Ensemble pour s'améliorer

NOTE TECHNIQUE N°13

TECHNIQUES DE CULTURE EN MICROBIOLOGIE DE L'EAU

MISE EN APPLICATION DE LA NF EN ISO 8199 VERSION 2018 RESUME, ILLUSTRATIONS ET COMMENTAIRES

Ce document est diffusé à titre informatif et ne peut en aucun se substituer à la norme ISO 8199:2018 - *Qualité de l'eau - Exigences et lignes directrices générales pour les examens microbiologiques sur milieu de culture*. Des exemples ont été choisis pour illustrer au mieux les concepts mais ne servent en aucun cas de référence.

Association AGLAE
Parc des Pyramides
427 rue des Bourreliers
59320 Hallennes lez Haubourdin
☎ 33 (0)3 20 16 91 40
contact@association-aglae.fr
www.association-aglae.fr

Rédacteurs :

- Mylène MARECHAL
- Olivier MOLINIER
- Eric PIERLOT

Sommaire

Sommaire 2
Domaine d'application : § 1 3
Références normatives : les changements majeurs : § 2 3
Paragraphe supplémentaire sur les termes et définitions suivants: § 3 4
Principe : § 4 4
Exigences générales concernant les mesurages : § 5 4
Diluants et milieux de culture: § 6 5
Stérilisation et décontamination : § 7 5
Echantillons et manipulation des échantillons : § 8 5
Méthodes de dénombrement : § 9 6
Ensemencement des prises d'essai dans (ou sur) un milieu solide : § 9.1 6
Technique par incorporation – En gras les modifications MAJEURES de la version 2018 6
Technique par étalement – En gras les modifications MAJEURES de la version 2018 7
Technique par filtration sur membrane – En gras les modifications MAJEURES de la version 2018 . 8
L'incubation - En gras les modifications MAJEURES de la version 2018 9
Numération et confirmation sur milieux solides : §9.1.6 10
Calcul et Expression des résultats : §9.1.7 et §9.1.8 13
Méthodes de calculs : numérations inhabituelles, estimées et non acceptables 19
Incertitude des résultats d'essai 20
Dénombrement en milieu liquide – §9.2 – les éléments marquants 21
Méthodes de détection (qualitatives) = présence / absence – §10 22
Caractéristiques de performances des méthodes – §11 23
Contrôle qualité de routine – §12 23
Annexe A (informative) : critère de choix de la technique 28
Annexe B (informative) : intervalles de confiance – numération de colonies et choix de la méthode de calcul pour les cas particuliers 28
Annexe C (normative) : numération et calculs avec 2 boîtes de Petri par dilution 29
Annexe D (normative) : composition, préparation et essai de performances des diluants 31
Glossaire des coefficients des formules mathématiques 32
Bibliographie additionnelle spécifique à cette note technique 32

Afin de répondre aux questions d'adhérents concernant l'application de la NF EN ISO 8199 (2018) - *Qualité de l'eau - Exigences et lignes directrices générales pour les examens microbiologiques sur milieu de culture*, nous vous proposons cette note technique.
Le présent document est destiné aux opérateurs microbiologistes pour les aider à vérifier les modifications intervenues entre la version 2008 et la version 2018 de la norme et pour les aider à appliquer les dispositions les plus récentes grâce notamment à des illustrations et à des exemples numériques.
Ce document ne se substitue en aucun cas aux dispositions décrites dans la norme NF EN ISO 8199 (2018) elle-même. Ce document ne se veut pas exhaustif vis-à-vis des modifications apportées à la norme, mais il a pour objectif d'énumérer et d'illustrer les principaux changements intervenus.

Ce document reprend les modifications jugées mineures et majeures de la NF EN ISO 8199 (2018) dans l'ordre de présentation de la norme. Afin de faciliter la lecture, les modifications mineures sont soulignées et les **modifications majeures sont mises en gras**. A noter que tout au long du document des notes A.G.L.A.E sont insérées afin de vous apporter un maximum d'éléments sous le format :

Note A.G.L.A.E.

N'hésitez pas à nous faire part de vos retours (appréciations sur le document, besoins d'explication…)

Nous remercions vivement les membres de la Commission Technique pour leur relecture avisée de cette note technique avant sa publication : Mr Adjidé, Mr Carlier, Mme Charbonnier, Mme Darcis, Mr Oudart et Mr Vautor.

DOMAINE D'APPLICATION : § 1

- Ajout de lignes directrices sur l'appareillage général et la verrerie
- Ajout de la description de techniques pour la détection et le dénombrement des germes
- Modification de « champignons » en « moisissures » et ajout des bactériophages pour certains aspects du document
- Note sur l'exclusion des techniques ne reposant pas sur la culture de micro-organismes, comme les méthodes de biologie moléculaire (PCR)

REFERENCES NORMATIVES : LES CHANGEMENTS MAJEURS : § 2

- Ajout de l'ISO 7704 - Evaluation des membranes filtrantes utilisées pour des analyses microbiologiques
- Ajout de l'ISO 11133 - Préparation, production, stockage et essais de performances des milieux de culture
- Suppression de l'ISO 3696 : 1987 – Eau pour laboratoire à usage analytique – Spécification et méthodes d'essai

Note A.G.L.A.E.

Si une norme « méthode » ou norme analytique existe, les exigences ou lignes directrices spécifiques de celle-ci prévalent sur celles mentionnées dans la norme NF EN ISO 8199 (2018) qui reste une norme générale.

PARAGRAPHE SUPPLEMENTAIRE SUR LES TERMES ET DEFINITIONS SUIVANTS: § 3

- Exactitude ; biais ; numération confirmée ; numération ; niveau de détection ; reproductibilité intralaboratoire (coquille typographique en version FR indiquant interlaboratoires) ou fidélité intermédiaire ; limite de détermination ; fidélité ; numération présomptive; écart-type relatif ; répétabilité (ou répétabilité de mesure) ; conditions de répétabilité ; reproductibilité (ou reproductibilité de mesure) ; conditions de reproductibilité ; prise d'essai ; échantillon pour essai ; justesse ; incertitude de numération.

PRINCIPE : § 4

- Ajout de la façon dont l'échantillon d'eau a été manipulé (par filtration sur membrane ou par centrifugation).

EXIGENCES GENERALES CONCERNANT LES MESURAGES : § 5

- Ajout de la température d'incubation **44 ±0,5 °C**

Note A.G.L.A.E.

*Note à l'attention des laboratoires accrédités LAB GTA 23 : la spécification d'incubation **44 ±1°C** est acceptable, suite à une décision de l'AFNOR T90D (note AFNOR N-850) reprise dans le § 7.6.1 du LAB GTA 23 (Révision 03)*

- Ajout de la température de maintien des milieux en surfusion : **de 44°C à 47°C**
- Retrait du paragraphe des températures de stérilisation
- Diminution des tolérances critiques des **volumes et des masses à 2%** (afin de réduire au minimum l'incertitude des résultats d'essais)

Il est précisé que la gamme acceptée de toute valeur mesurée est de ±2% lorsque la valeur indiquée est critique pour les performances et les résultats d'essais. Et que la gamme acceptée de toute valeur mesurée est de ±5% lorsqu'il a été montré que la valeur indiquée n'est pas critique pour les performances et les résultats d'essais.

Note A.G.L.A.E.

A titre illustratif, parmi les normes référentes sur la question de l'incertitude en microbiologie de l'eau, la norme ISO 29201 présente dans le § G.4.1.3 un exemple indiquant une incertitude-type relative de reproductibilité (intralaboratoire) de mesurage d'un volume de 1 ml $u_{rel,V}$ = 0,016 (1,6 %). Concernant la problématique de volumétrie sur les entonnoirs de filtration, une note technique dédiée à ce sujet est en cours de rédaction à A.G.L.A.E..

DILUANTS ET MILIEUX DE CULTURE: § 6

- **Ajout de la référence à l'ISO 11133 :** exigences relatives à la préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture
- Vérification de la qualité des milieux de culture, des diluants, des membranes filtrantes et des réactifs avant utilisation
- Détails des compositions, préparations et essais de performances des diluants désormais présentés en Annexe D (normative)

STERILISATION ET DECONTAMINATION : § 7

✓ Stérilisation d'appareillage et de verrerie :

- Ajout du § : Certains articles instables à la chaleur peuvent nécessiter une stérilisation par d'autres moyens (par exemple, lumière ultraviolette ou irradiation), mais ces méthodes ne sont pas employées en routine

✓ Stérilisation des consommables :

- Possibilité d'utilisation d'équipements /matériels jetables stériles si les spécifications sont similaires
- Ajout de précision sur la stérilisation par chaleur humide de membranes filtrantes fournies non stériles

✓ Décontamination de la verrerie et du matériel après utilisation :

- Recommandation d'utilisation de récipients appropriés pour le matériel destiné à la décontamination et à l'élimination
- Détails sur les modalités d'autoclavage, méthode privilégiée de décontamination :
  - Autres procédés admis : immersion dans du désinfectant fraichement préparé et à la dilution appropriée (équipements de petite taille résistant à la corrosion)
  - Voir EPI et instructions fournisseurs

✓ Gestion des déchets (partie intégrante de la bonne gestion du laboratoire)

- Recommandation d'établissement d'un système d'identification et de séparation des déchets (non contaminés, objets tranchants, matières contaminées pour autoclavage, recyclage ou élimination)
- Exigences pour les micro-organismes de catégorie de risque 3 : matières contaminées et récipients à autoclaver avant incinération

ECHANTILLONS ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS : § 8

✓ Echantillonnage :

- Précision sur le recueil des échantillons d'eau désinfectés dans des flacons d'échantillons contenant un agent neutralisant adapté et en quantité suffisante.

