



Centre de Gestion
de la Fonction Publique Territoriale
de la Lozère

CONCOURS

d'assistant médico-technique territorial
(spécialité technicien de laboratoire)

Mercredi 17 novembre 2010

Epreuve écrite

↓ **EPREUVE** ↓

Rédaction d'un rapport établi à partir d'un dossier portant sur une situation en relation avec les missions du cadre d'emplois concerné, et notamment la déontologie de la profession

durée : trois heures ; coefficient 1.

XXXXXXXXXX

↓ **IMPORTANT** : A LIRE AVANT DE COMMENCER ↓

Respect de la règle de l'anonymat et signes distinctifs :

- ⇒ Il est demandé aux candidats d'écrire (et de souligner si nécessaire) au stylo bille, plume ou feutre de couleur noire ou bleue uniquement. Une autre couleur pourrait être considérée comme un signe distinctif par le jury ; auquel cas la note de 0/20 serait attribuée. De même, en cas d'utilisation de crayon surligneur.
- ⇒ Les compositions doivent être totalement anonymes et ne comporter aucun nom, prénom, signature, paraphe ou nom de collectivité, même fictifs, et aucune initiale, numéro ou autre indication étrangère au traitement du sujet.
- ⇒ Le jury veille au respect de la règle de l'anonymat, et en cas de signe distinctif décide de l'attribution de la note de 0/20 à l'épreuve.
- ⇒ Tous les candidats doivent remettre une copie, même vierge. Dans cette hypothèse, ils signent leur copie en indiquant « copie blanche ».
- ⇒ Les brouillons ne sont pas considérés comme faisant partie de la copie, et ne feront en aucun cas l'objet d'une correction.

Nombre total de pages : 42 y compris celle-ci **(A vérifier avant de débiter la composition)**

◇◇◇◇◇◇◇◇

SUJET

Vous êtes assistant médico-technique dans un laboratoire départemental qui exerce ses activités en santé animale, hygiène alimentaire et hydrologie. Ce laboratoire est accrédité par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) sur les programmes suivant :

59 Analyses microbiologiques des produits agro-alimentaires

100.1 Analyses physico-chimiques des eaux

LAB GTA 23 Analyses microbiologiques, biologiques et de biologie moléculaire des eaux

109 Essais et analyses en immuno-sérologie animale.

A l'aide des documents joints, vous rédigez un rapport sur l'**estimation des incertitudes de mesure pour les résultats d'essais**. Vous préciserez clairement les **obligations** pour les secteurs sérologie, bactériologie alimentaire, physicochimie et bactériologie des eaux. Vous élaborerez des **propositions d'application dans chacun des domaines d'activité**.

Page 3 : **Document 1** : Extrait de la norme NF EN ISO/CEI 17025 (Septembre 2005) Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essai ; 2 pages.

Page 6 : **Document 2** : Extrait du LAB REF 02 (Juin 2010) Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 ; 8 pages.

Page 15 : **Document 3** : Extrait de la norme ISO/TS 19036 : 2006 (Février 2006) Lignes directrices pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives ; 9 pages.

Page 25 : **Document 4** : Extrait de la norme XP T 90-220 (Août 2003) Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes physicochimiques ; 12 pages.

Page 38 : **Document 5** : Extrait du LAB-GTA-23 Guide technique d'accréditation analyses microbiologiques, biologiques et de biologie moléculaire des eaux ; 2 pages.

Page 41 : **Document 6** : Extrait de la norme U47-019 (Février 2010) Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre de techniques ELISA ; 1 page.

Document n° 1

- i) critères et/ou exigences d'approbation/refus;
- j) données à enregistrer et méthode d'analyse et de présentation;
- k) incertitude ou procédure d'estimation de l'incertitude.

5.4.5 Validation des méthodes

5.4.5.1 La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies.

5.4.5.2 Le laboratoire doit valider les méthodes non normalisées, les méthodes conçues/développées par le laboratoire, les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu, ainsi que les amplifications ou modifications de méthodes normalisées, afin de confirmer que les méthodes sont aptes à l'emploi prévu. La validation doit être aussi étendue que l'impose la réponse aux besoins pour l'application ou le domaine d'application donné. Le laboratoire doit consigner les résultats obtenus, le mode opératoire utilisé pour la validation, ainsi qu'une déclaration sur l'aptitude de la méthode à l'emploi prévu.

NOTE 1 La validation peut également porter sur des procédures pour l'échantillonnage, la manutention et le transport.

NOTE 2 Il convient d'employer l'une ou une combinaison des techniques suivantes pour déterminer la performance d'une méthode:

- étalonnage à l'aide d'étalons de référence ou de matériaux de référence;
- comparaison des résultats obtenus avec d'autres méthodes;
- comparaisons entre laboratoires;
- évaluation systématique des facteurs influençant le résultat;
- évaluation de l'incertitude des résultats sur la base d'une connaissance scientifique des principes théoriques de la méthode et d'une expérience pratique.

NOTE 3 Lorsque des modifications sont apportées aux méthodes non normalisées validées, il convient de consigner par écrit les incidences des modifications introduites et, s'il y a lieu, de procéder à une nouvelle validation.

5.4.5.3 La gamme et l'exactitude des valeurs pouvant être obtenues au moyen des méthodes validées (par exemple l'incertitude des résultats, les limites de détection, la sélectivité de la méthode, la linéarité, la limite de répétabilité et/ou de reproductibilité, la robustesse par rapport à des influences extérieures et/ou la sensibilité réciproque aux interférences provenant de la matrice de l'échantillon/objet d'essai) telles qu'estimées en vue de l'emploi prévu, doivent correspondre aux besoins du client.

NOTE 1 La validation inclut la spécification des exigences, la détermination des caractéristiques des méthodes, une vérification que les exigences peuvent être remplies en utilisant la méthode, ainsi qu'une déclaration relative à la validité.

NOTE 2 À mesure que le développement de la méthode se poursuit, il convient de procéder à des revues régulières afin de vérifier que les besoins du client continuent d'être satisfaits. Il convient que tout changement des exigences nécessitant des modifications du plan de développement soit approuvé et autorisé.

NOTE 3 La validation est toujours un équilibre entre les coûts, les risques et les possibilités techniques. Il existe de nombreux cas où la gamme et l'incertitude des valeurs (par exemple exactitude, limite de détection, sélectivité, linéarité, répétabilité, reproductibilité, robustesse et sensibilité réciproque) ne peuvent être données que de façon simplifiée pour cause de manque d'informations.

5.4.6 Estimation de l'incertitude de mesure

5.4.6.1 Un laboratoire d'étalonnages ou un laboratoire d'essais procédant à ses propres étalonnages doit disposer d'une procédure, qu'il doit appliquer pour estimer l'incertitude de mesure de tous les étalonnages et de tous les types d'étalonnage.

5.4.6.2 Les laboratoires d'essais doivent aussi posséder et appliquer des procédures pour estimer l'incertitude de mesure. Dans certains cas, la nature de la méthode d'essai exclut un calcul rigoureux, métrologiquement et statistiquement valide, de l'incertitude de mesure. Dans de tels cas, le laboratoire doit au

ISO/CEI 17025:2005(F)

moins tenter d'identifier toutes les composantes de l'incertitude et faire une estimation raisonnable, tout en assurant que la manière d'en rendre compte ne donne pas une impression erronée de l'incertitude. Une estimation raisonnable doit se baser sur une connaissance de la performance de la méthode et sur le domaine de la mesure et faire appel, par exemple, à l'expérience acquise et aux données de validation antérieures.

NOTE 1 Le degré de rigueur requis dans une estimation de l'incertitude de mesure dépend de facteurs tels que

- les exigences de la méthode d'essai;
- les exigences du client;
- l'existence de limites étroites sur lesquelles la décision de conformité à une spécification est basée.

NOTE 2 Dans les cas où une méthode d'essai bien établie précise des limites des valeurs des principales sources d'incertitude de mesure et spécifie la forme de présentation des résultats calculés, le laboratoire est considéré comme ayant satisfait cette clause s'il suit la méthode d'essai et les instructions concernant les rapports (voir 5.10).

