



Pas de classification

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

Document n° 328.fw

Préface

Le texte de cette directive a été rédigé par un groupe d'experts de la Confédération, des laboratoires cantonaux et du secteur privé qui a travaillé sous la direction du Service d'accréditation suisse (SAS). Il est basé sur les documents ISO/CEI 17025 (1), EURACHEM (2), les normes EN ISO 16140 (3), ISO 7218 (4), AOAC International Committee Guidelines (5, 6) et d'autres publications (7-31).

Groupe de travail :

A. BAUMGARTNER, Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern
T. BISCHOFBERGER, UFAG Laboratorien AG, 6310 Sursee
B. BISSIG-CHOISAT, Bundesamt für Veterinärwesen, 3003 Bern
M. DALLA TORRE, Agroscope Liebefeld-Posieux, 3003 Bern
H. EMCH, SAS, 3003 Bern
J.-L. GAFNER, Agroscope Liebefeld-Posieux, 1725 Posieux
Ph. HÜBNER, Kantonales Laboratorium Basel Stadt, 4012 Basel
R. MEYER, NESTEC SA., 1350 Orbe
Ch. MÜLLER, Kantonales Laboratorium, 5000 Aarau
P. SCHEFFELDT, SAS, 3003 Bern
U. SPAHR, Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern
R. STEPHAN, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, 8057 Zürich
U. WÄSPI, COOP Zentrallabor, 4133 Pratteln

Révision 03 par :

A. BAUMGARTNER, Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern
J.-L. GAFNER, Agroscope Liebefeld-Posieux, 1725 Posieux
J. HUMMERJOHANN, Agroscope Liebefeld-Posieux, 3003 Bern
Ch. MÜLLER, Amt für Verbraucherschutz, 5000 Aarau
B. PLASCHY, Schweizerische Akkreditierungsstelle, 3003 Bern
U. WÄSPI, Süsselab AG, 3052 Zollikofen

Révision 04 par :

C. Fricker-Feer, HOCHDORF Swiss Nutrition Ltd., 6281 Hochdorf
G. Gremaud, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, 3003 Bern
Ph. Hübner, Kantonales Labor Basel-Stadt, 4012 Basel
J. Hummerjohann, Agroscope Liebefeld, 3003 Bern
R. Meyer, Nestlé PTC Konolfingen, 3510 Konolfingen
Ch. Müller, Amt für Verbraucherschutz, 5000 Aarau
B. Plaschy, Schweizerische Akkreditierungsstelle, 3003 Bern
J. Schmid, Amt für Verbraucherschutz und Veterinärwesen, Kantonales Labor, 9001 St. Gallen

TABLE DES MATIERES

1.	Introduction	4
2.	Sélection, vérification et validation des méthodes	4
2.1.	Général.....	4
2.2.	Choix des méthodes	5
2.3.	Validation	6
2.4.	Domaine d'application	7
2.5.	Spécificité / spécificité relative	8
2.6.	Sensibilité / sensibilité relative	8
2.7.	Exactitude / exactitude relative	8
2.7.1.	Détermination à l'aide d'une deuxième méthode.....	8
2.7.2.	Détermination à l'aide de contamination artificielle (dopage)	9
2.7.3.	Détermination à l'aide de matériel de référence	9
2.8.	Précision	9
2.9.	Limite de détection	10
2.10.	Limite de détermination.....	10
2.11.	Concordance statistique.....	11
2.11.1.	Méthodes qualitatives	11
2.11.2.	Méthodes quantitatives	11
3.	Incertitude de mesure	12
3.1.	Estimation de l'incertitude de mesure de méthodes microbiologiques qualitatives.....	13
3.1.1.	Taux de faux-positifs	13
3.1.2.	Taux de faux-négatifs.....	13
3.2.	Estimation de l'incertitude de mesure de méthodes microbiologiques quantitatives	13
3.3.	Indication de l'incertitude de mesure	14
4.	Bibliographie	15
5.	Key words	17
Annexe -	Dispositions transitoires (valables jusqu'au 30 avril 2022) pour les méthodes du Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA)	18

1. Introduction

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

Ce guide décrit la marche à suivre pour la validation et l'évaluation de l'incertitude de mesure des méthodes microbiologiques.