✓ Ajout sur la préparation des échantillons :

- Recommandation portant sur la séparation des eaux propres et des eaux sales : équipements distincts, zones distinctes, ou analyses des eaux propres avant celles des eaux sales (réduction du risque de contamination croisée)
- Homogénéisation de l'échantillon : inversions de l'échantillon ou mouvements de va et vient
- Mise à jour du volume utilisé pour les dilutions : neuf volumes du diluant et un volume de l'échantillon d'eau dans des flacons ou des tubes stériles
  - *La version 2008 de la norme indiquait 90 mL ou 9 mL de diluant*
- Possibilité d'utiliser des volumes de diluant stérilisé
  - (Vérification des volumes après autoclavage).
- Pour les hautes concentrations de l'organisme cible attendues : possibilité d'utiliser des facteurs de dilution d'ordre 100 en mélangeant un volume d'échantillon d'eau avec 99 volumes de diluant avec rajout de réserves possibles quant à la fiabilité des résultats

✓ Rajout d'un paragraphe sur l'échantillonnage par écouvillon :

- Type d'utilisation et types d'écouvillon
- Préparation des cotons tiges
- Préparation des écouvillons éponges
  - Recommandés dans le cas d'un essai qualitatif

METHODES DE DENOMBREMENT : § 9

Ensemencement des prises d'essai dans (ou sur) un milieu solide : § 9.1

Cité dans les § 9.1.2.2, 9.1.3.2 et 9.1.4.2

➢ **Le nombre maximal acceptable de colonies cibles dépend de :**

- **La méthode spécifique**
- **La taille et la nature des colonies**
- **La présence de colonies non cibles**
  - *Ce nombre peut être défini par une vérification de méthodes*
  - *Les éléments à prendre en compte sont différents pour les boîtes les plus grandes*

Technique par incorporation – En gras les modifications MAJEURES de la version 2018

✓ Prise d'essai : volume échantillon ou dilution peut varier de 0,1 mL à 5 mL selon les dimensions de la boîte de Petri et le volume de milieu de culture.

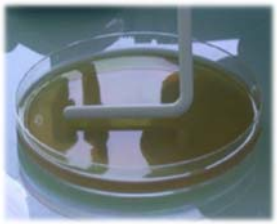
✓ Fondre le milieu

✓ **Desserrer les bouchons avant chauffage,**

- ✓ Eviter la surchauffe et retirer le milieu dès qu'il est fondu
- ✓ Milieu fondu maintenu **entre 44 et 47°C pendant un temps suffisant (selon le volume et le nombre de récipients). Temps nécessaire à vérifier en interne avec toutes les quantités et les volumes utilisés en routine.**
- ✓ Ne pas maintenir un milieu en surfusion **thermosensible** pendant plus de 4h (ou selon la norme analytique spécifique). **Au-delà, la qualité du milieu pourrait être réduite.**
- ✓ **Bains d'eau thermostatés : source de contamination potentielle : recommandation de changements réguliers de l'eau et nettoyages pour réduire le risque**
- ✓ Extérieur flacons ou tubes de milieu tempéré à sécher et cols à flamber
- ✓ Milieu à ajouter dans la boîte de Petri en évitant de le verser directement sur la prise d'essai (réduction du choc thermique). Volume de **(18 mL ± 2 mL)** de milieu pour une prise d'essai allant **jusqu'à 1 mL** dans une boîte de Petri de **90 mm**. **Minimum de 10 mL de milieu si échantillons en sachet pour incubation et si le laboratoire démontre que cette méthode est adaptée.**
- ✓ Homogénéisation soigneuse pour une répartition homogène des micro-organismes

Technique par étalement – En gras les modifications MAJEURES de la version 2018

- ✓ Dépôt et étalement à la surface d'un milieu gélosé sans trace d'humidité **à l'aide d'un instrument stérile en évitant les bords de la gélose**
- ✓ **Le nombre maximal de colonies sur une boîte de 90 mm (à la fois cibles et non cibles) est généralement considéré comme étant de 300**
- ✓ Volume de milieu **de (18 mL ± 2 mL)** pour une prise d'essai allant jusqu'à 1 mL dans une boîte de Petri de 90 mm. **Pour les périodes d'incubation prolongées, volume plus important nécessaire (voir ISO 11133)**



- ✓ Boîtes à laisser **15 min au maximum** sur la paillasse pour permettre à l'inoculum d'être absorbé avant incubation

- ✓ Les points soulignés dans la version précédente de la norme concernant le séchage des boîtes sont les mêmes :
  - o Degré d'humidité
  - o Cas d'omission volontaire du séchage en cas de boîtes sèches et de bactéries non proliférantes
  - o Choix de la température ou de la durée de séchage
  - o Boîtes séchées si possible une fois retournées (avec le milieu de culture vers le bas)

- ✓ **Possibilité de sécher les boîtes sur la paillasse avec temps de séchage possiblement plus longs. La conservation des boîtes retournées avec**

couvercles pendant une nuit à température ambiante est possible si ergots d'aération et boîtes fraichement préparées

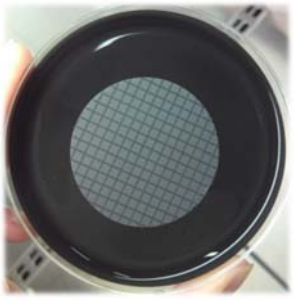
- ✓ **Ensemenceurs en spirale :**
  - o **Volumes plus faibles : la limite de détermination est augmentée**
  - o **Pas toujours adaptés aux champignons**

Technique par filtration sur membrane – En gras les modifications MAJEURES de la version 2018

- ✓ Volume maximal filtré dépend de la filtrabilité de l'échantillon d'eau et des membranes filtrantes utilisées.
- ✓ Membranes filtrantes généralement utilisées 0,45 µm (norme analytique spécifique : 0,20 µm)
- ✓ **Ajout de détails sur l'appareil de filtration :**
  - o **L'évaluation de l'adéquation des types de membranes et lots avant utilisation est décrite dans l'ISO 7704**
  - o **Description de l'appareil de filtration : rampe, robinet, bases de filtration, source du vide (environ 70kPa), recueil de l'eau filtrée, entonnoirs stériles gradués et adaptés pour les volumes analysés (usage unique, réutilisable si autoclavage ou désinfection par ébullition ou par passage à la flamme. Autres techniques de stérilisation possibles selon la norme analytique spécifique ou après vérification que la technique est acceptable)**

  - o **Désinfection des entonnoirs par ébullition non recommandée pour les micro-organismes produisant des spores**

    Note AGLAE : un flambage est davantage recommandé dans ce cas
- ✓ Membrane filtrante stérile positionnée sur le disque poreux de la rampe à l'aide d'une pince stérile.
- ✓ Positionner l'entonnoir stérile sur la rampe
- ✓ Introduire un volume homogénéisé d'échantillon ou d'une dilution (robinet fermé) ou si nécessaire la prise d'essai additionnée d'un diluant (en amont dans un flacon stérile ou directement dans l'entonnoir) pour un volume minimal de 10 mL



- ✓ Ouvrir le robinet et appliquer le vide pour réaliser la filtration
- ✓ Fermer le robinet
- ✓ Possibilité de rincer l'entonnoir, le filtre encore en place **afin d'éliminer les micro-organismes adhérant à l'entonnoir. Possibilité d'exercer une pression positive dans certaines circonstances (ex légionelles)**
- ✓ **Ajouts de détails sur le transfert de la membrane:**
  - o **Côté quadrillé vers le haut sur milieu gélosé dans une boîte de Petri**
  - o **Côté quadrillé vers le bas ou vers le haut dans une boîte de Petri ou sur 5 à 10 mL de milieu gélosé dans une boîte de Petri 50 mm ou 90 mm (pour les organismes anaérobies); recouvrir ensuite la membrane de milieu gélosé fondu (44°C à 47°C) aussi vite que possible pour éviter le séchage de la membrane et un contact excessif avec l'air**

- ✓ **Ajout de la possibilité d'une désinfection de l'entonnoir par immersion dans un bain d'eau en ébullition pour réutilisation**
- ✓ **Techniques de transfert de membrane avec des milieux liquides ou des diluants :**
  - o **Selon les normes analytiques spécifiques, possibilité de placer la membrane filtrante avec le côté quadrillé vers le haut sur un pad en papier absorbant stérile** préalablement saturé en milieu liquide ou un pad de milieu déshydraté reconstitué avec de l'eau stérile dans une boîte de Petri
  - o **Certaines méthodes (culture NPP, méthodes qualitatives…) : transfert direct de la membrane dans un bouillon de pré-enrichissement ou d'enrichissement**
  - o **Possibilité d'utiliser la membrane filtrante dans le cadre d'une étape de concentration**

L'incubation - En gras les modifications MAJEURES de la version 2018

- ✓ Les boîtes ensemencées sont à retourner et à placer dans un incubateur.
- ✓ Ne pas empiler plus de 6 boîtes de *Petri*
- ✓ **Laisser un espace entre les piles de boîtes (circulation d'air)**
- ✓ **Nombre supérieur à 6 boîtes peut être empilé dans des supports ou jarres spécialement conçus si des incubateurs ventilés sont utilisés et si le maintien de température correcte pendant le temps nécessaire à l'incubation est vérifié**.

- ✓ **Ne pas retourner les boîtes de micro-organismes produisant des spores au-dessus de la surface** (au même titre que celles contenant des membranes sur pad en papier absorbant)
  - ▪ ***Il est noté que fermer hermétiquement les boîtes peut contribuer à éviter la propagation de spores de moisissures***
- ✓ **Pour l'incubation en anaérobie : il est recommandé l'utilisation d'un incubateur anaérobie ou d'une jarre anaérobie étanche à l'air contenant un générateur anaérobie de taille adaptée au volume de la jarre ainsi qu'un moyen adapté de vérification des conditions anaérobies**

SUPPRESSION PAR RAPPORT A LA VERSION 2008 : Le paragraphe concernant la pré-incubation des boîtes d'une durée variable à une température moins élevée pour permettre une revivification des germes en état de stress a été supprimé*.