5.4.6.3 Lorsqu'on estime l'incertitude de mesure, il faut prendre en compte, en utilisant des méthodes d'analyse appropriées, toutes les composantes de l'incertitude qui ont une importance dans la situation donnée.

NOTE 1 Parmi les sources d'incertitude figurent, sans caractère d'exhaustivité, les étalons de référence et les matériaux de référence, les méthodes et l'équipement utilisés, les conditions ambiantes, les propriétés et la condition de l'objet soumis à l'essai ou étalonné, et l'opérateur.

NOTE 2 Le comportement prévu à long terme de l'objet soumis à l'essai et/ou étalonné n'est normalement pas pris en compte lors de l'estimation de l'incertitude de mesure.

NOTE 3 Pour de plus amples informations, voir l'ISO 5725 et le *Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure* (voir Bibliographie).

5.4.7 Maîtrise des données

5.4.7.1 Les calculs et transferts de données doivent faire l'objet de vérifications appropriées conduites de façon systématique.

5.4.7.2 Lorsque des ordinateurs ou un équipement automatisé sont utilisés pour l'acquisition, le traitement, l'enregistrement, le rapport, le stockage ou la recherche de données d'essai ou d'étalonnage, le laboratoire doit assurer que

- a) les logiciels développés par l'utilisateur sont documentés avec une précision suffisante et convenablement validés comme étant aptes à l'emploi;
- b) des procédures sont mises en place et appliquées pour protéger les données; de telles procédures doivent inclure, mais non exclusivement, l'intégrité et la confidentialité de la saisie ou du recueil des données, leur stockage, leur transmission et leur traitement;
- c) les ordinateurs et appareils automatisés sont entretenus afin de garantir un bon fonctionnement et disposent des conditions ambiantes et opérationnelles nécessaires à la préservation de l'intégrité des données d'essai et d'étalonnage.

NOTE Un logiciel commercial (par exemple un programme de traitement de texte, de base de données ou de calcul statistique) en utilisation généralisée dans son cadre d'application prévu peut être considéré comme étant suffisamment validé. Toutefois, il convient que la configuration et/ou les modifications du logiciel du laboratoire soient validées selon 5.4.7.2 a).

5.5 Équipement

5.5.1 Le laboratoire doit être équipé de tous les éléments d'équipement pour les échantillonnages, les mesurages et les essais exigés pour une exécution correcte des essais et/ou des étalonnages (y compris l'échantillonnage, la préparation des objets d'essai et/ou d'étalonnage, le traitement et l'analyse des données

Document n° 2

9.2 Incertitudes de mesure

9.2.1 Introduction

La norme NF EN ISO/CEI 17025 met plus que ses devancières l'accent sur le concept d'incertitude, notamment dans le domaine des essais, à la fois sur son évaluation, sa mention dans les rapports sur les résultats et sur son utilisation à des fins de déclaration de conformité.

L'utilité des incertitudes de mesure pour l'utilisation et l'interprétation des résultats d'analyse, d'essai ou d'étalonnage est en effet indiscutable. Parallèlement, il est important de souligner que l'identification et le suivi des composantes d'incertitude contribuent largement à la maîtrise des méthodes d'essais et d'étalonnages.

La mise en application des exigences correspondantes dans les laboratoires rencontre des niveaux de difficulté différents selon les secteurs :

- pour les laboratoires d'étalonnage, l'évaluation et l'utilisation de l'incertitude de mesure est une démarche ancienne et bien rodée. Les actions à venir visent essentiellement à harmoniser les approches en matière d'estimation des incertitudes, en s'appuyant sur l'étude des documents ENV 13005 (GUM) et EA-4/02 ;
- pour les laboratoires d'essais, la situation est beaucoup plus contrastée, tant en raison de l'hétérogénéité des secteurs d'activité rencontrés et de la finalité des essais (par exemple les analyses de biologie d'un côté, et le niveau d'émission acoustique des appareils électro-ménagers de l'autre), que par la disparité des niveaux de connaissances sur le sujet.

Les actions à mener sont donc distinctes entre les laboratoires d'étalonnage d'une part, et les laboratoires d'essais d'autre part, et font donc l'objet de notes de politique distinctes.

Ce chapitre vise à synthétiser les informations disponibles au Cofrac et à proposer des actions pour aider à la mise en application des règles relatives à la mention des incertitudes sur les rapports sur les résultats et à leur exploitation en vue des éventuelles déclarations de conformité.

9.2.2 Evaluation de l'incertitude de mesure

9.2.2.1 Cas des étalonnages

9.2.2.1.1. Eléments de lecture de la norme NF EN ISO/CEI 17025

« 5.4.6.1. Un laboratoire d'étalonnages ou un laboratoire d'essais procédant à ses propres étalonnage doit disposer d'une procédure qu'il doit appliquer pour estimer l'incertitude de tous les étalonnages et de tous les types d'étalonnage. »

« 5.4.6.3. Lorsqu'on estime l'incertitude de mesure, il faut prendre en compte, en utilisant des méthodes d'analyse appropriées, toutes les composantes de l'incertitude qui ont une importance dans la situation donnée. »

9.2.2.1.2. Politique du Cofrac

Pour les étalonnages, le laboratoire doit :

- 1/ avoir des règles documentées pour estimer l'incertitude de mesure.
- 2/ estimer cette incertitude de mesure pour chaque étalonnage réalisé.

Le document EA-4/02 est destiné à fournir aux laboratoires d'étalonnage une méthode pratique d'évaluation des incertitudes, cohérente avec le GUM.

Ce document fournit donc les bases pour l'harmonisation des méthodes d'évaluation des incertitudes pratiquées dans les différents domaines techniques d'étalonnage.

Dans cette optique, le Cofrac étudie en regard du document EA-4/02 le contenu de ses documents, guides techniques et exigences spécifiques en matière d'évaluation des incertitudes, en vue d'harmoniser les approches pour l'évaluation des incertitudes, en accord avec les Commissions Techniques d'Accréditation.

A noter qu'il est question ici d'incertitude du mesurage sur un équipement ou matériau donné : les incertitudes évaluées ne peuvent pas en principe être inférieures aux aptitudes en matière de mesure et d'étalonnage indiquées dans la portée d'accréditation du laboratoire.

9.2.2.2 Cas des essais

9.2.2.2.1. Eléments de lecture de la norme NF EN ISO/CEI 17025

« 5.4.6.2. Les laboratoires d'essais doivent [aussi] posséder et appliquer des procédures pour estimer l'incertitude de mesure.

Dans certains cas, la nature de la méthode d'essai exclut un calcul rigoureux, métrologiquement et statistiquement valide, de l'incertitude de mesure. Dans de tels cas, le laboratoire doit au moins tenter d'identifier toutes les composantes de l'incertitude et faire une estimation raisonnable [...].»

9.2.2.2.2. Politique du Cofrac

Le laboratoire d'essai doit documenter ses dispositions pour l'évaluation des incertitudes de mesure et quantifier ces incertitudes de mesure lorsqu'il existe des méthodes de calcul appropriées.

L'absence de référence aux incertitudes dans les rapports sur les résultats, ou d'utilisation de ces incertitudes de mesure pour effectuer une déclaration de conformité ou interpréter les résultats, ne dispense pas le laboratoire de satisfaire l'exigence précédente.

Le document EA-4/16 sur l'évaluation des incertitudes des essais à résultat quantitatif explicite différentes démarches pour obtenir l'incertitude de mesure, telles que l'évaluation par analyse des composantes d'incertitude, l'application de la « loi de composition des variances », ou l'utilisation de la fidélité et de la justesse de la méthode d'essai ou d'analyse, la détermination du biais à l'aide de matériau de référence, ou l'utilisation de données d'essais d'aptitude.

Dans certains domaines, des guides pour l'accréditation sont développés au sein du Cofrac, d'EA ou d'ILAC. Dans ce cas, l'évaluation des incertitudes fait l'objet d'un chapitre qui propose une approche pour l'évaluation des incertitudes, applicable dans le secteur concerné.