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

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

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

Le présent guide ne concerne que la partie analytique ; pour ce qui est de la partie pré-analytique, se référer à la littérature [p. ex. échantillonnages spécifiques aux produits et quantité du matériel à analyser : Codex Alimentarius (17), ICSMF (18), SAS (19), et pour l'eau de bains publics (20, 21)]. Il décrit la marche à suivre pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et de l'évaluation de l'incertitude de mesure pour un laboratoire unique (7).

2. Sélection, vérification et validation des méthodes

2.1. Général

La validation selon SN EN ISO 9000:2015 (16) est la « Confirmation par des preuves objectives que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévues ont été satisfaites ».

Le but de la validation d'une méthode d'essai est de démontrer par une traçabilité suffisante et des preuves tangibles qu'elle permet d'atteindre les spécifications définies.

La vérification selon SN EN ISO 9000:2015 (16) est la « Confirmation par des preuves objectives que les exigences spécifiées ont été satisfaites ».

2.2. Choix des méthodes

L'ampleur de la validation (choix des matrices, nombre d'échantillons, effort pour les critères individuels de validation) doit être en adéquation avec les utilisations prévues et les validations déjà effectuées.

Les sources possibles pour des méthodes déjà validées sont :

- a) Méthodes publiées comme norme internationale, nationale ou régionale (p.ex. ISO, EN, SN)
- b) Méthodes publiées par les autorités nationales ou internationales concernées (p.ex. Codex alimentarius, OFEV, EU)
- c) Méthodes publiées par les organisations nationales ou internationales (p.ex. AOAC, OIV, IFU)
- d) Méthodes issues de la littérature scientifique correspondante (p.ex. articles reconnus)
- e) Méthodes établies et validées par le producteur du dispositif d'essai ou par d'autres fournisseurs.
- f) Méthodes fournies par le client

Idéalement, la méthode devrait être validée par une étude conjointe selon un protocole reconnu au niveau international (ex. ISO 16140).

Si les résultats de la validation, c'est-à-dire les critères de performance sont disponibles et qu'ils prouvent que la méthode est apte à l'emploi envisagé, le laboratoire doit alors vérifier s'il peut reproduire les critères de performance pertinents pour l'emploi envisagé.

Le domaine d'utilisation (matrice, paramètre, domaine de mesure etc.) est défini dans la procédure. Il peut être restreint par le laboratoire.

Cela signifie que lors de l'introduction d'une méthode validée, une vérification doit être effectuée. Elle doit montrer qu'au minimum les critères de performance suivants sont adéquats et effectifs en interne :

- Le domaine d'application de la méthode est défini et connu du laboratoire.
- Les performances de la méthode (ex. selon les normes ISO, la littérature) sont connues et pour autant qu'elles soient disponibles. Voir table 1.
- Le laboratoire doit avoir participé avec succès à un test d'aptitude ou s'il n'est pas disponible à une comparaison interlaboratoire.
- Si aucune comparaison externe n'est possible, la précision interne au laboratoire (reproductibilité et précision au laboratoire) doit être déterminée.
- En principe, l'estimation de l'incertitude de mesure est considérée à ± 0.5 log pour les méthodes microbiologiques classiques (7).

Si des spécifications ne sont pas disponibles, le laboratoire doit les déterminer dans le cadre d'une validation selon le chapitre 2.3.

Lorsque des méthodes validées sont modifiées, les influences de ces changements doivent être établies. Il en va de même lorsque la méthode est utilisée en dehors des spécifications définies. Les modifications apportées doivent être validées.

