de conformité des critères suivants : flore banale à 30°C, coliformes à 30°C – et par extension *E. coli* -, staphylocoques coagulase +. Donc, pour ce type de méthodes en dénombrement direct, en profondeur en boîtes de Petri, sans confirmation ultérieure, les limites de conformité peuvent être ajustées à

$S_r = 0,08 \log$ et $S_{\bar{d}} = 0,15 \log$

ce qui définit les limites suivantes **$\lim S_r = 0,11$ ou $0,13 \log$** selon le nombre d'échantillons et **$\lim \bar{d} = \pm 0,3 \log$**

Les figures 1 et 2 (à la fin du texte) proviennent des analyses de la répétabilité individuelle au cours d'essais interlaboratoires pour le dénombrement, respectivement des coliformes dans le lait cru et des staphylocoques dans le fromage. Elles permettent de visualiser l'effet de la nouvelle limite de conformité pour la répétabilité.

En effet, la valeur limite de GRSL, l'écart-type relatif géométrique, calculé par laboratoire, visualisée ici par un trait vertical, est un pourcentage qui correspond à l'expression de la répétabilité dans les données d'origine (non transformées en log). Elle est liée à S_r par les formules suivantes :

$GRSL = (10^{\lim SL} - 1) \times 100$, avec rappelons le
 $\lim SL = 1,43 S_r$, pour 10 échantillons (cas des microorganismes à 30°C et des coliformes)

$\lim SL = 1,6 S_r$, pour 5 échantillons (cas de *E. coli* et des staphylocoques).

Avec les anciennes limites de S_r , à savoir 0,14 log pour les coliformes et 0,25 log pour les staphylocoques, GRSL était égal respectivement à 59% pour les coliformes et 150% pour les staphylocoques. Ces limites sont visualisées par les traits verticaux en pointillés. Avec $S_r = 0,08 \log$, la nouvelle limite de conformité proposée, GRSL devient égale à 30% pour les coliformes et à 34% pour les staphylocoques. Ces nouvelles limites sont visualisées par des traits verticaux pleins, en gras.

Les figures 3 et 4 (en fin de texte) illustrent l'analyse de la justesse au cours d'essais interlaboratoires consacrés respectivement au dénombrement des staphylocoques dans le fromage et des microorganismes à 30°C dans le lait cru.

L'ancienne et la nouvelle limite de conformité sont matérialisées par des rectangles de longueur $2 \bar{d}$, en traits gras pour les nouvelles.

Les figures 1 et 2 montrent clairement que ces nouvelles limites ne correspondent pas à une pénalisation des laboratoires, mais qu'elles sont le reflet des performances qu'on peut en attendre.

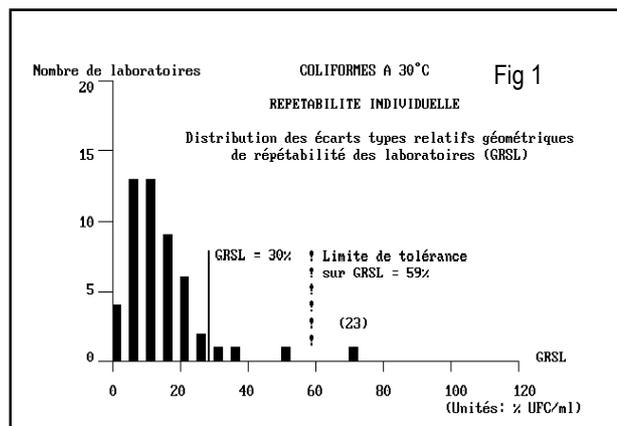
De même, la nouvelle limite de la cible n'est pas pénalisante pour le dénombrement des staphylocoques. Pour ce qui est des microorganismes à 30°C, visuellement elle paraît mieux correspondre à la séparation entre un ensemble de résultats groupés et d'autres résultats, réellement anormaux.

En conclusion, le rassemblement des résultats obtenus au cours de plusieurs essais interlaboratoires en microbiologie a permis de nouvelles estimations de la répétabilité et de la reproductibilité pour les critères microbiologiques et le calcul des valeurs de justesse correspondantes. Les observations ainsi faites ont montré la possibilité de réviser les limites de conformité actuelles et de proposer des limites communes à tous les critères microbiologiques, d'où une notable simplification de l'analyse des performances par les utilisateurs. Les nouvelles valeurs sont plus strictes en règle générale, à l'exception des limites de conformité pour la justesse des essais en dénombrement des microorganismes à 30°C. Dans ce cas, l'origine, les méthodes et les objectifs des différents laboratoires participants peuvent justifier d'élargir la tolérance actuelle (limites dans le cadre du paiement du lait). Quoiqu'il en soit, ces limites de conformité sont représentatives de la pratique effective et actuelle des laboratoires. Leur respect témoigne d'une bonne maîtrise des méthodes, compte tenu de leur précision actuelle.