Lorsque la norme d'essai n'est pas explicite sur la démarche d'évaluation des incertitudes, et qu'il n'existe pas de position sectorielle consignée dans les guides techniques ou dans les documents d'exigences spécifiques du Cofrac, il est exigé des laboratoires l'approche minimale suivante :

1. Identification des facteurs susceptibles d'influencer le résultat de mesure (pour tous les essais, y compris les essais qualitatifs).

- 1.a. Etablir la liste des facteurs ayant potentiellement une influence sur le ou les résultats de l'essai (essai quantitatif ou pas). Sont bien sûr inclus dans cette liste les paramètres pour lesquels la méthode d'essai (normalisée ou non) fixe une plage de valeurs tolérées.
- 1.b. Si certains facteurs ont une influence jugée non significative, préciser les éléments qui permettent d'apporter la preuve que l'on peut négliger leur prise en compte.
- 1.c. Montrer comment on maîtrise les facteurs influents (par exemple, si la méthode d'essai impose de soumettre un objet à une température de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, on doit montrer que la température mesurée affectée de son incertitude de mesure est bien comprise dans cette plage).

2. Quantification (pour les essais dont le résultat s'exprime d'une manière quantitative)

- 2.a. Lorsqu'on dispose d'études exploitables de la fidélité de la méthode (valeur publiée, cartes de contrôles, essais interlaboratoires, ...), l'écart-type de fidélité est une des composantes de l'incertitude ; l'écart-type de fidélité peut constituer une estimation suffisante de l'incertitude-type du résultat de mesure si tous les facteurs listés en 1 ont bien été pris en compte dans l'étude de fidélité.
- 2.b. L'influence de chaque facteur identifié en 1, dont l'influence est jugée significative et qui n'est pas pris en compte dans une étude de fidélité, doit être analysée et quantifiée (dans l'unité de mesure du résultat).
- 2.c. Estimer l'incertitude à partir de ces composantes.

Cette démarche est cohérente avec les recommandations du GUM, du fascicule FD X07-021 et des guides internationaux.

9.2.3 Mention des incertitudes de mesure sur les rapports sur les résultats

9.2.3.1 Cas des étalonnages

9.2.3.1.1 Eléments de lecture de la norme NF EN ISO/CEI 17025

« 5.10.4.1. [...] les certificats d'étalonnage doivent inclure les éléments suivants, lorsque cela est nécessaire pour l'interprétation des résultats d'étalonnage :

b) l'incertitude de mesure et/ou une déclaration de conformité à une spécification métrologique définie ou à certains articles de celle-ci ; »

Le document EA-4/02 précise par ailleurs dans son § 6.1 que : « dans les certificats d'étalonnage, le résultat complet d'un mesurage, à savoir l'estimation y du mesurande et l'incertitude élargie associée U , doit être donné sous la forme $(y \pm U)$. »

9.2.3.1.2 Politique du Cofrac

Dans les certificats d'étalonnage, l'incertitude élargie doit nécessairement accompagner l'estimation du mesurande, sous la forme prescrite par le document EA-4/02 évoqué ci-avant ; l'incertitude élargie est établie à partir de l'incertitude-type composée avec un facteur d'élargissement $k=2$ (distribution normale), ou de sorte que l'intervalle élargi corresponde à une probabilité de couverture de 95%.

De plus, dans le corps du certificat d'étalonnage, du constat de vérification ou du certificat de matériau de référence, le laboratoire doit faire apparaître l'une des mentions suivantes, suivant le cas : « Les incertitudes élargies mentionnées sont celles correspondant à deux fois l'incertitude-type composée » ou « les intervalles élargis correspondent à une probabilité de couverture de 95% ».

9.2.3.2. Cas des essais

9.2.3.2.1. Elément de lecture de la norme NF EN ISO/CEI 17025

« 5.10.3.1 Outre les exigences répertoriées en 5.10.2, les rapports d'essais doivent inclure les éléments suivants, lorsque cela est nécessaire pour l'interprétation des résultats d'essais :

c/ s'il y a lieu, une déclaration relative à l'incertitude de mesure estimée ; l'information relative à l'incertitude est nécessaire dans les rapports d'essai lorsqu'elle est importante pour la validité ou l'application des résultats d'essai, lorsque les instructions du client l'exigent ou lorsque l'incertitude affecte la conformité aux limites d'une spécification ; »

9.2.3.2.2 Politique du Cofrac

Le laboratoire doit identifier la finalité de l'essai, pour confirmer la nécessité de faire figurer, ou non, l'incertitude de mesure sur le rapport sur les résultats.

La mention de l'incertitude dans le rapport sur les résultats est fonction à la fois des exigences exprimées par le client et de celles contenues dans les référentiels (cf. tableau page suivante).

<p>Exigences du client (traçable au niveau de la revue de la demande)</p> <p>Exigences du référentiel⁽¹⁾</p>	<p>Le client du laboratoire lui demande que l'incertitude⁽³⁾ soit mentionnée dans le rapport.</p>	<p>Le client du laboratoire lui demande que l'incertitude⁽³⁾ <u>ne soit pas</u> mentionnée dans le rapport.</p> <p>OU BIEN</p> <p>Le client du laboratoire ne précise rien.</p>
<p>Le référentiel⁽¹⁾ mentionne explicitement que les limites de spécifications⁽²⁾ ont été fixées <u>sans tenir compte</u> de l'incertitude⁽³⁾.</p>	<p>L'incertitude⁽³⁾ doit être indiquée dans le rapport.</p>	
<p>Le référentiel⁽¹⁾ mentionne explicitement que les limites de spécifications⁽²⁾ ont été fixées <u>en tenant compte</u> de l'incertitude⁽³⁾.</p> <p>OU BIEN</p> <p>Le référentiel⁽¹⁾ ne mentionne rien quant aux incertitudes⁽³⁾.</p>	<p>L'incertitude⁽³⁾ doit être indiquée dans le rapport.</p>	<p>L'incertitude⁽³⁾ peut ne pas être indiquée dans le rapport.</p>

- (1) Référentiel : la notion de référentiel est à considérer ici au sens large ; il peut s'agir de référentiel réglementaire, de normes nationales, régionales ou internationales, de documents techniques publiés par des organisations techniques de renom, par des revues scientifiques spécialisées ou par le fabricant de l'équipement. Il peut également s'agir de référentiels clients.
- (2) Limite de spécification : dans le présent document, l'expression "limite de spécification" englobe aussi la notion de tolérance à ne pas dépasser ou de seuils à atteindre.
- (3) Incertitude : il s'agit ici de l'incertitude associée au résultat final.

9.2.4 Utilisation des incertitudes de mesure dans le cadre des déclarations de conformité

La manière de prendre en compte l'incertitude de mesure dans les processus de déclaration de conformité n'est pas unique. Selon les produits (mot pris au sens large et incluant entre autres la notion de service), les domaines de mesure, les référentiels, les professions ou encore les pays, les règles et les pratiques diffèrent.

Déclarer conforme ou non-conforme un produit génère deux risques :

- le risque dit « client », qui est le risque de déclarer à tort que le produit est conforme ;
- le risque dit « fournisseur », qui est le risque de déclarer à tort que le produit est non conforme.

Le laboratoire ne sait pas toujours si le produit dont on lui demande de vérifier les spécifications doit être examiné sous l'angle du « fournisseur » ou du « client ». En effet, il intervient en situation de tierce partie, dont les travaux feront l'objet d'utilisation par d'autres entités qui, elles, assument de fait les risques. Par exemple, ce sont le pollueur (fournisseur) et le citoyen (client), concernés par un effluent toxique (le produit) soumis à une réglementation (la spécification), qui assument les risques issus du travail du laboratoire accrédité caractérisant l'émission d'effluent. Si pollueur et citoyen veulent étayer leur comportement par la seule déclaration de conformité énoncée, ou non, par le laboratoire accrédité, il est évidemment essentiel qu'ils soient, de façon lisible et transparente, partie prenantes à la définition de la règle appliquée, qui conditionne le risque qu'eux-mêmes acceptent d'assumer.

Lorsque le laboratoire appartient soit au fournisseur (contrôle de production...), soit au client (contrôle de réception...), c'est en fait l'entité qui dispose en son sein de ce laboratoire qui assume le risque, et donc doit contribuer, là encore de façon lisible et transparente, à l'établissement des critères permettant de déclarer, ou non, la conformité.