2.3. Validation

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

Lors de la validation de méthodes, il faut distinguer entre les méthodes qualitatives et quantitatives.

A.) Analyse qualitative (décision oui/non)

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

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

Pour les méthodes destinées à vérifier les limites (limites légales, spécifications), l'effort de validation se concentre sur le voisinage de la limite en question. Un effort considérable est nécessaire pour des méthodes couvrant la teneur d'un micro-organisme sur un vaste domaine (par exemple le monitoring microbien dans l'environnement). En général, la validation complète d'une méthode et l'évaluation de son incertitude de mesure doit comporter les paramètres suivants (tableau 1) :

Tableau 1. Critères de validation et d'incertitude de mesure

<i>Critère</i>	<i>méthode qualitative</i>	<i>méthode quantitative</i>
Domaine d'application (2.4)	X	X
Spécificité (2.5)	X	X
Sensibilité (2.6)	X	X
Exactitude / Exactitude relative (2.7)	X	X
Précision (2.8)	X	X
Limite de détection (2.9)	X	
Limite de détermination (2.10)		X
Conformité statistique (2.11)	X	X
Taux de faux-positifs (3.1.1)	X	
Taux de faux-négatifs (3.1.2)	X	
Incertitude de mesure (3.2)		X

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

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

Les méthodes alternatives se valident en principe par comparaison de méthodes. Selon l'article 5 de l'Ordonnance sur l'hygiène (11), d'autres méthodes d'analyse sont autorisées pour autant qu'elles soient validées selon des protocoles reconnus au niveau international (p. ex. ISO 16140) et que leurs résultats conduisent aux mêmes jugements que ceux des méthodes de référence.

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

Figure 1. Tableau à 4 champs (29)

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

+ : *détection ou jugement positif*

- : *détection ou jugement négatif*

a : *nombre de résultats positifs pour les deux méthodes*

b : *nombre de résultats faux-négatifs par rapport à la méthode de référence*

c : *nombre de résultats faux-positifs par rapport à la méthode de référence*

d : *nombre de résultats négatifs pour les deux méthodes*

n : *nombre total de résultats d'analyse*

2.4. Domaine d'application

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

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

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

Les catégories de denrées alimentaires sont indiquées dans les annexes des directives AOAC (5, 6) et dans la norme ISO 16140 (3). Lors du choix des catégories spécifiques de denrées alimentaires pour la validation d'une méthode microbiologique, il faut tenir compte des connaissances de

la prévalence du microorganisme en question dans ces groupes spécifiques d'aliments, de même que de leur signification pour la santé humaine.

2.5. Spécificité / spécificité relative

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

Pour une méthode qualitative, la spécificité se mesure par $[d/(c+d)]$ 100 % et donne le pourcentage de tous les échantillons négatifs qui sont reconnus comme négatifs (voir figure 1, taux de faux-positifs).

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

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

2.6. Sensibilité / sensibilité relative

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

Pour une méthode qualitative, la sensibilité se calcule par $[a/(a+b)]$ 100 % et donne le pourcentage de tous les échantillons positifs qui sont reconnus comme positifs (voir figure 1, taux de faux-négatifs).

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

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

2.7. Exactitude / exactitude relative

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

2.7.1. Détermination à l'aide d'une deuxième méthode

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

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

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

2.7.2. Détermination à l'aide de contamination artificielle (dopage)

En l'absence de matériel de référence certifié et s'il n'existe pas de deuxième méthode, l'exactitude est déterminée à l'aide de contaminations artificielles (dopage). On ajoute le micro-organisme à déterminer à au minimum 10 échantillons. Puis les teneurs des échantillons éventuellement naturellement contaminés et ceux artificiellement contaminés sont déterminées.

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

Pour des méthodes quantitatives alternatives, on calcule la moyenne de toutes les différences (d) entre les valeurs des échantillons réellement contaminés et les résultats de la nouvelle méthode (voir tableau 3). Ce résultat ne doit pas être significativement différent de zéro (voir 2.11.2).