**Cette suppression ne concerne pas « les membranes filtrantes incubées durant une période limitée (2 h ou 4 h, par exemple) sur un milieu de revivification », paragraphe conservé dans la version 2018.*

Dans le cadre d'essais de vérification, de caractérisation, de recherches ou autre, la prise d'essai doit permettre une numération optimale. En ce sens, il est recommandé que la prise d'essai retenue conduise à un dénombrement sur une ou plusieurs boîtes de :

- ✓ **Boite de 90 mm – *recommandé* -**
  - o **nombre total de colonies (cibles et non cibles) ≤ 300 colonies**
  - o **nombre de colonies cibles > 10 colonies**
- ✓ **Boîte de 47 mm – *recommandé* -**
  - o **nombre total de colonies (cibles et non cibles) ≤ 80 colonies**
  - o **nombre de colonies cibles > 10 colonies**

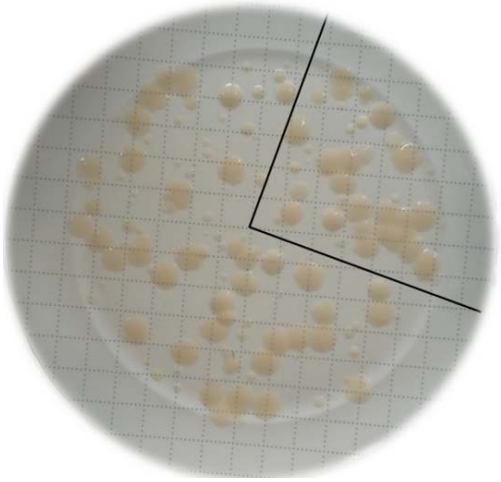
Note A.G.L.A.E.

Il est recommandé pour une analyse de routine de dénombrer toutes les boîtes réalisées, le résultat lu sera à interpréter à la fois en considérant le dénombrement obtenu mais également selon l'incertitude liée au niveau de charge bactérienne effectif de l'échantillon.

NUMERATION ET CONFIRMATION SUR MILIEUX SOLIDES : §9.1.6

- ✓ Milieux non sélectifs, toutes les colonies sont dénombrées
- ✓ Milieux sélectifs et différenciés : seules les colonies avec un aspect typique sont à dénombrer
- ✓ <u>Cas difficiles de lecture (colonies qui s'étalent)</u> :
  - o Si moins de ¼ de la boîte est envahi par étalement=> Dénombrer la portion non concernée et calculer par extrapolation le nombre théorique de colonies sur la totalité de la boîte.

Exemple A.G.L.A.E.:



La boîte obtenue pour une analyse de routine est celle présentée ci-contre, Il est possible de dénombrer correctement sur les ¾ de la boîte => Par exemple : si n = 45 colonies

Extrapolation pour le calcul du nombre théorique total sur toute la boîte :

Par exemple : $N=\frac{45}{3/4}$ = 60 colonies sur la boîte

- Si plus de ¼ de la boîte est envahi => rejeter la numération

✓ Ajout d'une précision : une chaine de colonies = 1 unité formant colonie

✓ **Sélection des colonies pour confirmation** : l'approche adoptée tient compte de l'objectif de l'essai.

- Essais de comparaison ou investigations : de préférence, confirmer **l'ensemble des colonies** (cibles et non cibles)

Note A.G.L.A.E.

Note à l'attention des laboratoires souhaitant mettre en place la vérification d'une méthode nouvellement mise en œuvre selon l'ISO 13843 (2017) : la confirmation de l'ensemble des colonies s'applique pour la détermination des caractéristiques de performance de catégories (sensibilité, spécificité, sélectivité…)

- Dans des exemples de surveillance ou recherche : la diversité des colonies cibles peut être privilégiée à une numération confirmée précise
- Dans le cadre d'une analyse de routine : si les colonies sont nombreuses, il n'est pas réalisable de confirmer l'identité de la totalité d'entre elles
  - Isoler **toutes** les colonies cibles présomptives lorsque le nombre total est compris entre 1 et 10 colonies

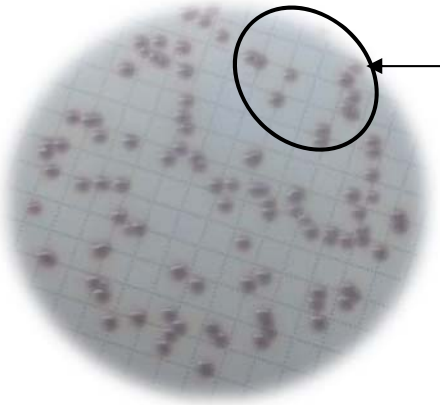
Exemple A.G.L.A.E.:

Ci-contre, 5 colonies comptées sur la boîte

=> 5 colonies à repiquer pour CONFIRMATION

  - Si le nombre de colonies cibles présomptives est > 10, il convient de prélever **au moins 10 colonies** cibles présomptives
    - Si 1 seul type de colonies cibles présomptives => prélever **au moins 10 colonies d'une portion de surface donnée de la boîte** ou de la membrane pour éviter une sélection subjective.

Exemple A.G.L.A.E.:



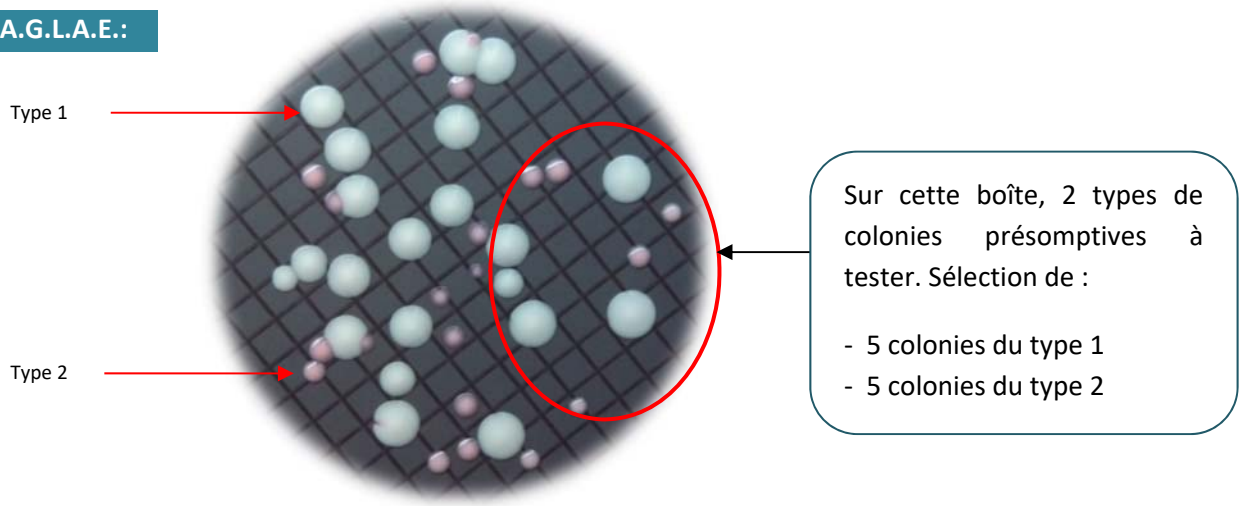
Au moins 10 colonies à repiquer sur une portion de surface donnée.

- <u>Si plusieurs types</u> : confirmer **au moins 3 colonies par type** de colonies cibles présomptives. *A noter que si pour 1 type de colonies, moins de 3 colonies sont observées, la totalité (1 ou 2) des colonies sont à confirmer sauf indication contraire dans une norme analytique spécifique*.

Note A.G.L.A.E.

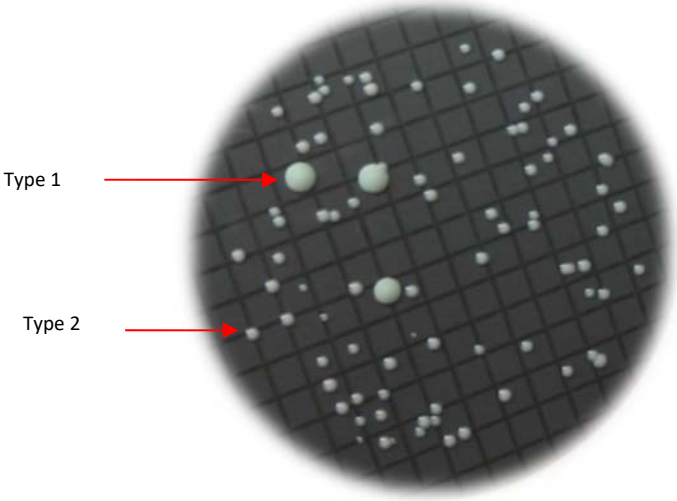
<u>Le nombre de colonies à repiquer et la stratégie à adopter pour le repiquage ont fait l'objet de très longs débats au sein des instances normatives.</u> La proposition adoptée considère à la fois l'expertise microbiologique à même de distinguer les différents types de colonies présomptives et l'approche statistique de prélèvement au hasard de colonies présomptives. Ce dernier aspect garantit l'obtention d'un échantillonnage aléatoire fiable, base de tout calcul d'incertitude de mesure par exemple.

Exemple A.G.L.A.E.:



Sur cette boîte, 2 types de colonies présomptives à tester. Sélection de :

- 5 colonies du type 1
- 5 colonies du type 2



Sur cette boîte, 2 types de colonies présomptives à tester. Sélection de :

- 3 colonies du type 1
- 7 colonies du type 2

Note A.G.L.A.E.

<u>Note à l'attention des laboratoires agréés dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux en France :</u> Seule la norme NF EN ISO 16266 (2008) : Qualité de l'eau - Détection et dénombrement de Pseudomonas aeruginosa - Méthode par filtration sur membrane, qui cite exclusivement l'ISO 8199 dans le § 8.5 – confirmation, est concernée par cette mise à jour des pratiques de sélection des colonies pour confirmation. Les autres normes analytiques spécifiques mentionnent le nombre de colonies à confirmer.

CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS : §9.1.7 ET §9.1.8

Note A.G.L.A.E.