Les données fondamentales sur lesquelles s'appuie la décision sont :

- la (ou les) limite(s) de la spécification qui est imposée à la caractéristique du produit ;
- le ou les résultats de mesure/ d'essai de la caractéristique ;
- l'incertitude de mesure affectant le résultat de mesure/ d'essai ;
- le choix du niveau de risque accepté par le client du laboratoire accrédité ;
- la règle de décision (c'est-à-dire la manière de combiner les données précédentes pour déclarer, ou non, la conformité).

En pratique, les principales difficultés rencontrées par les laboratoires pour déclarer, ou non, la conformité, sont les suivantes :

- indisponibilité ou définition insuffisante (et donc interprétation ambiguë) de la spécification ;
- difficulté à évaluer l'incertitude, notamment celle associée aux essais qualitatifs ;
- absence ou méconnaissance de la règle de décision à appliquer.

Il est donc fondamental qu'au moment de la revue de la demande, un dialogue s'engage entre le laboratoire et son client afin d'établir le niveau de risque devant être utilisé pour déclarer, ou non, la conformité, et que la règle définie à l'issue de cette discussion soit formalisée dans le « contrat ».

NB : La déclaration de conformité ne relève pas, au sens strict de la norme NF EN ISO/CEI 17025, des avis et interprétations.

9.2.4.1 Cas des étalonnages

9.2.4.1.1. Eléments de lecture de la norme NF EN ISO/CEI 17025

« 5.10.4.1. [...] les certificats d'étalonnage doivent inclure les éléments suivants, lorsque cela est nécessaire pour l'interprétation des résultats d'étalonnage :

b) [...] une déclaration de conformité à une spécification métrologique définie ou à certains articles de celle-ci ; »

« 5.10.4.2. [...] Lorsqu'une déclaration de conformité à une spécification est établie, sans indiquer les résultats de mesure et les incertitudes associées, le laboratoire doit consigner ces résultats et les conserver pour qu'il soit possible de s'y référer ultérieurement.

Lorsque des déclarations de conformité sont établies, l'incertitude de mesure doit être prise en compte. »

9.2.4.1.2. Politique du Cofrac

Le laboratoire doit identifier avec son client s'il y a lieu d'émettre une déclaration de conformité/non conformité, suivant l'objectif visé par l'étalonnage.

Les spécifications et la règle de décision utilisées doivent correspondre au besoin du client.

L'utilisation de l'incertitude de mesure pour déclarer la conformité est fonction à la fois des exigences exprimées par le client et de celles contenues dans les référentiels (cf. tableau page suivante).

Exigences du client (traçable au niveau de la revue de la demande)	Le client du laboratoire lui demande de prendre en compte l'incertitude ⁽³⁾ pour établir la conformité	Le client du laboratoire lui demande de ne pas prendre en compte l'incertitude ⁽³⁾ pour établir la conformité OU BIEN Le client du laboratoire ne précise rien.
Le référentiel ⁽¹⁾ mentionne explicitement que les limites de spécifications ⁽²⁾ ont été fixées <u>sans tenir compte</u> de l'incertitude ⁽³⁾ .	Déclaration de conformité ⁽⁴⁾ Cas 1	
Le référentiel ⁽¹⁾ mentionne explicitement que les limites de spécifications ⁽²⁾ ont été fixées <u>en tenant compte</u> de l'incertitude ⁽³⁾ .	Déclaration de conformité ⁽⁴⁾ Cas 2	
Le référentiel ⁽¹⁾ ne mentionne rien quant à la prise en compte de l'incertitude ⁽³⁾ .	Déclaration de conformité ⁽⁴⁾ Cas 1	Déclaration de conformité ⁽⁴⁾ Cas 2

(1) Référentiel : la notion de référentiel est à considérer ici au sens large ; il peut s'agir de référentiel réglementaire, de normes nationales, régionales ou internationales, de documents techniques publiés par des organisations techniques de renom, par des revues scientifiques spécialisées ou par le fabricant de l'équipement. Il peut également s'agir de référentiels clients.

(2) Limite de spécification : dans le présent document, l'expression "limite de spécification" englobe aussi la notion de tolérance à ne pas dépasser ou de seuils à atteindre.

(3) Incertitude : il s'agit ici de l'incertitude associée au résultat final.

(4) La déclaration de conformité, lorsque le laboratoire la réalise, s'appuie sur une règle du type :

- Cas 1 : décision = fonction (résultat(s) de mesure, incertitude associée, limites de spécification)

Dans ce cas, le rapport doit signaler l'utilisation faite de l'incertitude de mesure.

Exemple : « Pour déclarer ou non la conformité, l'intervalle de spécifications a été réduit de la valeur de l'incertitude associée au résultat. »

- Cas 2 : décision = comparaison de (résultat(s) de mesure) aux (limites de spécification)

Dans ce cas, le rapport doit signaler l'utilisation faite de l'incertitude de mesure.

Exemple : « Pour déclarer ou non la conformité, il n'a pas été tenu compte de l'incertitude associée au résultat ».

Lorsque la déclaration de conformité est établie dans un constat de vérification n'indiquant pas les résultats complets des opérations d'étalonnage, en particulier les incertitudes de mesure, ce constat de vérification doit faire référence au document dans lequel ces données sont consignées, de façon à ce que le client puisse y accéder sur demande au laboratoire.

Lorsque des dispositions réglementaires existent, elles prévalent sur les dispositions énoncées dans ce paragraphe.

NOTE informative sur l'évaluation des risques client-fournisseur

Le Cofrac reconnaît que le sujet de l'évaluation des risques client-fournisseur est un sujet problématique à l'heure actuelle, cette notion étant peu appréhendée aujourd'hui par une très grande majorité de laboratoires et la littérature peu développée sur ce sujet.

Il existe cependant des guides (par exemple ILAC G8 et FD X07-022), qui peuvent raisonnablement servir de base pour l'établissement d'une règle de décision selon le niveau de risques que le laboratoire et son client sont prêts à partager.

Cela étant, le Cofrac n'exigera pas aujourd'hui des laboratoires des éléments qui leur sont indisponibles, mais s'attachera à développer dans des guides techniques d'accréditation qu'il publiera des recommandations en vue de guider les laboratoires dans cette évaluation.

9.2.4.2 Cas des essais

9.2.4.2.1. Eléments de lecture de la norme NF EN ISO/CEI 17025

« **5.10.3.1.** [...] les rapports d'essais doivent inclure les éléments suivants, lorsque cela est nécessaire pour l'interprétation des résultats d'essai :

b) s'il y a lieu, une déclaration de conformité/ de non conformité aux exigences et/ou spécifications ; »

9.2.4.2.2. Politique du Cofrac

La politique est identique à celle définie pour les étalonnages (Cf. §9.2.4.1.2).

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Document n° 3

2.6

biais

différence entre l'espérance mathématique des résultats d'essais et la valeur de référence acceptée

NOTE Le biais est une erreur systématique totale par opposition à l'erreur aléatoire. Il peut y avoir une ou plusieurs composantes d'erreurs systématiques qui contribuent au biais. Une différence systématique importante par rapport à la valeur de référence acceptée est reflétée par une grande valeur du biais.

[ISO 3534-1:—]

3 Principes

3.1 Approche globale de l'estimation de l'incertitude de mesure (IM)

La présente Spécification technique adopte une approche globale pour l'estimation de l'incertitude de mesure. Elle se fonde sur la variabilité globale du processus d'analyse, qui débouche sur le résultat d'essai. Cette variabilité globale inclut à la fois la fidélité observable (composante aléatoire) et le biais (composante systématique). Dans la pratique, dans le domaine de la microbiologie des aliments, seule la fidélité est prise en compte (voir 3.2).

L'approche globale de l'estimation de l'incertitude de mesure adoptée par la présente Spécification technique est dérivée d'une estimation expérimentale de l'écart-type de reproductibilité du résultat final du processus complet de mesurage. Cet écart-type correspond à l'incertitude type composée (voir 4.1).