2.7.3. Détermination à l'aide de matériel de référence

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

2.8. Précision

La précision décrit les écarts aléatoires des valeurs autour d'une moyenne. On distingue la précision de répétabilité, de reproductibilité et de laboratoire.

Précision de répétabilité (répétabilité, repeatability, r) : On comprend la comparaison de résultats provenant de mesures répétées du même échantillon homogénéisé (après Stomacher) dans les mêmes conditions (mêmes personnes, laboratoires, équipements, réactifs, conditions d'environnement). La limite de répétabilité (« repeatability limit») est abrégée r .

Lors de l'évaluation de la répétabilité, le même échantillon contenant une quantité du germe ciblé dans le domaine de mesure, doit être analysé au minimum 5 fois dans les mêmes conditions et cela pour chaque matrice utilisée.

Pour les méthodes qualitatives, on calcule $r = x / n$

x = nombre de résultats concordants dans des conditions de répétabilité

n = nombre de mesures

Pour l'établissement de la limite de détection, $r = 0.5$ (voir 2.9).

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

Précision de reproductibilité (reproductibilité, reproducibility, R): On entend par reproductibilité, la comparaison des résultats obtenus avec la même méthode mais effectuée en dehors du laboratoire (ex. essai d'aptitude avec le même échantillon, à différents moments, dans différents laboratoires, par plusieurs personnes, avec différents équipements ou réactifs etc.).

La limite de reproductibilité (reproducibility limit) est obtenue à partir d'études de comparaison de méthodes. Lorsque de telles données sont disponibles à partir d'analyses en chaîne ou de tests d'aptitude (31), elles doivent être mentionnées dans les documents de validation. Comme cette reproductibilité ne peut être évaluée que lorsque plusieurs laboratoires sont impliqués, elle ne fait donc pas partie de ce guide.

Précision de laboratoire (intermediate precision): On entend par précision, la comparaison des résultats d'un même échantillon homogénéisé obtenus dans différentes conditions (plusieurs personnes, équipements de mesure différents, plusieurs jours, différents lots de réactifs etc.).

Remarque :

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

2.9. Limite de détection

La limite de détection de méthodes qualitatives décrit le plus petit nombre de microorganismes cibles qui peut être mis en évidence avec une assurance statistique donnée.

Pour l'estimation de la limite de détection de méthodes qualitatives, il faut tester pour chaque matrice au minimum trois concentrations de 4 souches différentes du microorganisme cible (teneur basse : de 1 à 10 UFC, teneur moyenne : de 10 à 100 UFC, teneur élevée : plus de 100 UFC). Les différentes matrices sont contaminées artificiellement, puis analysées à l'aide de la méthode à valider. Un contrôle négatif doit être analysé en parallèle.

Les résultats obtenus de l'analyse des échantillons contaminés artificiellement sont comparés avec la contamination réelle. La limite de détection est la valeur la plus basse pour laquelle, avec une probabilité de 50% (LOD₅₀), la teneur de l'échantillon est reconnue, c.-à-d. la concentration pour laquelle la moitié des résultats sont positifs (8, 9, 10, 12).

2.10. Limite de détermination

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

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

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

La norme ISO 7218 (4) donne des indications fondamentales selon les densités microbiennes totales et spécifiques, sur la manière d'obtenir des évaluations numériques statistiquement assurées pour une méthode microbiologique. Un résultat numérique n'est accepté généralement que

lorsqu'au moins 10 colonies sont dénombrées (à l'exception de produits d'analyse non dilués comme des eaux potables ou du lait).