<u>Rappel :</u> Il est recommandé pour une analyse de routine de dénombrer toutes les boîtes réalisées, le résultat lu sera à interpréter à la fois en considérant le dénombrement obtenu mais également selon l'incertitude liée au niveau de charge bactérienne effectif de l'échantillon.

✓ Pour permettre **l'expression optimale d'un résultat quantitatif**, l'application des règles ISO 8199: 2018 indique :

- **Boîte de 90 mm :**
  - **nombre total de colonies (cibles et non cibles) ≤ 300 colonies***
  - **nombre de colonies cibles > 10 colonies****
- **Boîte de 47 mm :**
  - **nombre total de colonies (cibles et non cibles) ≤ 80 colonies***
  - **nombre de colonies cibles > 10 colonies****

**Sauf précision dans la norme analytique*

***Ce seuil en-deçà duquel la fidélité diminue très rapidement correspond à la limite de détermination (voir page 16/31 du présent document)*

- ✓ Les limites présentées dépendent de plusieurs facteurs (la méthode, la taille et l'aspect des colonies cibles) et peuvent être basées sur un exercice de vérification de la méthode.

Note A.G.L.A.E.

Par exemple : dans le cadre d'une vérification de méthode, la norme NF EN ISO 13843 (2017) détaille le plan d'expérience à réaliser pour évaluer l'incertitude due aux comptages de colonies cibles pour une méthode nouvellement mise en œuvre. Des valeurs guides de 3% et 10% de variation relative (écart-type relatif) sont précisées en tant que valeurs acceptables selon le plan d'expérience réalisé.

- ✓ Si les boîtes sont de diamètres différents : le nombre maximal de colonies à dénombrer est à adapter proportionnellement à la surface des boîtes. Exemple : étalement ou incorporation
  - o Boîtes 55 mm -> nombre maximal de colonies dénombrables : 110 colonies
  - o Boîtes 140 mm -> nombre maximal de colonies dénombrables : 730 colonies

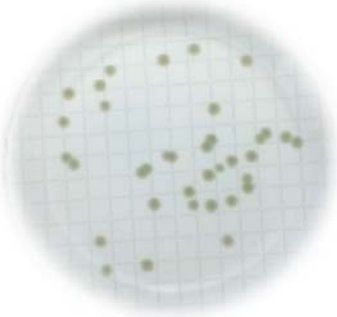
- ✓ La réalisation de boîtes en double augmente la fidélité et peut permettre une détection plus rapide d'éventuelle(s) dérive(s). Cas des doubles boîtes détaillé en Annexe C de la norme.

Note AFNOR

Spécification provenant de la Commission AFNOR T90D et datée du 12/06/2019 : Les protocoles analytiques précisés dans les normes analytiques spécifiques restent identiques. Il n'est pas nécessaire de faire des boites en double. Ce document prévoit seulement la possibilité d'analyse avec des boites en double mais n'en impose pas la réalisation (sauf si précisé dans la norme analytique)

- ✓ **Exemples de cas de numération sans confirmation** (milieu non sélectif – *Non illustré dans la présente Note Technique* - milieu sélectif avec des colonies cibles sans nécessité de confirmation…)

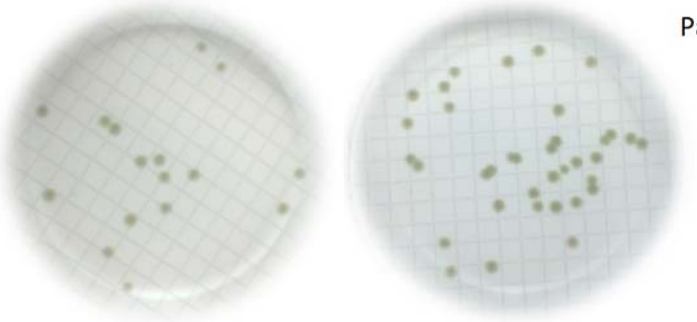
Exemple A.G.L.A.E. : Analyse en routine selon la NF EN ISO 16266 (08) de 100 mL d'échantillon d'eau



Par exemple, dénombrement de 36 colonies cibles (*Pseudomonas aeruginosa*) pour 100 mL d'échantillon d'eau filtré

N = 36 UFC / 100 mL

Exemple A.G.L.A.E.: analyse de deux volumes (respectivement 10 mL et 20 mL)



Par exemple, dénombrements de 18 et 36 colonies (*Pseudomonas aeruginosa*) par volume d'échantillon d'eau filtré

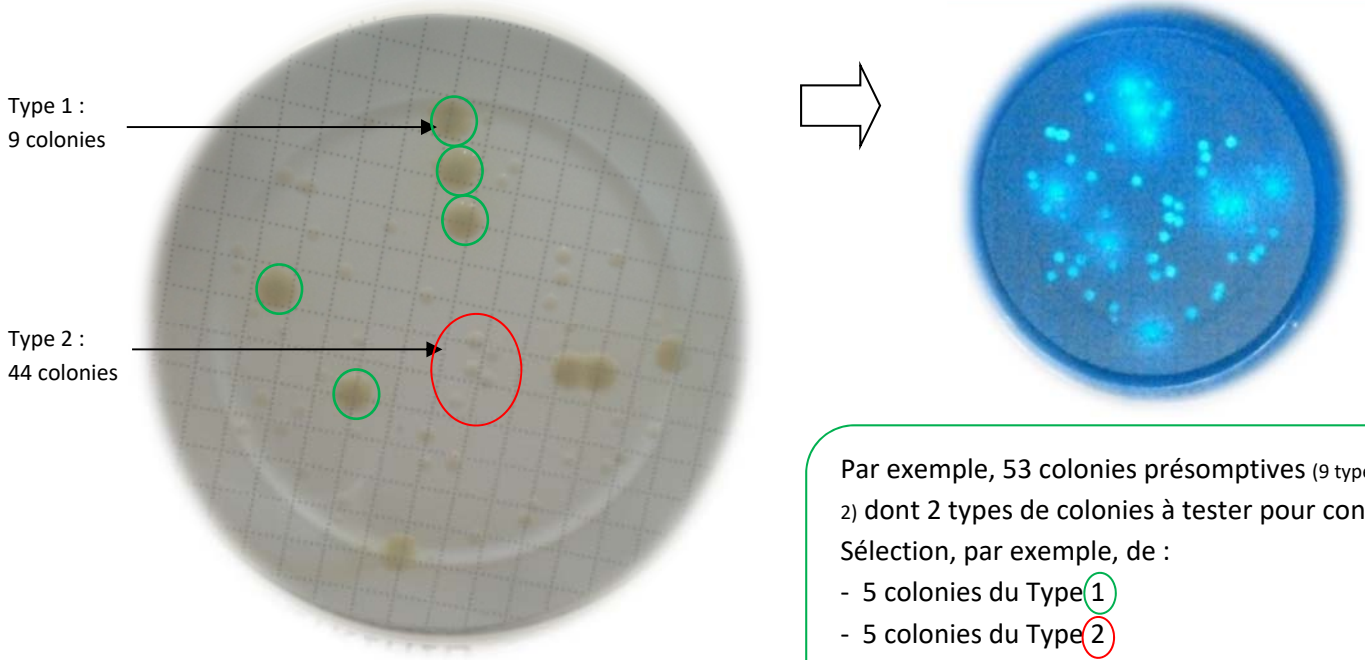
$$N = \frac{\sum C}{\sum V} \times V_s = \frac{18+36}{10+20} \times 1000 = 1\,800 \text{ UFC/L}$$

Note A.G.L.A.E.

Par extension, dans cet exemple, supposons que le protocole analytique prévoit l'utilisation additionnelle d'autres volumes et d'autres boîtes dont les comptages sont 8 colonies et 82 colonies. Ces deux dénombrements de 8 et 82 colonies ne seraient pas retenus pour l'expression du résultat final car l'incertitude sur un nombre de colonies <10 ou >80 est considérée comme ne permettant pas de fournir un résultat quantitatif fiabilisé.

✓ **Exemples de cas de numération avec confirmation** (milieu sélectif avec des colonies cibles nécessitant une confirmation…)

Exemple A.G.L.A.E. : analyse de routine selon la NF EN ISO 16266 – Filtration de 100 mL sur milieu cétrimide



Par exemple, 53 colonies présomptives (9 type 1 et 44 type 2) dont 2 types de colonies à tester pour confirmation.
Sélection, par exemple, de :
- 5 colonies du Type 1
- 5 colonies du Type 2

pour réalisation des tests de confirmation des 2 types

Résultats des tests de confirmation :

- Type 1 = 5 colonies Acétamide + confirmées *Ps. aeruginosa* $a = \frac{b}{A} \times C = \frac{5}{5} \times 9 = 9$ UFC/100 mL de *Ps. aeruginosa*

- Type 2 = 5 colonies Acétamide - non confirmées $a = \frac{b}{A} \times C = \frac{0}{5} \times 44 = 0$ UFC/100 mL de *Ps. aeruginosa*

$$N = \frac{\sum a}{\sum v} \times V_S = \frac{9}{100} \times 100 = 9 \text{ UFC/100 mL de } \textit{Ps. aeruginosa}$$

- Dans le cas où plusieurs boîtes sont réalisées – Même exemple que ci-dessus mais avec 4 volumes filtrés selon NF EN ISO 16266 – Filtration de 100 mL, 120 mL, 150 mL et 180 mL sur milieu cétrimide
  - 100 mL => Type 1 = 9 colonies et Type 2 = 44 colonies
  - 120 mL => Type 1 = 11 colonies et Type 2 = 54 colonies
  - 150 mL => Type 1 = 14 colonies et Type 2 = 65 colonies
  - 180 mL => Type 1 = 16 colonies et Type 2 = 77 colonies

Moins de 10 colonies cibles

Plus de 80 colonies cibles et non cibles

Toutes les colonies du type 1 sont confirmées et toutes les colonies du type 2 ne sont pas confirmées.