L'approche globale peut être considérée comme un système de «boîte noire», comme le montre le diagramme de la Figure 1, où sont identifiées les principales sources d'incertitude en microbiologie des aliments. Ce diagramme peut être utile pour identifier les sources d'incertitude qui sont ou ne sont pas prises en compte par le protocole expérimental choisi.

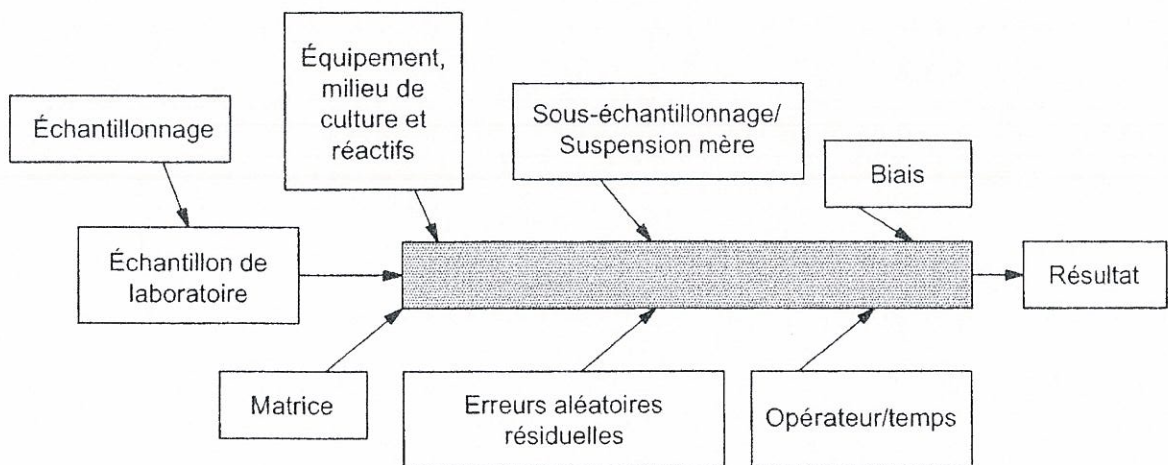


Figure 1 — Diagramme des principales sources d'incertitude en microbiologie des aliments, et approche «boîte noire» de l'incertitude de mesure

Dans la Figure 1, l'échantillonnage [le prélèvement de(s) l'unité(s) d'échantillonnage à soumettre à l'essai dans le lot à contrôler] introduit une partie significative (si ce n'est essentielle) de l'erreur totale, mais il ne fait pas partie de l'incertitude liée au mesurage lui-même. Le sous-échantillonnage correspond au prélèvement de la prise d'essai dans un échantillon pour analyse (une des unités prélevées du lot). Cette prise d'essai est utilisée dans la préparation de la suspension mère dans les techniques de dénombrement des bactéries, conformément à l'ISO 6887-1. Les sources principales d'incertitude au cours du processus analytique sont

l'opérateur/le temps et l'équipement/les milieux de culture/les réactifs. Enfin, les erreurs aléatoires résiduelles sont celles qui ne s'expliquent pas par les facteurs précités, et qui sont généralement évaluées en laboratoire dans des conditions de répétabilité.

L'adoption de cette approche globale nécessite que les résultats soient obtenus selon un processus de mesurage bien maîtrisé.

3.2 Prise en considération du biais

On considère généralement que le biais n'est pas pris en compte dans l'estimation de l'incertitude de mesure, étant donné la nature empirique des dénombrement microbiens. En d'autres termes, le mode opératoire d'analyse détermine directement le résultat du mesurage, par exemple le nombre d'unités formant colonie par échantillon. Par conséquent, il n'est pas possible dans la pratique de déterminer une valeur vraie, nécessaire pour déterminer le biais. Même en utilisant des matériaux de référence certifiés, ou des valeurs dérivées d'essais interlaboratoires, seule une partie du biais total peut être évaluée.

Il est toutefois reconnu qu'une partie du biais peut être estimée par des essais interlaboratoires utilisés pour deux des options retenues dans la présente Spécification technique pour évaluer l'écart-type de reproductibilité (voir Articles 6 et 7). La façon de prendre en compte la composante de biais de l'incertitude n'est pas décrite dans la présente Spécification technique. Cependant, même si la composante de biais de l'incertitude de mesure n'est pas évaluée formellement, il peut être démontré que le biais de laboratoire est sous contrôle, en participant par exemple à des essais interlaboratoires d'aptitude, ou en analysant des matériaux de référence (certifiés).

4 Aspects généraux

4.1 Incertitude type composée

Lorsque les principales composantes de l'incertitude sont sous contrôle (4.1), l'incertitude type composée $u_c(y)$ (2.3) est, en général, la combinaison d'une incertitude type liée à une fidélité observable et, le cas échéant, au biais.

Dans le cadre de la présente Spécification technique, l'incertitude type composée est estimée par l'écart-type expérimental de reproductibilité du résultat final du mesurage (4.2).

NOTE La manière de combiner une incertitude type liée au biais n'est pas décrite ici.

4.2 Écart-type de reproductibilité

Trois possibilités différentes ont été choisies pour l'estimation de l'écart-type de reproductibilité (s_R), avec un ordre de priorité:

- 1^{re} option: écart-type de reproductibilité intralaboratoire;
- 2^e option: écart-type de reproductibilité de la méthode dérivée d'un essai interlaboratoires;
- 3^e option: écart-type de reproductibilité dérivé d'un essai interlaboratoires d'aptitude.

Une priorité nette est donnée à la première option, qui a été soumise à des essais, et pour laquelle un protocole expérimental est décrit en détail.

Des règles générales d'estimation de l'écart-type de reproductibilité sont données en 4.4, et chaque option est détaillée dans les Articles 5 à 7.

4.3 Incertitude élargie

L'incertitude élargie U (2.4) telle que définie par le GUM est dérivée de l'incertitude type composée $u_c(y)$ (voir 4.1), avec un facteur d'élargissement k (2.5), d'une valeur de 2 dans la présente Spécification technique (correspondant approximativement à un niveau de confiance de 95 %) :

$$U = 2 u_c(y) = 2 s_R$$

4.4 Règles générales d'estimation de l'écart-type de reproductibilité

Il convient que le concept de la boîte noire décrit dans la présente Spécification technique prenne en compte le plus grand nombre possible des sources d'incertitude représentées à la Figure 1. En particulier, il convient que le laboratoire ait une bonne connaissance de la répartition des micro-organismes au sein des matrices qu'il analyse, pour pouvoir en tenir compte dans l'estimation de la composante d'incertitude du sous-échantillonnage (voir 3.1).

L'écart-type de reproductibilité doit être estimé pour chaque type de micro-organismes cibles (ou groupe cohérent de micro-organismes cibles) et pour chaque matrice (ou groupe cohérent de matrices), pour une méthode donnée utilisée par le laboratoire pour obtenir ses résultats de routine.

NOTE 1 Le terme «cohérent» signifie que le groupe de micro-organismes/méthodes ou le groupe de matrices donne des valeurs équivalentes d'incertitude de mesure.

NOTE 2 L'estimation de l'incertitude de mesure est liée au laboratoire, et associe une incertitude de mesure donnée au résultat d'essai correspondant, déterminé dans des conditions définies (opérateurs, mode opératoire, matériel, réactifs, etc.). L'estimation de l'incertitude de mesure ne caractérise pas la méthode d'analyse elle-même, indépendamment du laboratoire qui la met en oeuvre.

Conformément aux principes de l'ISO/CEI 17025, il convient d'identifier les facteurs critiques, associés à la méthode ou au laboratoire, et susceptibles d'avoir une incidence sur le résultat du mesurage, et de démontrer qu'ils sont sous contrôle. Ces facteurs critiques sont, par exemple, la source et le type de milieux de culture et/ou autres réactifs (comme ceux utilisés pour la confirmation), les techniques de dénombrement (manuel ou automatique), l'opérateur ou le groupe d'opérateurs, etc. Une surveillance continue de l'estimation de l'incertitude de mesure est nécessaire afin de montrer que cette estimation reste valable et que les résultats d'essai sont sous contrôle. Toute modification de l'un des facteurs critiques doit entraîner une réévaluation de l'estimation de l'incertitude de mesure.