2.11. Concordance statistique

2.11.1. Méthodes qualitatives

Pour la comparaison de méthodes qualitatives on dispose pour l'évaluation statistique de méthodes dites « non paramétriques » comme le test des 4 champs (par exemple : le test χ^2 selon McNemar) ou de la détermination de l'indice de concordance kappa. Comme dans l'application du test du χ^2 selon McNemar, la somme des résultats non concordants doit être au minimum 8 (voir figure 1, b+c), le calcul de l'indice de concordance kappa pour la validation de méthodes microbiologiques est proposé comme alternative au test χ^2 . En effet, la détection de bactéries pathogènes nécessite un grand nombre d'échantillons à analyser et/ou des différences nettes dans la sensibilité des deux méthodes.

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

$$\text{Kappa} = 2 (ad - bc) / [(a + c)(c + d) + (a + b) (b + d)] \text{ (voir figure 1).}$$

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

Tableau 2. Évaluation du degré de concordance kappa (28)

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

2.11.2. Méthodes quantitatives

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

Lorsque le nombre des microorganismes mesurés dépasse 100 UFC/g, il doit être transformé sous forme logarithmique avant l'évaluation statistique.

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

Tableau 3. Évaluation de méthodes quantitatives

Échantillon	Paires de valeurs dépendantes (résultats)		Différence (méthodes A-R)
	Méthode de référence, resp. contamination réelle (R)	Méthode à valider (A)	
1	X _{R1}	X _{A1}	d ₁
...			
i	X _{Ri}	X _{Ai}	d _i
...			
n	X _{Rn}	X _{An}	d _n
moyennes	\bar{x}_R	\bar{x}_A	$\bar{d} \pm s_d$

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

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

On peut tester à l'aide de l'intervalle de confiance de manière équivalente au t-test : la moyenne calculée des différences (\bar{d}) est vérifiée en calculant l'intervalle de confiance de 95% et sa comparaison avec la valeur théorique zéro :

Si $|\bar{d}| < \frac{t_{crit} \cdot s_d}{\sqrt{n}}$, alors il n'existe pas de différence significative entre les deux séries de mesures.

t_{crit} désigne la valeur critique des tableaux du test de Student pour un degré de liberté de n-1 (intervalle de confiance 95 % ; $t_{dfn-1; 0.975}$), s_d est l'écart-type des différences mesurées et n le nombre de paires de valeurs.

Pour estimer la corrélation entre deux méthodes, on peut aussi, à l'aide des dénombrements obtenus, effectuer une analyse de régression linéaire. La représentation graphique des résultats obtenus pour chaque échantillon par la méthode de référence et la méthode alternative, en utilisant l'abscisse pour la méthode de référence et l'ordonnée pour la méthode alternative, permet de détecter des valeurs aberrantes. Outre le graphique, le test des valeurs aberrantes de Cochran, le test de Dixon ou le test de Grubbs peuvent être appliqués (3, 10, 27, 29). Les deux méthodes sont équivalentes si l'équation de régression ne diffère pas significativement de la droite théorique « x=y ». Pour un intervalle de confiance de 95 %, la pente m de la droite de régression vaut 1.

Si $|m - 1| < t_{crit} \cdot s_m$, alors la pente m de la droite de régression n'est pas statistiquement différente de 1. Dans ce cas, t_{crit} désigne la valeur critique des tableaux du test de Student pour un degré de liberté de n-2 (intervalle de confiance 95 % ; $t_{dfn-2; 0.975}$), s_m désigne l'écart-type de la pente de la droite de régression.

3. Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure est « un paramètre lié au résultat d'une mesure, qui décrit le degré de variation des valeurs qui peuvent être raisonnablement associées à la grandeur mesurée » (21). L'incertitude de mesure résulte d'incertitudes déterminées expérimentalement et/ou d'incertitudes estimées. Elle doit tenir compte de l'ensemble du processus de la méthode. Si le résultat provient d'un échantillon homogénéisé, l'incertitude de mesure ne concerne que la partie analytique. Dans les autres cas, la partie pré-analytique doit aussi être prise en compte. Le rapport d'essai doit spécifier à quoi l'incertitude de mesure se rapporte.