Seuls les résultats obtenus pour les volumes filtrés de 120 mL et 150 mL sont donc exploitables, soit :

$$N = \frac{\sum a}{\sum v} \times V_S = \frac{11+14}{120+150} \times 100 = 9{,}3 \text{ UFC/100 mL soit 9 UFC/100 mL de } \textit{Ps. aeruginosa}$$

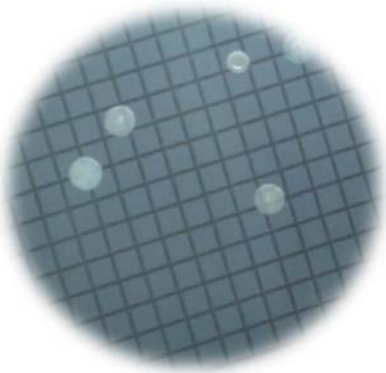
✓ **Faibles numérations**

Exemples de recommandations pour une boîte de *Petri* contenant moins de 10 colonies

- **Pour 3 à 9 colonies : résultat consigné comme une « estimation »**
- **Pour 1 ou 2 colonies : résultat consigné comme « présence »**

Note AGLAE : sauf indication contraire dans la législation

Exemple A.G.L.A.E. : Résultats d'analyses – Filtration de 10 mL



Lecture paillasse : 5 colonies / 10 mL (…soit… 500 UFC/L…)
Lecture interprétée : Charge bactérienne estimée à 500 UFC/L

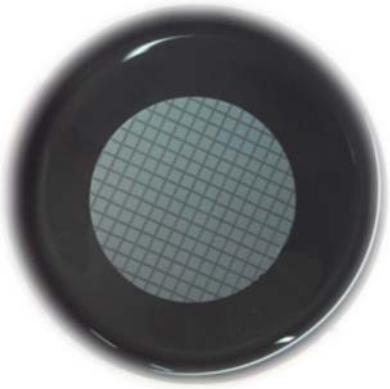
Lecture paillasse : 2 colonies / 10 mL (…soit… 200 UFC/L…)
Lecture interprétée : Présence de moisissures
Pas de numération fiable

Note A.G.L.A.E.

<u>Rappel :</u> d'après la loi de Poisson utilisée pour évaluer l'incertitude statistique de toute méthode de comptage de colonies, la variation aléatoire s'accroit rapidement au fur et à mesure que le comptage décroit.

- ✓ <u>10 germes par prise d'essai</u> : Seuil en-deçà duquel la fidélité diminue très rapidement. Dans la gamme de comptage inférieure à 10, une mesure simple est si « imprécise » que la numération est considérée comme non fiable. Il s'agit de la <u>limite (inférieure) de détermination</u>.
- ✓ <u>3 germes par prise d'essai</u> : Seuil en-deçà duquel il est possible de ne pas détecter le germe cible (en constatant l'absence de colonie sur la boîte) bien que celui-ci soit effectivement présent dans l'échantillon du laboratoire (plus de 5% de risque). Il s'agit du <u>niveau de détection</u>.
- ✓ <u>Pour 0 colonie</u> sur la boîte : Non détection

Exemple A.G.L.A.E. : Résultat d'analyse – Filtration de 10 mL



Lecture paillasse : 0 colonie / 10 mL
Lecture interprétée :
Moins de 1 micro-organisme pour 10 mL d'échantillon.
Ou
Non détecté dans la prise d'essai analytique*

Note A.G.L.A.E.

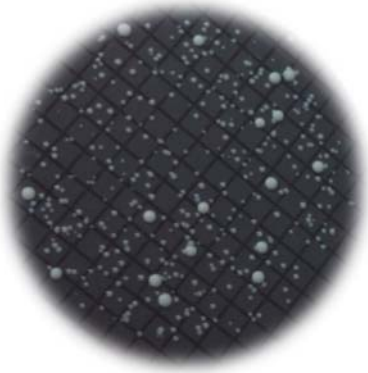
Si, **<u>à la demande du client ou du donneur d'ordre uniquement</u>, l'incertitude de mesure associée à l'absence de colonie pour le volume analysé est amenée à être communiquée, la limite de détection LD à 95% incluant l'incertitude u^2 adéquate du laboratoire peut être utilisée selon les lignes directrices des FD T 90-465 -1 et -2.*
LD = 3,00 dans le cas idéal. La LD peut augmenter jusqu'à LD = 5,79 dans le cas où l'incertitude en u^2 du laboratoire est maximale.

✓ **Cas particuliers**

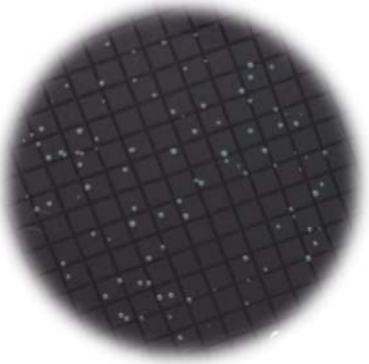
Forte croissance d'une flore interférente avec observation de colonies cibles

Exemple A.G.L.A.E. :

100 mL filtré



10 mL filtré



Pour cette analyse réalisée selon une méthode interne, les colonies cibles sont les colonies blanches bombées et les colonies interférentes sont les colonies blanches plus petites.

2 volumes ont été filtrés V_1 et V_2 (respectivement 100 mL et 10 mL) :

Lecture paillasse :

Filtration de 100 mL : 17 colonies cibles / 100 mL

Filtration de 10 mL : 0 colonie cible / 10 mL

Lecture interprétée :

Moins de $\frac{1}{V_2 \times d_2}$ x V_s = $\frac{1}{10 \times 1}$x 1000 = 100 UFC/L et

Plus de $\frac{1}{V_1 \times d_1}$ x V_s = $\frac{1}{100 \times 1}$x 1000 = 10 UFC/L

=> Moins de 100 UFC/L et plus de 10 UFC/L – *Présence d'une flore interférente ne permettant pas une numération fiable*

Forte croissance d'une flore interférente sans observation de colonies cibles

Exemple : 1 mL ensemencé directement par étalement pour 2 dilutions successives (10^{-2} et 10^{-3}) :

Lecture paillasse :

1 mL de 10^{-3} étalé: >300 colonies non cibles et 0 colonie cible => 0 UFC/mL

1 mL de 10^{-2} étalé: 33 colonies non cibles et 0 colonie cible => 0 UFC/mL

Lecture interprétée :

Moins de $\frac{1}{V_2 \times d_2}$ x V_s = $\frac{1}{1 \times 10-3}$x 1 = 1000 UFC/mL

=> Moins de 1 000 UFC/mL– *Présence d'une flore interférente ne permettant pas une numération fiable*

METHODES DE CALCULS : NUMERATIONS INHABITUELLES, ESTIMEES ET NON ACCEPTABLES

- ✓ **Rapports inattendus lorsque des dilutions sont utilisées**
  - o Elargissement des bornes acceptables de numération selon les limites des intervalles de confiance du nombre total de colonies et du nombre minimum de colonies cibles
  - o **Boite de 90 mm :**
    - **nombre total de colonies (cibles et non cible) = 334 colonies**
    - **nombre de colonies cibles ≥ 8 colonies**

Exemple

Dilution	Volume ensemencé	Comptages	Calculs	Résultat exprimé
10^{-2}	1 mL	**310 colonies**	$N = \frac{\sum C}{\sum V} \times V_s = \frac{310+8}{0{,}01+0{,}001} \times 1$	**29 000** microorganismes par mL
10^{-3}	1 mL	**8** colonies	$N = 28\,909$	

Exemple

Dilution	Volume ensemencé	Comptages	Calculs	Résultat exprimé
10^{-2}	1 mL	**>334 colonies** **Ex : 340** colonies	$Ne = \frac{C}{V \times d} \times V_s = \frac{8}{1 \times 0{,}001} \times 1$	**Nombre estimé** **8 000** microorganismes par mL
10^{-3}	1 mL	**8** colonies (numération exploitable pour un nombre estimé)	$Ne = 8\,000$	

Exemple

Dilution	Volume ensemencé	Comptages	Calculs	Résultat exprimé
10^{-2}	1 mL	**>334 colonies** **Ex : 340** colonies	-	**Résultat inacceptable**
10^{-3}	1 mL	**<8** colonies **7** colonies		

Note A.G.L.A.E.

Dans ce dernier cas, le rapport des comptages obtenus entre les boîtes de 2 dilutions successives est jugé statistiquement déviant.

✓ **Toutes les boîtes ont des comptages supérieurs à la limite supérieure**

Exemple

Dilution	Volume ensemencé	Comptages	Calculs	Résultat exprimé
10^{-2}	1 mL	**>300 colonies**	$\frac{C\ max}{V \times d}$ x V_s = $\frac{300}{1\times0,001}$ x 1	**> 300 000** microorganismes par mL
10^{-3}	1 mL	**>300 colonies**	Soit plus de 300/10^{-3}	

Note 1: V_s correspond au volume de référence sélectionné pour exprimer le résultat final

Note 2: Lorsqu'une confirmation par repiquage est effectuée, le facteur multiplicatif $\frac{b}{A}$ est intégré à la formule d'expression du résultat permettant de considérer le nombre de colonies confirmées (b) parmi le nombre de colonies repiquées (A)

✓ **Seule la boîte la plus diluée permet une numération**

Dilution	Volume ensemencé	Comptages	Calculs	Résultat exprimé
10^{-2}	1 mL	**>300 colonies**	$N'=\frac{C}{V \times d}$ x V_s $N'=\frac{120}{1\times0,001}$ x 1*	**120 000** microorganismes par mL
10^{-3}	1 mL	**Plus de 10 et moins de 300 colonies Ex : 120**		

*le volume de référence sélectionné pour exprimer le résultat final est 1 mL

INCERTITUDE DES RESULTATS D'ESSAI

✓ Renvoi vers l'annexe A.2 de l'ISO 8199 et vers l'ISO 29201 - *Variabilité des résultats d'essais et incertitude de mesure des méthodes d'énumération microbienne*

Note A.G.L.A.E.