5 Écart-type de reproductibilité intralaboratoire

5.1 Généralités

L'écart-type de reproductibilité intralaboratoire est la meilleure option pour obtenir l'incertitude de mesure, car elle permet à un laboratoire d'associer la valeur de l'incertitude de mesure à ses résultats, respectant ainsi le principe de la définition de l'incertitude de mesure. Cela correspond à un cas particulier de fidélité intermédiaire, selon l'ISO 5725-3. Cette option présente l'inconvénient théorique de ne pas pouvoir prendre en compte le biais.

5.2 Protocole expérimental

5.2.1 Généralités

En microbiologie des aliments, l'effet de la matrice sur l'incertitude de mesure ne peut pas être évité; par conséquent, le protocole expérimental prend en compte l'effet du sous-échantillonnage pour prélever la prise d'essai dans l'échantillon de laboratoire (c'est-à-dire l'échantillon d'aliment soumis à l'essai).

Pour chaque micro-organisme cible [ou groupe cohérent d'organismes ²⁾] et pour un type donné de matrice, le protocole expérimental (5.2.2) doit être réalisé pour au moins 10 échantillons de la même matrice. Il convient que le protocole soit répété à des jours différents, afin de couvrir les variations temporelles des conditions opératoires. De cette façon, une accumulation de résultats dans le temps est également permise.

Le nombre de types de matrices à soumettre à l'essai dépend de la diversité des matrices faisant l'objet d'une analyse de routine par le laboratoire. Il convient que les matrices choisies soient représentatives, en termes de valeurs d'incertitude de mesure, des types de matrices analysées par le laboratoire, et qu'elles soient également adaptées aux micro-organismes pour lesquels l'essai est à effectuer. L'Annexe A donne des lignes directrices de choix, en donnant le résultat des essais réalisés au niveau international dans le but d'évaluer la composante d'incertitude de mesure liée au sous-échantillonnage pour prélever la prise d'essai dans l'échantillon de laboratoire, et à la préparation de la suspension mère. D'autres recommandations figurent également dans l'Annexe B de l'ISO 16140:2003.

Le calcul de l'écart-type sur les données log-transformées (5.3) permet de stabiliser la variance de la reproductibilité quel que soit le niveau de contamination, étant donné que les faibles niveaux ne sont pas pris en considération dans le présent document. Il n'est donc pas nécessaire d'estimer l'écart-type de reproductibilité par niveau de contamination. Cependant, dans la mesure du possible, il convient de choisir les échantillons et/ou les dilutions de manière à couvrir la plage de concentrations des essais de routine.

Il convient d'utiliser dans la mesure du possible des échantillons contaminés naturellement, car ils permettent une estimation plus réaliste de l'incertitude de mesure, qui doit servir à caractériser les résultats obtenus avec des échantillons contaminés naturellement. En outre, l'état physiologique du micro-organisme (par exemple s'il est stressé) peut également influencer sur la variabilité des résultats; il convient donc qu'il corresponde aux conditions rencontrées lors des essais de routine.

S'il est nécessaire de recourir à une contamination artificielle, cette dernière doit être très précisément maîtrisée afin de ne pas introduire d'élément de variabilité supplémentaire dans les résultats. Il convient que la contamination artificielle soit conçue de façon à reproduire autant que possible la contamination naturelle, par exemple en utilisant des micro-organismes stressés et en incluant une flore compétitive/annexe.

5.2.2 Description

Le protocole est décrit à la Figure 2.

Pour chaque échantillon, chaque opérateur prélève une prise d'essai, et prépare à partir de cette prise d'essai une suspension mère, qui est analysée une seule fois. Effectuer l'analyse *comme s'il s'agissait d'un essai de routine* (par exemple préparation d'une série de dilutions décimales, inoculation d'une ou de deux boîtes par dilution).

NOTE 1 Dans la pratique, l'«opérateur» peut être en fait une équipe d'opérateurs (techniciens), dont chacun effectue une certaine partie du mode opératoire. Dans ce cas, l'équipe est considérée comme un opérateur unique, et tout changement de la répartition des tâches au sein de l'équipe est considéré comme un changement d'opérateur.

NOTE 2 Ce protocole est dérivé de l'approche «boîte noire», décrite en 3.1. Différentes sources d'incertitude, comme le sous-échantillonnage, la nature de la matrice, les erreurs aléatoires résiduelles, l'opérateur/le temps, etc. sont considérées simultanément et ne sont pas évaluées séparément.

Il convient que les conditions A et B soient aussi différentes que possible, et, dans l'idéal, qu'elles incluent autant de variations qu'il peut s'en produire d'un jour à l'autre au sein du laboratoire, en termes de techniciens, lots de milieux de culture et réactifs, agitateur vortex, pH-mètre, incubateurs, durée d'analyse, etc. S'il est démontré que la contamination de l'échantillon d'aliment est suffisamment stable (ce qui est rarement le cas en microbiologie des aliments), il convient que les conditions A et B se rapportent également à différents jours d'analyse.

2) Voir Note 1 de 4.4.

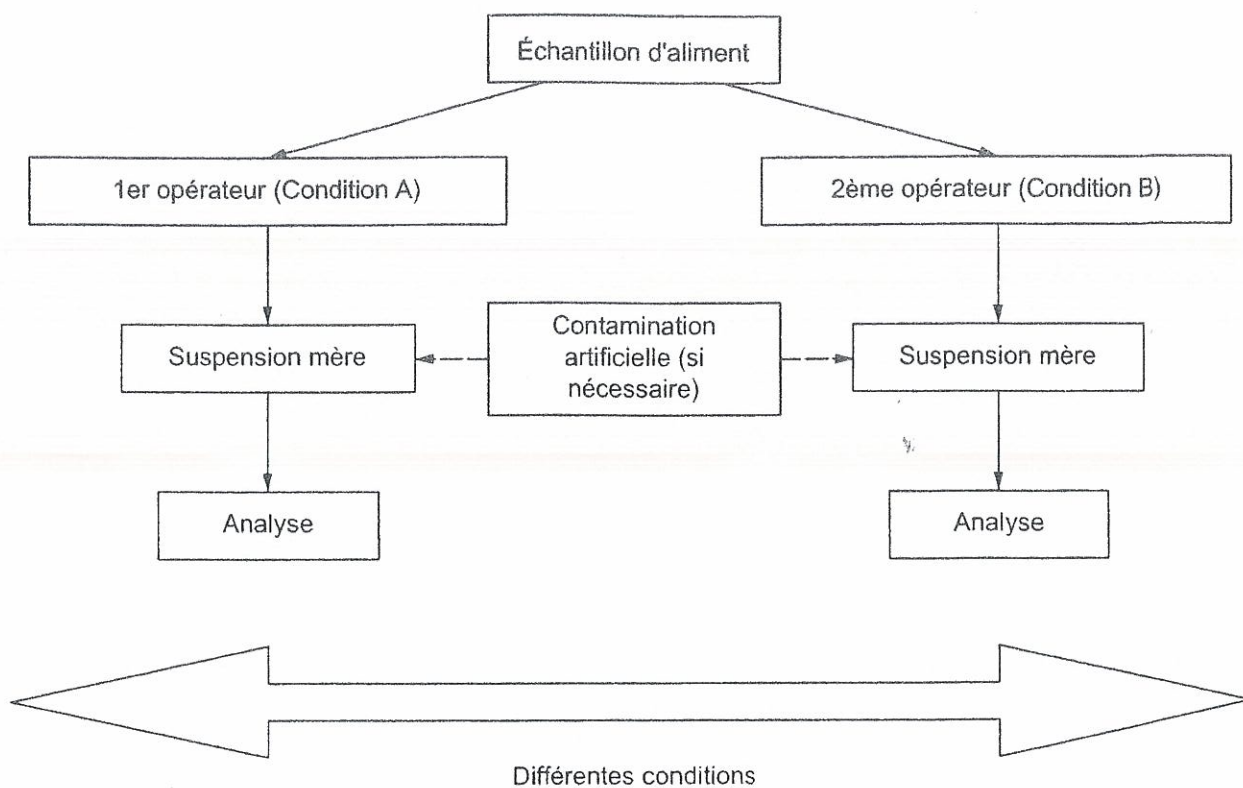
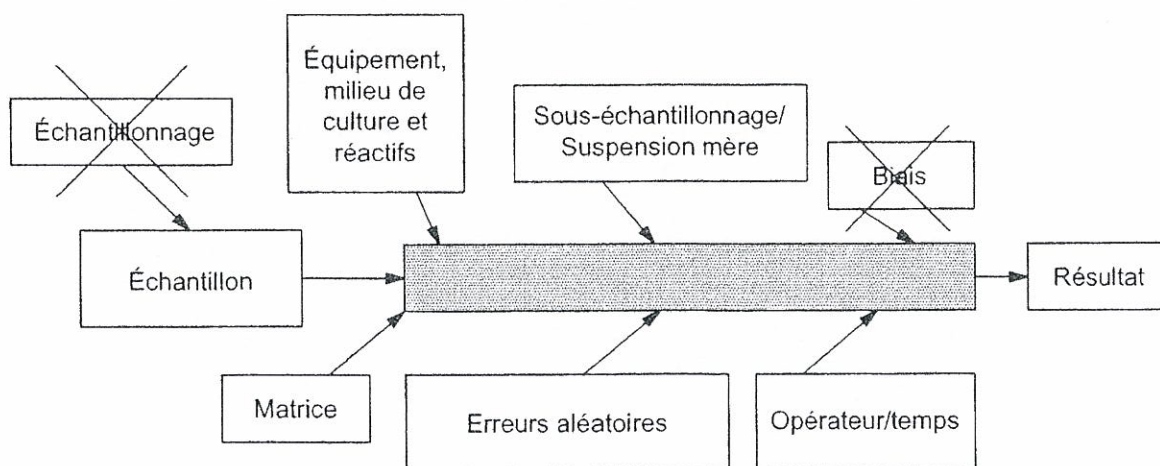