L'investissement nécessaire à la détermination de l'incertitude de mesure dépend du problème analytique posé (22-28).

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

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

3.1.1. Taux de faux-positifs

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

Pour les méthodes qualitatives, le taux de faux-positifs se calcule par $[c/c+d]$ 100 % et donne le pourcentage des échantillons qui ont été considérés faussement positifs avec la méthode alternative (voir figure 1).

Les résultats faux-positifs doivent absolument être confirmés par des caractérisations supplémentaires des microorganismes.

3.1.2. Taux de faux-négatifs

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

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

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

Selon le guide EURACHEM (2), les analyses microbiologiques se classent généralement dans la catégorie d'essais qui exclut le calcul de métrologie et de statistique rigoureux de l'incertitude des mesures. En général, il est approprié de baser l'estimation de l'incertitude seulement sur les données de répétabilité et de reproductibilité (si disponibles). Idéalement l'exactitude (écart systématique, biais) devrait prendre en compte p.ex. les données tirées des résultats d'un plan d'un test d'aptitude (dans le cas où les matrices sont des denrées alimentaires !).

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

Toutes les méthodes d'analyse, donc également les méthodes microbiologiques, sont accompagnées d'une incertitude de mesure. Sur la base d'expériences provenant de tests d'aptitude, on peut estimer l'incertitude de mesure pour les méthodes en boîtes de petri (boîte coulée, inoculation en surface, technique par goutte). Cette incertitude de mesure équivaut en règle générale à \pm une demi-puissance de 10 ($\pm 0.5 \log$) (7).

Le laboratoire doit apporter la preuve du maintien de l'incertitude de mesure pour les méthodes quantitatives (ex. à l'aide de carte de contrôle pour les valeurs des essais d'aptitude).

3.3. Indication de l'incertitude de mesure

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

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

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

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

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

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

Prise en compte de l'incertitude de mesure pour les méthodes microbiologiques selon la loi sur les denrées alimentaires.

Selon les informations de l'Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires (OSAV), l'incertitude de mesure pour les paramètres microbiologiques est incluse dans les critères légaux.

4. Bibliographie

Validation

1. ISO/IEC 17025 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (ISO/IEC 17025: 2005).
2. EURACHEM Second Edition 2013 Accreditation for Microbiological Laboratories. <http://www.european-accreditation.org/publications>
3. ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
ISO/CD 16140-3 Microbiology of the food chain – Method validation – Part3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory.
4. ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. AOAC INTERNATIONAL Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation, J. AOAC Int. 82: 402-415 (1999).
6. *Feldsine, P., Abeyta, C. and Andrews, W. H.*: AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J. AOAC Int. 85: 1187-1200 (2002).
7. *Hübner, P., Gautsch, S. and Jemmi, Th.*: In House validation (Single Laboratory Validation) of Microbiological Methods. Mitt. Lebensm. Hyg. 93: 118-139 (2002).
8. MicroVal Rules and Certification Scheme Version 7 (October 2012). <http://www.microval.org/rules.html>
9. Protocole de Validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence Révision 2 – Adoptée par AFNOR Certification le 17 mai 2013. https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/04/NF148_Protocole-General-Validation_fr.pdf
10. NordVal Validation: Protocol for the validation of alternative microbiological methods (2009). <http://www.nmkl.org/NordVal/NordValprotocolmarch2009.pdf>
11. Ordonnance du DFI sur l'hygiène dans les activités liées aux denrées alimentaires (Ordonnance du DFI sur l'hygiène, OHyg) du 16 décembre 2016, SR 817.024.1 http://www.admin.ch/ch/f/rs/817_024_1/index.html
12. *Kromidas, Stavros*: Handbuch Validierung in der Analytik. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2. überarb. und erg. Auflage 2011.
13. *Berg, C., Dahms, S., Hildebrandt, G., Klatwchka, S. und Weiss, H.*: Microbiological collaborative studies for quality control in food laboratories: Reference material and evaluation of analyst's errors. Int. J. Food Microbiology 24, 41-52 (1994).
14. JCGM 200:2012, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). <http://www.bipm.org/en/publications/guides/>
15. ISO 13843:2000, Water quality – Guidance on validation of microbiological methods.