Pour les laboratoires accrédités LAB GTA 23, l'application des fascicules FD T 90-465-1 et -2 - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques – est recommandée.
N'hésitez pas à télécharger gratuitement les applicatifs de calcul simplifiant la mise en œuvre de ces protocoles sur le site AGLAE www.association-aglae.fr

DENOMBREMENT EN MILIEU LIQUIDE – §9.2 – LES ELEMENTS MARQUANTS

- ✓ Pour le milieu sélectif utilisé => l'ajout de la prise d'essai ne doit pas réduire les propriétés sélectives
- ✓ Sauf indication contraire : des volumes de prises d'essai ≤ 1 mL sont ajoutés à 5x et jusqu'à 10x le volume de milieu de concentration simple
- ✓ Possibilité d'ajouter des volumes d'échantillons à des plaques multipuits contenant le milieu déshydraté
- ✓ Sauf indication contraire : le temps d'ensemencement entre la 1ère dilution et le dernier tube ou puit < 15 min
- ✓ S'assurer que les plaques à micropuits sont protégées contre la déshydratation

- ✓ Simplification de l'interprétation des résultats : les résultats positifs / négatifs varient selon les micro-organismes -> renvoi aux normes analytiques spécifiques

- ✓ Incertitude des résultats : renvoi vers l'annexe A de l'ISO 8199 et vers l'ISO 29201

Note A.G.L.A.E.

Au niveau français, dans le cadre de la série de fascicule FD T 90-465, une partie 4 – cas des méthodes quantiques – pourrait être développée comme mentionné dans l'introduction de la partie 1. Au jour de publication de la présente note technique, les travaux d'élaboration de cette partie 4 n'ont pas débuté.

- ✓ Précision des formules mathématiques pour le calcul du NPP et de ses variations :
  - o Une seule formule pour la détermination du NPP d'une série unique de tubes
  - o Une formule pour l'écart-type du NPP pour les essais à dilution unique
  - o Une formule pour l'écart-type du NPP pour les essais symétriques à plusieurs dilutions

- ✓ Table NPP pour système unique à 3 dilutions successives :
  - o Remplacement de l'annexe B (informative)
  - o Introduction du calcul d'indice de rareté : $r = \frac{L(\hat{\mu})}{L0(\hat{\mu})}$

  (Rapport de 2 probabilités, *celle observée rapportée à celle du résultat le plus probable, conditionnellement au niveau de concentration*)

  ➔ A interpréter selon plusieurs catégories :
    - Très probable s'il est compris entre $0{,}05 \leq r \leq 1{,}00$
    - Rarement attendu s'il est compris entre $0{,}01 \leq r < 0{,}05$
    - Extrêmement rare s'il est compris entre $0{,}00 \leq r < 0{,}01$

- ✓ Précision sur la détermination des indices NPP **au moyen d'un calculateur NPP**
  - o **Utilisation des résultats de toutes les portions soumises à essai plutôt qu'une limitation (pas de sélection de sous-ensembles comme avec certaines tables NPP)**

- Estimation des intervalles de confiance à 95 % du NPP et **indication de la probabilité de survenue de la combinaison**

- **Présentation du calculateur téléchargeable :** http: //standards .iso .org/iso/8199/
  - Le calculateur inclut une estimation des intervalles de confiance à 95% du NPP, le logarithme décimal du NPP, son écart-type, un indice de rareté et/ou catégorisation de rareté. Il satisfait aux exigences normatives (jusqu'à 10 niveaux de dilution en série)
  - **Si la combinaison de tubes est improbable, il est recommandé de ne pas consigner l'indice NPP** et le cas échéant de demander la répétition de l'essai

Note A.G.L.A.E.

Les utilisateurs de cet applicatif intéressés par des mises à jour du principal développeur, ainsi que par d'autres outils de calcul sur les méthodes qualitatives en microbiologie peuvent consulter : https://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich/index.html

METHODES DE DETECTION (QUALITATIVES) = PRESENCE / ABSENCE – §10

- ✓ Mélange de *P* mL échantillon avec 9 x *P* mL de bouillon nutritif et / ou sélectif ou placement après filtration des membranes directement dans un bouillon nutritif et / ou sélectif
- ✓ Généralement : échantillons pré-enrichis dans un bouillon non sélectif ➲ Enrichissement dans un bouillon sélectif ➲ isolement sur géloses sélectives / différentielles
- ✓ Sensibilité de la méthode augmentée lors de l'emploi de 2 bouillons d'enrichissement et 2 milieux sélectifs ou plus
- ✓ Sauf indication contraire : les bouillons d'enrichissement ne peuvent être réfrigérés qu'après évaluation de l'impact sur les résultats et stipulation claire dans le rapport d'essai
- ✓ Après incubation, ensemencement d'une anse sur un milieu gélosé sélectif
- ✓ Un certain nombre de colonies sont à identifier selon des techniques de confirmation appropriées (généralement cinq colonies par boîte, sauf indication contraire dans la norme analytique spécifique)
  - ➔ Il convient de **couvrir les types de colonies suspectes** lors de la sélection des colonies pour confirmation
- ✓ Incertitude des résultats et niveau de détection discutés en Annexe A.2 de la norme

Note A.G.L.A.E.

Le calcul d'incertitude pour les méthodes qualitatives fait l'objet de réflexions approfondies au sein du groupe de travail ad hoc – ISO-TC34-SC9-WG2 - Analyse microbiologique de la chaîne alimentaire – Statistiques.
Aux niveaux de charges bactériennes proches de l'absence, l'incertitude de mesure associée à l'absence de colonie pour le volume analysé sous la forme de limite de détection LD à 95% est une approche applicable.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES DES METHODES – §11

- ✓ Définies dans l'**ISO 13843 2017 - Qualité de l'eau — Exigences pour l'établissement des caractéristiques de performance des méthodes microbiologiques quantitatives**
- ✓ **Caractérisation** : caractéristiques de performances établies dans les méthodes d'essai de **normes internationales** : sensibilité, spécificité, sélectivité, taux de faux positifs, taux de faux négatifs, domaine de travail, linéarité, robustesse, efficacité de récupération, incertitude de comptage, répétabilité et reproductibilité
- ✓

Note A.G.L.A.E.

Lors de l'élaboration ou lors de la révision d'une norme ISO « méthode », une annexe informative présente les données de performance établies lors de la caractérisation de la méthode par un laboratoire et lors d'un essai interlaboratoires (pour les méthodes utilisées dans le cadre règlementaire). Ces caractéristiques de performance probables d'une méthode nouvelle ou modifiée serviront de base de comparaison à un laboratoire de routine souhaitant effectuer une vérification de ladite méthode mise en œuvre en interne.

- ✓ **La vérification** est axée sur la collecte de preuves attestant la capacité du laboratoire à générer des données de performances similaires à celles établies dans la caractérisation

Note A.G.L.A.E.

Pour la vérification de méthodes, l'ISO 13843 fournit des valeurs guides

- ➔ ***Sensibilité** : Généralement supérieure à **90 %***
- ➔ ***Spécificité** : Généralement supérieure à **80 %***
- ➔ ***Sélectivité** : Les résultats ne sont pas valables si la sélectivité est inférieure à **10 %***
- ➔ ***Incertitude de comptage** :*

*L'incertitude de comptage individuel (une personne) reste normalement inférieure à u_{rel} = **± 0,03 (3%)***

*L'incertitude de comptage intralaboratoire est normalement inférieure à u_{rel} = **0,05 (5%)**. Une incertitude de comptage intralaboratoire supérieure à **0,1 (10%)** indique la présence de problèmes ou de difficultés*

- ➔ ***Répétabilité** (utilisation de boîtes parallèles) :*

*La variation se situe dans les limites de la **distribution de Poisson**. Dans le cas contraire, il convient d'indiquer l'ampleur de la sur-dispersion (u^2_o)*

- ✓ Renvoi à l'annexe A et à l'ISO 17994

CONTROLE QUALITE DE ROUTINE – §12

- ✓ **Mise en place d'un contrôle qualité interne pour surveiller et contrôler les performances d'une méthode** ⇨ fiabilité des résultats produits
  - o Contrôle qualité interne appliqué au moment de l'analyse
  - o Contrôle qualité externe via un programme d'essais d'aptitude adapté et de préférence accrédité

Note A.G.L.A.E.

Note à l'attention des laboratoires accrédités LAB GTA 23 : le §7.9 de la révision 03 précise :

- ➔ *Un essai à blanc par « série analytique »*
- ➔ *Des contrôles quantitatifs avec une fréquence définie*
- ➔ *Participation au moins deux fois par an à des comparaisons inter-laboratoires pour chaque paramètre et pour chaque matrice*

✓ **Contrôle qualité interne** ⇨ évaluation de l'efficacité des modes opératoires d'isolement, de dénombrement et de confirmation

- o Utilisation de germes cibles comme en routine et des germes non cibles recommandés
- o Contrôles de procédé quotidiens ainsi que des essais de routine (CQI « primaire »):
  - ▪ Témoin positif ➥ colonies cibles et confirmation, le cas échéant
  - ▪ Témoin négatif (non cible) ➥ croissance bactérienne mais colonies non cibles et examen de confirmation, le cas échéant
  - ▪ Témoin négatif (inhibition) ➥ souche inhibée par le milieu utilisé
  - ▪ Blanc ➥ stérile

Note A.G.L.A.E.

Le terme 'primaire' désigne les dispositions de base qui sont recommandées pour mettre en œuvre un Contrôle Qualité Interne, à savoir les témoins positifs et négatifs, ainsi que le blanc d'analyse. Il distingue en particulier ces recommandations de base de celles précisées dans le § suivant : 12.2.2.2 qui détaille cette fois-ci la réalisation d'analyses en répliques, lesquelles peuvent donner accès à des composantes spécifiques de l'exactitude (répétabilité) et être utilisées pour la détermination de l'incertitude, considéré comme 'source supplémentaire de données', soit une approche plus aboutie citée ci-dessous.

- o Essais réplicats : sur échantillons de routine ➲ indication sur la répétabilité ou sur les performances du technicien ➲ Possibilité d'intégrer ces résultats aux estimations d'incertitude

Note A.G.L.A.E.