Figure 2 — Protocole expérimental pour l'écart-type de reproductibilité intralaboratoire

5.2.3 Utilisation

La Figure 3 indique les principales sources d'incertitude prises en compte par ce protocole, ainsi que celles qui en sont exclues (l'échantillonnage et le biais).



NOTE Les sources exclues sont barrées d'une croix.

Figure 3 — Principales sources d'incertitude prises en compte ou exclues lors d'une étude de reproductibilité intralaboratoire

Comme expliqué en 4.2.1, ce protocole intègre l'influence du sous-échantillonnage de la prise d'essai sur l'évaluation de l'incertitude totale. En outre, il est bien connu en microbiologie des aliments que la contamination naturelle des produits alimentaires (en particulier les produits solides, après traitement, maturation, etc.) est souvent très hétérogène. Le protocole prend en compte la variabilité des résultats liée à cette hétérogénéité, qui peut revêtir une signification importante dans certaines situations, lorsqu'il faut porter un jugement sur la conformité de l'échantillon analysé par rapport à des limites données (par exemple des critères microbiologiques).

NOTE Si une contamination artificielle de la suspension mère est réalisée (c'est une possibilité du protocole de la Figure 2), la composante d'incertitude liée à l'hétérogénéité de la contamination de la matrice n'est pas prise en compte.

Cependant, ce protocole peut dans certains cas être difficile à mettre en œuvre. La répartition de la contamination naturelle étant étroitement liée au type de matrice, il est nécessaire de répéter le protocole expérimental avec chaque type de matrice (ou groupe cohérent de matrices) faisant l'objet d'une analyse de routine par le laboratoire. Cela peut conduire à effectuer des essais très importants lorsque le laboratoire analyse une grande variété de matrices.

Enfin, comme mentionné en 3.2, la possible contribution du biais à l'incertitude de mesure ne peut pas être prise en compte par ce protocole.

5.3 Calculs

Conformément à la pratique normale, avant les calculs, les données (résultats du dénombrement microbiologique), exprimées en ufc/g ou ufc/ml, doivent être transformées en \log_{10} (ufc/g) ou \log_{10} (ufc/ml).

NOTE Selon l'ISO 31-11, le symbole des logarithmes décimaux est «lg». Cependant, dans le cadre de la présente Spécification technique, le symbole « \log_{10} », largement utilisé par la communauté des laboratoires de microbiologie des aliments, a été préféré.

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

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

où

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

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

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

Le Tableau 1 donne un exemple de dénombrement de flore aérobique mésophile dans un mélange de viande de volaille.

Table 1 — Calculs des écarts-type de reproductibilité — Exemple du dénombrement de la flore aérobique mésophile dans un mélange de viande de volaille

i	x_{iA}	x_{iB}	$y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	$y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$	$\frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}$
1	$6,7 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	4,83	4,94	0,006 4
2	$7,1 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	6,85	6,79	0,001 7
3	$3,5 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	5,54	5,64	0,004 9
4	$1,0 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	7,00	6,63	0,067 2
5	$1,9 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	7,28	7,23	0,001 2
6	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	5,36	5,18	0,017 2
7	$5,3 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	8,72	8,61	0,006 2
8	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	4,00	4,08	0,003 1
9	$3,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	4,48	4,11	0,065 9
10	$1,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	8,04	8,34	0,045 3

En utilisant les données log-transformées y_{ij} , l'écart-type de reproductibilité est le suivant:

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}{n}} = \sqrt{\frac{0,006\ 4 + 0,001\ 7 + \dots + 0,045\ 3}{10}} = \sqrt{0,023\ 4} = 0,15 \text{ (log}_{10}\text{) ufc/g}$$

6 Écart-type de reproductibilité de la méthode dérivé d'un essai interlaboratoires

6.1 Généralités

Si la méthode utilisée comme méthode de routine par le laboratoire a été validée par un essai interlaboratoires, le laboratoire peut utiliser l'écart-type de reproductibilité de la méthode pour déduire l'estimation de son incertitude de mesure *dans certaines conditions* (voir ci-après). Ces prérequis sont justifiés par le fait que l'écart-type dérivé d'un essai interlaboratoires est lié à la méthode, non à un laboratoire donné qui rapporte une incertitude de mesure liée à ses résultats.

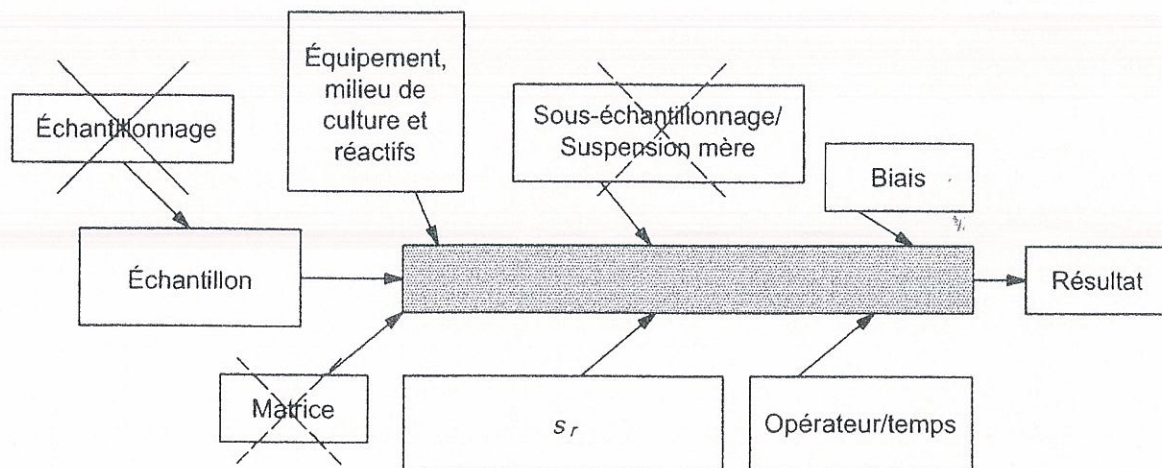
Ces conditions sont les suivantes:

- *le biais de laboratoire* doit être compatible avec celui escompté sur la base des estimations de répétabilité et de reproductibilité dérivées de l'essai interlaboratoires;
- *la fidélité des mesures au sein du laboratoire* doit être compatible avec celle escomptée sur la base des estimations de répétabilité et de reproductibilité dérivées de l'essai interlaboratoires;
- l'essai interlaboratoires a correctement pris en compte toutes les sources d'incertitude (en particulier la préparation et l'homogénéisation des échantillons).