16. SN EN ISO 9000:2015, Qualitätsmanagementsystem – Grundlagen und Begriffe.

Echantillonnage

17. Codex Alimentarius CAC/GL 50-2004: General Guidelines on Sampling. <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/>
18. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): Microorganisms in Foods 2 – Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. Second edition, 1986. University of Toronto Press, Toronto, Canada. <http://www.icmsf.org/pdf/icmsf2.pdf>
19. Guide pour le traitement approprié de la partie pré-analytique des analyses microbiologiques dans le domaine de la production de denrées alimentaires. SAS document n° 333.fw, rév. 1, 2013.
20. Évaluation des eaux de baignade : recommandations concernant l'analyse et l'évaluation de la qualité des eaux de baignade (lacs et rivières). Publié par l'Office fédéral de l'environnement OFEV et par l'Office fédéral de la santé publique OFSP, Berne 2013.
21. SIA-Norm 385/9, Wasser und Wasseraufbereitungsanlagen in Gemeinschaftsbädern, 2011.

Incertitude de mesure

22. JCGM 100: 2008, Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), 2008. <http://www.bipm.org/en/publications/guides/>
23. EURACHEM / CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, third edition (QUAM:2012.P1). https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf
24. SN ENV 13005 Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen (Ausgabe 2000-07).
25. ISO/TS 19036: 2006/Amd 1: 2009: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (December 2004).
26. Niemelä, S.I.: Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Advisory Commission for Metrology, MIKES Publication J4/2003. http://www.mikes.fi/documents/upload/J4_2003.pdf
27. CCFRA. Microbiological measurement uncertainty: a practical guide. Guideline G47 (2004).
28. EA-4/16 G:2003 (rev.00). EA Guidelines on the Expression of Uncertainty in Quantitative Testing. <http://www.european-accreditation.org/publications>

Littérature complémentaire

29. Sachs, L.: Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin, 13. Auflage 2009.
30. Pichhardt, Klaus: Lebensmittelmikrobiologie – Grundlagen für die Praxis. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 4. überarb. Aufl. (1998).

31. ISO 17043: Évaluation de la conformité -- Exigences générales concernant les essais d'aptitude (ISO/CEI 17043:2010).

5. Key words

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

Annexe - Dispositions transitoires (valables jusqu'au 30 avril 2022) pour les méthodes du Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA)

Depuis le 1^{er} mai 2017, le MSDA ne peut plus être considéré comme standard national.

Les méthodes internationales mentionnées dans les ordonnances sont valables pour les paramètres microbiologiques d'hygiène.

Les méthodes MSDA qui sont dans la portée de l'accréditation d'un laboratoire doivent attester les spécifications suivantes :

- Le domaine d'application de la méthode (ex. matrice) est défini et connu du laboratoire.
- Les performances de la méthode sont connues et disponibles. Voir tableau 1.
- Le laboratoire doit avoir participé avec succès à un test d'aptitude ou s'il n'est pas disponible à une comparaison interlaboratoire.
- Lorsqu'aucune comparaison externe n'est possible, la précision interne au laboratoire (reproductibilité et précision au laboratoire) doit être déterminée.
- En principe, l'estimation de l'incertitude de mesure est considérée à ± 0.5 log pour les méthodes microbiologiques classiques (7).

Lorsqu'une méthode internationale reconnue existe pour le même paramètre qu'une méthode MSDA, elle doit être utilisée ou sa comparabilité doit être établie lors d'une validation.

* / * / * / * / *