Au niveau français, pour les calculs d'incertitude en répétabilité, reportez-vous au fascicule FD T 90-465-1 - § 5.5.2 pour les données et type de tableau nécessaires, et au FD T 90-465-2 - § 4.2 pour la mise en œuvre des calculs.
Les applicatifs de calcul CQI – Tableau de type I et CQI – Tableau de type II téléchargeables sur www.association-aglae.fr permettent également d'obtenir les estimations d'incertitude en répétabilité.

- o Echantillons dopés : pour des micro-organismes rarement isolés en routine, préparés avec des souches cibles ou non cibles et soumis à essai par le personnel. Un programme régulier peut être utilisé pour le maintien des compétences.
- o Micro-organismes pour contrôle qualité interne : ISO 11133 : 2014, Annexe F ou normes analytiques spécifiques. Obtention à partir de matériel lyophilisé ou autre matériel de référence dérivé des souches de référence de 1ère génération issues de sources reconnues.

Ci-dessous, un exemple des souches à utiliser dans le cadre du contrôle de milieux TTC pour la recherche et le dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes selon la NF EN ISO 9308-1 (2000).

Ex: ISO 11133 (2014)

➢ Annexe F : Milieu TTC : micro-organismes test et critères de performance

b: Obligatoire

Facultatif

Milieu	Type	Micro-organismes	Norme internationale	Fonction	Incubation	Souches de contrôle	Numéros WDCM	Milieu de référence	Méthode de contrôle	Critères	Réactions caractéristiques
Gélose lactosée au TTC	S	Escherichia coli / bactéries coliformes	ISO 9308-1	Productivité	(21 ± 3) h / (36 ± 2) °C	Escherichia coli	00179[b] 00012 00013	TSA	Quantitative	PR ≥ 0,5	Couleur jaune dans le milieu sous la membrane
						Enterobacter aerogenes Citrobacter freundii	00175 00006				
				Sélectivité		Enterococcus faecalis[d]	00009 ou 00087	-	Qualitative	Inhibition totale (0)	-
				Spécificité		Pseudomonas aeruginosa[d]	00025 ou 00026	-	Qualitative	-	Colonies rouges, couleur bleue dans le milieu

[b]: souches à utiliser au minimum

[d]: souches au choix une des souches au minimum doit être utilisée

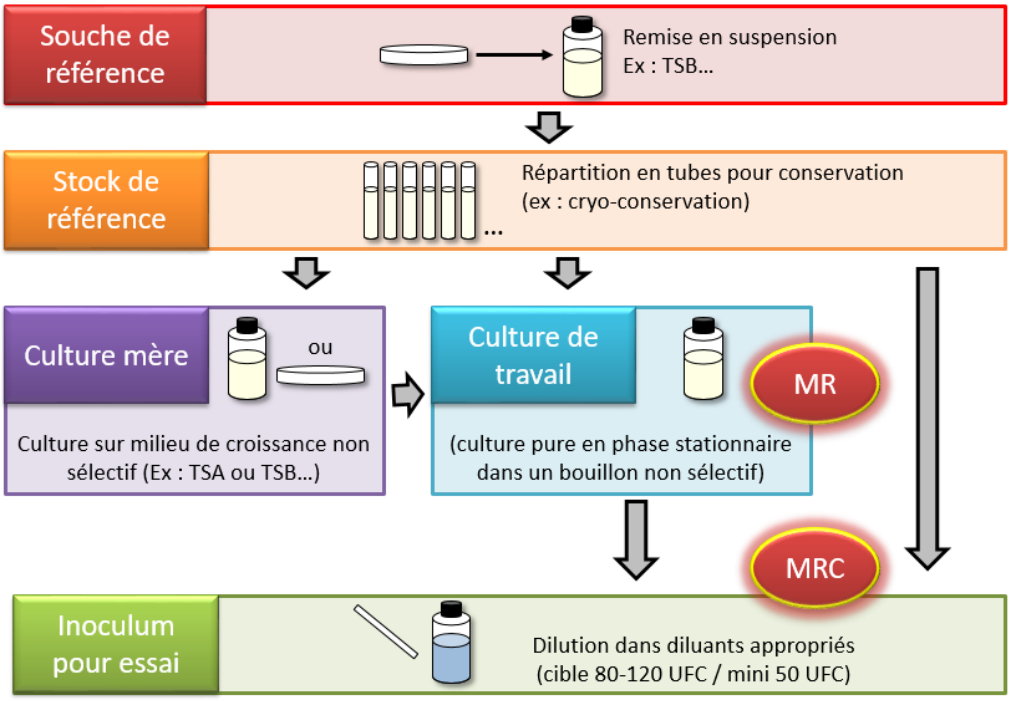
d: 1 souche au choix

d: 1 souche au choix

Note A.G.L.A.E.

*Ci-dessous est présentée **une schématisation simplifiée des stocks et culture de souches au laboratoire d'après l'ISO 11333***

- *Le Matériau de Référence (MR) de par ses seules propriétés de stabilité et d'homogénéité de lot est rapproché d'un échantillon propice à la préparation d'une culture de travail.*
- *Le Matériau de Référence Certifié (MRC) qui possède en plus un raccordement métrologique, ainsi qu'un certificat précisant la valeur assignée et son incertitude, est directement utilisable en tant qu'inoculum pour essai.*



Note : possibilité d'utiliser des isolats sauvages, par exemple ceux fréquents dans les échantillons de routine

Note A.G.L.A.E.

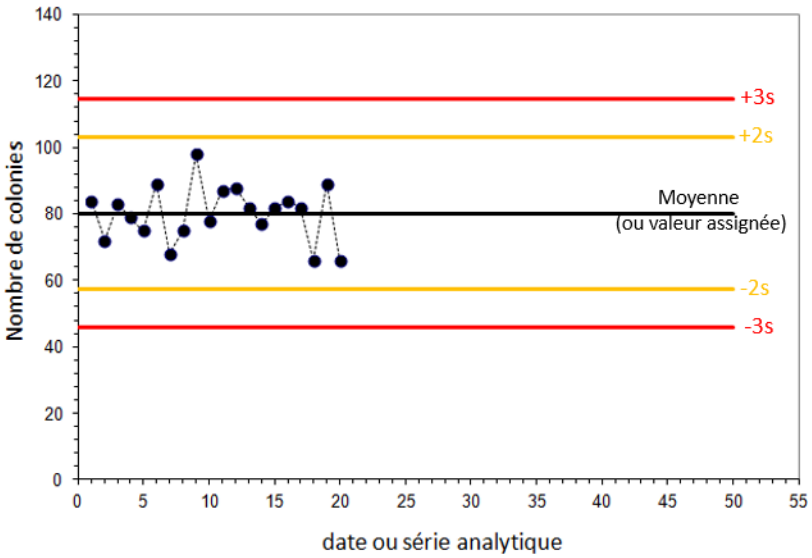
Il est recommandé que les souches isolées par le laboratoire soient bien caractérisées (idéalement par un CNR).

- Evaluation des résultats du contrôle qualité interne
  - Essais qualitatifs = méthodes de détection et examen de confirmation => résultat correct ou incorrect
  - Essais quantitatifs = carte de contrôle (des limites d'avertissement et des limites d'action sont établies)

Note A.G.L.A.E.

*Ci-dessous est présenté **<u>un exemple de carte de contrôle appliquée à l'analyse microbiologique</u>***

- *L'axe des abscisses correspond aux séries analytiques contrôlées (ex : numéro ou date des témoins positifs quantitatifs utilisés)*
- *L'axe des ordonnées correspond à la variable sous contrôle, le nombre de colonies comptées sur les boîtes de contrôle*



Pour interpréter la carte de contrôle et détecter les situations anormales, les lignes directrices de l'Annexe G de l'ISO 11133 peuvent être suivies :

- *En particulier les 4 situations hors contrôle suivantes :*
  - *La limite d'action ± 3s a été dépassée une seule fois*
  - *Deux observations sur trois consécutives dépassent la même limite de surveillance ± 2s*
  - *Six observations consécutives présentent une tendance continue à l'augmentation ou à la diminution*
  - *Neuf observations consécutives sont du même côté de la moyenne*

✓ Evaluation externe de la qualité : participation à des programmes d'essais interlaboratoires accrédités. Evaluations des résultats à suivre pour aider à évaluer les tendances les biais systématiques.

Note A.G.L.A.E.

Il est fortement recommandé de suivre l'évolution des z-scores d'un essai à l'autre sous forme de carte de contrôle (même type de carte que pour le CQI), afin de détecter notamment les dérives lentes :

- *L'axe des abscisses correspond cette fois aux essais interlaboratoires successifs (ex : numéro ou date de l'essai)*
- *L'axe des ordonnées correspond à la variable sous contrôle, le z-score*
- *La valeur moyenne (droite horizontale noire) est remplacée par la valeur z = 0*

Mention de l'ISO (TS) 22117: 2019 - *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences spécifiques et recommandations relatives aux essais d'aptitude par comparaison interlaboratoires* pour des détails complémentaires sur les essais d'aptitudes.

Rappel de l'utilité des essais collaboratifs et des systèmes similaires pour caractériser les performances, en particulier lorsqu'aucun programme d'évaluation externe de qualité adapté n'est disponible.

Pour le laboratoire organisateur d'essais :

- ➥ Expérience suffisante dans la préparation des matériaux ;
- ➥ Instructions claires fournies aux participants.

ANNEXE A (INFORMATIVE) : CRITERE DE CHOIX DE LA TECHNIQUE

- ✓ Suppression du facteur « coût des analyses »
- ✓ Ajout de l'évaluation des méthodes de détection ➥ niveau de détection, sensibilité, spécificité
- ✓ Cas idéal : chaque résultat accompagné de son incertitude de mesure ➲ documenter pleinement les décisions basées sur ce résultat

Note A.G.L.A.E.