Il apparaît toutefois indispensable d'examiner périodiquement la validité de ces limites par rapport aux possibilités des méthodes (nouvelles ou anciennes, améliorées), notamment dans un contexte où l'accréditation prend de plus en plus en compte les performances analytiques des laboratoires évaluées par des essais d'aptitude.

Fig 1 : répétabilité individuelle pour le dénombrement des coliformes dans le lait cru

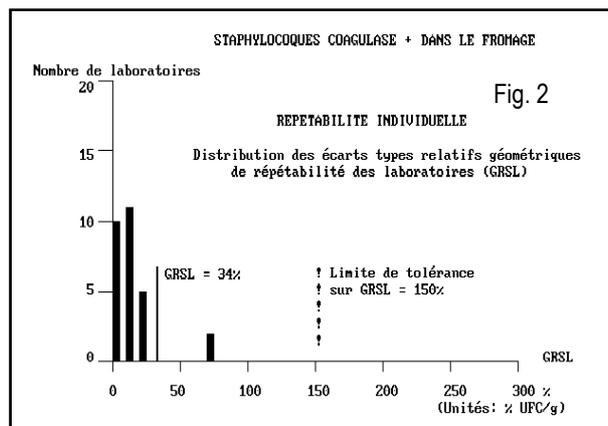
Fig 1 : individual repeatability for the enumeration of coliforms



GRSL : écart-type relatif géométrique, calculé par laboratoire :
 $GRSL = (10^{limSL} - 1) \times 100$,
 avec $limSL = 1.43$ Sr, pour 10 échantillons (microorganismes à 30°C et coliformes)
 et $limSL = 1.6$ Sr, pour 5 échantillons (*E. coli* et staphylocoques coagulase +).
 ex : pour $Sr = 0.08$ log, GRSL = 30% pour les coliformes

Fig 2 : répétabilité individuelle pour le dénombrement des staphylocoques coagulase + dans le fromage

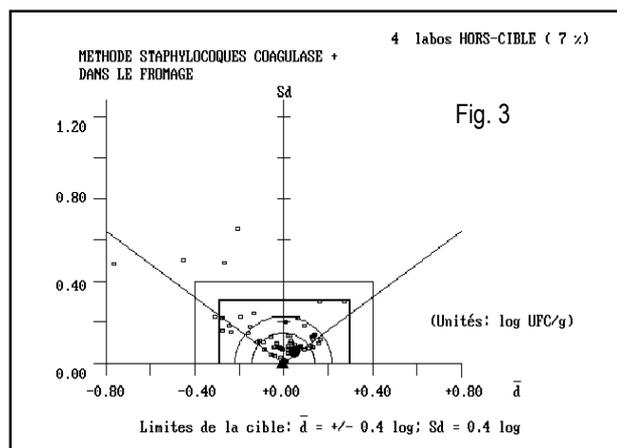
Fig 2 : individual repeatability for the enumeration of coagulase + staphylococci in cheese



GRSL : relative geometric standard deviation for each laboratory :
 $GRSL = (10^{limSL} - 1) \times 100$,
 with $limSL = 1.43$ Sr, for 10 samples (total flora and coliforms)
 and $limSL = 1.6$ Sr, for 5 samples (*E. coli* and coagulase + staphylococci).
 ex : for $Sr = 0.08$ log, GRSL = 30% for coliforms

Fig. 3 : justesse pour le dénombrement des staphylocoques coagulase + dans le fromage

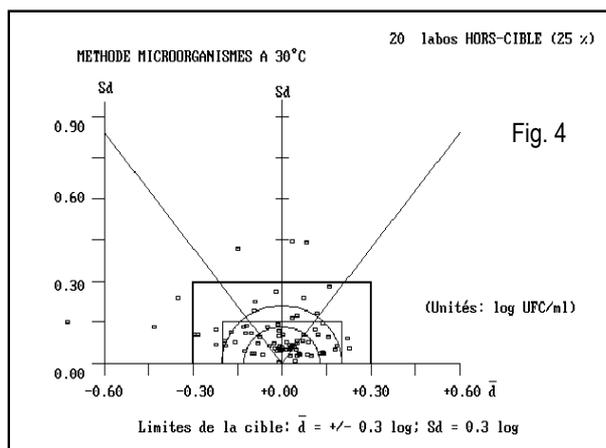
Fig 3 : accuracy for the enumeration of coagulase + staphylococci in cheese



ancienne limite de la cible de conformité : $\bar{d} = \pm 0,4$ log : trait plein vertical
 nouvelle limite de la cible de conformité : $\bar{d} = \pm 0,3$ log : trait plein vertical en gras

Fig 4 : justesse pour le dénombrement des microorganismes à 30°C dans le lait cru

Fig 4 : accuracy for the enumeration of the total flora in raw milk



old limit of the acceptability area : $\bar{d} = \pm 0.2$ log, : normal vertical line
 new limits of the acceptability area : $\bar{d} = \pm 0.3$ log, bold vertical line