Au niveau français, le fascicule FD T 90-465-1 - § 5.2 précise que les valeurs d'incertitude obtenues par application de la série de normes se rattachent à une méthode et ne portent pas individuellement sur les différents résultats produits par le laboratoire. ***Elles ne doivent donc pas être portées sur les bulletins d'analyses****.*
Le fascicule FD T 90-465-2 - § G.2.3 rappelle que l'incertitude doit simplement être tenue à disposition du donneur d'ordre.

- ✓ Mise à jour du § « niveau de détection » ➥ probabilité d'obtenir un résultat positif lorsque la distribution de Poisson prévaut…

Note A.G.L.A.E.

Il s'agit également de l'expression de l'incertitude de mesure associée à l'absence de colonie pour le volume analysé, soit LD = 3,00 dans le cas idéal. La LD peut augmenter jusqu'à LD = 5,79 dans le cas où l'incertitude en u^2 du laboratoire est maximale.

- ✓ Ajout des effets du type et des lots de membranes utilisées => Voir ISO 7704

ANNEXE B (INFORMATIVE) : INTERVALLES DE CONFIANCE – NUMERATION DE COLONIES ET CHOIX DE LA METHODE DE CALCUL POUR LES CAS PARTICULIERS

- ✓ Annexe totalement mise à jour – suppression des tables NPP présentes dans la version 2008
- ✓ Présentation des formules mathématiques pour le calcul des intervalles de confiance avec des exemples numériques concrets
- ✓ Présentation sous forme de tableau des intervalles de confiance pour différents niveaux de charge bactérienne
- ✓ Présentation des choix des calculs pour les cas particuliers

ANNEXE C (NORMATIVE) : NUMERATION ET CALCULS AVEC 2 BOITES DE PETRI PAR DILUTION

- ✓ Présentation des calculs si 2 boîtes par niveau de dilution.
- ✓ Tenir compte des boîtes contenant 0 colonie si elles sont retenues
- ✓ Quelques rares cas existent et ne sont pas répertoriés dans la norme : résultats à analyser et à interpréter ou à rejeter selon un microbiologiste qualifié
- ✓ Cas général : **au moins 1 boîte > 10 colonies (totales, cibles ou confirmées) pour que le résultat soit valable**

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0{,}1 \times n_2)] \times d}$$

Exemple cité dans la norme :

Dilution	Volume ensemencé	Comptages	Calculs	Résultat exprimé
10^{-2}	1 mL	**168 colonies** **215 colonies**	$N = \frac{168+215+14+25}{1 \times [2+(0{,}1 \times 2)] \times 10-2} = \frac{422}{0{,}022}$	**$1{,}9.10^4$** microorganismes par mL
10^{-3}	1 mL	**14 colonies** **25 colonies**	= 19 182 micro-organismes par mL	

- ✓ Cas après confirmation : calculer après confirmation le nombre de colonies satisfaisant aux critères de confirmation sur chaque boîte

$$N = \frac{\sum a}{V \times [n_1 + (0{,}1 \times n_2)] \times d}$$

Exemple cité dans la norme :

Dilution	Volume ense-mencé	Comptages	Nombre colonies repiquées	Nombre de colonies repiquées confirmées	Calcul du nombre *a* : colonies confirmées	Calcul final	Résultat exprimé
10^{-3}	1 mL	66 colonies 80 colonies	10 colonies 10 colonies	6 colonies 6 colonies	=(6/10)x 66 =40 =(6/10)x 80 =48	$N = \frac{\sum a}{V \times [n_1 + (0{,}1 \times n_2)] \times d} = \frac{40+48+4+4}{1 \times [2+(0{,}1 \times 2)] \times 10-3} = \frac{96}{0{,}0022}$ = 43 636 micro-organismes par mL	**$4{,}4.10^4$** microorganismes par mL
10^{-4}	1 mL	7 colonies 4 colonies	7 colonies 4 colonies	4 colonies 4 colonies	=(4/7)x7 =4 =(4/4)x4 =4		

- ✓ Cas particuliers intégrant les doubles boîtes et les dilutions présentés en annexe C :
  - o **2 boîtes avec moins de 10 colonies** (échantillon, suspension initiale ou 1ère dilution) :
    - Calcul donnant lieu à un **nombre estimé N_E** = $\frac{\sum c}{V \times n \times d}$

- **2 boîtes avec 0 colonie**
  - **Moins de 1/d** de micro-organismes par mL
- **Autres cas particuliers**

Dilution	Boîte concernée	Comptages	Expression du résultat
d1	Pour les 2 boîtes ensemencées	**> 300** colonies **avec des colonies cibles**	**Moins de 1/d2** et **plus de 1/d1** micro-organismes par mL
d2	Pour les 2 boîtes ensemencées	**< 300** colonies mais **0 colonie cible**	

Dilution	Boîte concernée	Comptages	Expression du résultat
d1	Pour les 2 boîtes ensemencées	**> 300** colonies avec **0 colonie cible**	**Moins de 1/d2** micro-organismes par mL
d2	Pour les 2 boîtes ensemencées	**< 300** colonies et **0 colonie cible**	

Dilution	Boîte concernée	Comptages	A considérer	Expression du résultat
d1	Pour les 2 boîtes ensemencées	**> 300** colonies	Les dénombrements se trouvent dans les bornes élargies (**324 colonies max** pour un système à 2 boîtes 90 mm)	Cas général $N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0{,}1 \times n_2)] \times d}$
d2	Pour les 2 boîtes ensemencées	**< 10 colonies cibles**	Sinon, tenir compte des résultats de la **d2***	Calculs d'un **nombre estimé** N_E (= Nombre Estimé) $= \frac{\sum C}{V \times n \times d}$

***Excepté si au moins 1 résultat <7** => dans ce dernier cas, le résultat de cette numération est **inacceptable**

Rappel : le nombre maximal de colonies est fonction de la surface de la boîte, les bornes élargies à considérer dépendent du nombre maximal de colonies et du nombre de boîtes (répliques) disponibles.

Dilution	Boîte concernée	Comptages	Expression du résultat
d1	Pour les 2 boîtes ensemencées	> 300 colonies	**Plus de 300/d*** ou plus de **300x b/A x 1/d*** (cas des colonies confirmées) micro-organismes par mL
d2	Pour les 2 boîtes ensemencées	> 300 colonies	

*Note : d est le facteur de la dernière dilution ensemencée donnant un comptage > 300

Dilution	Boîte concernée	Comptages	Expression du résultat
d1	Pour les 2 boîtes ensemencées	> 300 colonies	Cas général sur les 2 boîtes d2 uniquement
d2	Pour les 2 boîtes ensemencées	entre 10 et 300 colonies	$N = \frac{\sum C}{V \times n \times d}$

ANNEXE D (NORMATIVE) : COMPOSITION, PREPARATION ET ESSAI DE PERFORMANCES DES DILUANTS

- ✓ Nouvelle Annexe en remplacement du § 5.2 présent dans la version 2008

  => Renvoi ISO 11133

- ✓ Suivre les indications fournisseurs pour la préparation, la conservation, l'utilisation et la date de péremption si la préparation est réalisée à partir des milieux complets/réactifs déshydratés ou si utilisation des diluants / réactifs prêts à l'emploi.
- ✓ Ajout des n° CAS
- ✓ Modification de l'incertitude acceptable sur la mesure du pH ➲ 7,0 ± 0,2 à 25°C pour tous les diluants
- ✓ Note sur la solution saline : usage en prêt à l'emploi avec 9 g de chlorure de sodium dans 1L (0.9%) possible après vérification de son acceptabilité par le laboratoire
- ✓ Solution de Ringer quart de concentration : modification de la masse du chlorure de calcium (anhydre) – $CaCl_2$ = 0,06 g – En variante, masse équivalente 0,12 g de chlorure de calcium hexahydraté ($CaCl_2.6H_2O$) utilisable
- ✓ Solution de chlorure de magnésium : ajout de l'utilisation possible en tant que variante de 81,1 g de chlorure de magnésium hexahydraté ($MgCl_2.6H_2O$)
- ✓ Après la préparation, répartition de la solution en flacons et stérilisation ➲ conservation à température ambiante ou au réfrigérateur (5 ± 3°C) durant 6 mois au plus.
- ✓ Ajout dans un tableau des essais de performances pour l'assurance qualité des diluants

GLOSSAIRE DES COEFFICIENTS DES FORMULES MATHEMATIQUES

V, V_1, V_2… = volume d'inoculum

V_s = Volume de référence choisi pour exprimer la concentration de micro-organismes

A = nombre de colonies présomptives repiquées

a = nombre de colonies satisfaisant aux critères de confirmation

b = parmi le nombre de colonies repiquées, nombre de colonies satisfaisant aux critères de confirmation

C = nombre total de colonies présomptives dénombrées sur la boîte

d, d_1, d_2 … = facteur de dilution pour essai

C_{max} = limite supérieure pour la numération dans une boîte

$\sum C$ = Somme des colonies dénombrées

$\sum a$ = Somme des colonies dénombrées satisfaisant aux critères de confirmation

$\sum V = (v_1 \times d_1) + (v_2 \times d_2).$ = Somme des volumes

BIBLIOGRAPHIE ADDITIONNELLE SPECIFIQUE A CETTE NOTE TECHNIQUE

NF EN ISO 16266 Août 2008- Qualité de l'eau - Détection et dénombrement de Pseudomonas aeruginosa - Méthode par filtration sur membrane

FD T90-465-1 Septembre 2014 - Qualité de l'eau - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques - Partie 1 : références, définitions et généralités

FD T90-465-2 Octobre 2019 - Qualité de l'eau - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques - Partie 2 : les techniques énumératives

LAB GTA 23 - Révision 03 – Guide Technique d'Accréditation- Analyses microbiologiques des eaux

NF EN ISO 13843 Juillet 2017 - Qualité de l'eau - Exigences pour l'établissement des caractéristiques de performance des méthodes microbiologiques quantitatives

NF EN ISO 22117 Mars 2019 - Microbiologie de la chaîne alimentaire - Exigences spécifiques et recommandations relatives aux essais d'aptitude par comparaison interlaboratoires