L'ISO/TS 21748 décrit dans le détail comment vérifier que ces conditions sont remplies et comment établir une estimation d'incertitude composée avec les éventuels facteurs supplémentaires non pris en compte par l'essai interlaboratoires.

6.2 Utilisation en microbiologie des aliments

La Figure 4 indique les principales sources d'incertitude prises en compte par ce protocole, ainsi que celle qui en est exclue, l'échantillonnage.



NOTE Les sources exclues sont barrées d'une croix.

Figure 4 — Principales sources d'incertitude prises en compte ou exclues lors d'une étude de reproductibilité interlaboratoires

Le degré de prise en compte du sous-échantillonnage et de la préparation de la suspension mère, ainsi que de l'influence de la matrice, dépend de la conception expérimentale de l'essai.

Cette approche permet à un laboratoire qui a participé à un essai interlaboratoires d'évaluer son biais de laboratoire, qui fait partie de la composante de biais de l'incertitude de mesure. Cet aspect n'est pas étudié en détail dans la présente Spécification technique.

Cependant, en microbiologie des aliments, cette approche se heurte à plusieurs limites, indiquées ci-après. Cela justifie qu'elle figure seulement en deuxième option.

Outre la nécessité de vérifier que la fidélité et le biais du laboratoire sont conformes aux valeurs correspondantes de l'essai interlaboratoires sur la méthode, seul un nombre limité de paramètres de reproductibilité a été dérivé d'essais interlaboratoires pour les méthodes de référence normalisées (c'est-à-dire le dénombrement de *B. cereus* selon l'ISO 7932, de *C. perfringens* selon l'ISO 7937, des staphylocoques à coagulase positive selon l'ISO 6888-1 et l'ISO 6888-2 et de *L. monocytogenes* selon l'ISO 11290-2).

De plus, il peut s'avérer difficile, à partir d'analyses spécifiques, de généraliser à l'ensemble des analyses de routine du laboratoire. Les valeurs de fidélité d'un essai interlaboratoires sont obtenues avec des combinaisons limitées et précisément définies de matrice, souche de micro-organismes, niveau de contamination, etc. et pour une microflore donnée (si elle est présente).

Enfin, compte tenu des exigences d'homogénéité concernant les échantillons utilisés pour les essais interlaboratoires, la nécessité d'envoyer aux laboratoires des échantillons homogénéisés et stabilisés induit une réduction de la variation « naturelle » de contamination des échantillons qui peut être constatée dans la pratique, ce qui entraîne une sous-estimation de l'incertitude.

7 Écart-type de reproductibilité dérivé d'un essai interlaboratoires d'aptitude

Si le laboratoire a participé à un essai interlaboratoires d'aptitude, il peut utiliser l'écart-type de reproductibilité de cet essai pour déduire son incertitude de mesure, dans les conditions suivantes:

- pour l'essai interlaboratoires, le laboratoire a utilisé la même méthode que pour les analyses de routine;
- les échantillons utilisés au cours de l'essai sont comparables (en termes de matrice et de niveau de contamination) à ceux soumis à l'analyse de routine;
- les laboratoires qui ont participé à l'essai n'ont pas employé des méthodes empiriques différentes, ou bien un nombre suffisant de participants ont utilisé la même méthode, de manière à permettre une estimation correcte de l'écart-type de reproductibilité.

La Figure 4 indique les principales sources d'incertitude prises en compte par ce protocole, ainsi que celle qui en est exclue: l'échantillonnage.

Un des intérêts de cette approche est de permettre à un laboratoire qui a participé à l'essai interlaboratoires d'évaluer partiellement sa composante de biais de l'incertitude de mesure. Cet aspect n'est pas traité en détail dans la présente Spécification technique.

8 Expression de l'incertitude de mesure dans les rapports d'essai

Une fois que l'incertitude de mesure a été obtenue comme indiqué ci-dessus, elle peut, si nécessaire, figurer dans le rapport avec le résultat d'essai, sous forme d'intervalle en \log_{10} (voir Note en 5.3), ou sous forme de valeurs naturelles (nombre d'ufc/g ou par ml), ou en pourcentage, comme l'illustre l'exemple suivant. Ne pas utiliser plus de deux chiffres significatifs pour noter le résultat ou l'intervalle d'incertitude.

En notant le résultat d'essai $y = \log_{10} x$, et l'écart-type de reproductibilité s_R , l'incertitude élargie U , avec un facteur d'élargissement de 2 (donnant un niveau de confiance de 95 %) est donnée par $2s_R$.

Le résultat d'essai peut être consigné selon l'une des possibilités suivantes:

- $y \pm 2s_R$ (log);
- $y \log [y - 2s_R, y + 2s_R]$;
- x ufc/g ou x ufc/ml [10^{y-2s_R} , 10^{y+2s_R}];
- x ufc/g ou x ufc/ml [$10^y - \frac{10^{y-2s_R}}{10^y} \%$, $10^y + \frac{10^{y+2s_R}}{10^y} \%$].

EXEMPLE Un écart-type de reproductibilité s_R de $\pm 0,15 \log_{10}$ a été trouvé. L'incertitude élargie U , avec un facteur d'élargissement de 2 (niveau de confiance de 95 %) est de $0,15 \times 2 = 0,3 \log$. Le résultat d'essai est $5,0 \log$ ufc/g.

Par conséquent, le résultat d'essai peut être exprimé selon l'une des possibilités suivantes:

- $5,0 \log \pm 0,3 \log$;
- $5,0 \log [4,7, 5,3]$;
- 10^5 cfu/g [5×10^4 , 2×10^5];
- 10^5 cfu/g [$10^5 - 50 \%$, $10^5 + 100 \%$].

Document n° 4

3) Approche plans spécifiques

L'approche plans d'expérience spécifiques ne peut être utilisée qu'avec des échantillons réels stables dans le temps. Le temps de stabilité de l'échantillon correspond au temps de mise en œuvre de l'analyse fixée depuis le prélèvement et la réception des échantillons au laboratoire selon les critères, soit indiqués dans les méthodes de référence, soit selon les recommandations de la norme NF EN ISO 5667-3, soit définis et justifiés par le laboratoire s'il n'existe pas de critères.

Cette approche doit être appliquée à des matrices réelles et des niveaux de concentrations généralement rencontrés par le laboratoire.

4) Approche interlaboratoire

L'approche interlaboratoire peut être utilisée uniquement lorsque le laboratoire a participé aux essais interlaboratoires. Cette approche tient compte de l'effet laboratoire et représente une incertitude a priori maximisée.

La valeur $R = 2,8 \times s_{R \text{ inter}}$ permet d'évaluer l'accord probable entre des résultats obtenus par plusieurs laboratoires sur le même échantillon. R étant la limite de reproductibilité interlaboratoire, c'est à dire la valeur au dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai obtenus sous des conditions de reproductibilité.

[NF ISO 5725-1]

5 Mise en œuvre

5.1 Description du processus d'analyse

5.1.1 Définition du mesurande et description de la méthode d'analyse

— Il convient dans un premier temps de :

- préciser clairement l'objet de la mesure ;
- définir la grandeur mesurée ;
- exprimer la relation entre le mesurande et les grandeurs dont il dépend ;
- indiquer toutes les conditions opératoires.

— Exemple d'une relation entre le mesurande et les grandeurs dont il dépend :

$$C = A \times \frac{M}{V} \text{ (pour un résultat provenant d'un calcul direct sans étalonnage)}$$

où :

C = concentration ;

A = Constante ;

V = Volume ;

M = masse ;

$$C = C_{\text{étalonnage}} \times \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{prélevé}}} \text{ (paramètre avec étalonnage et dilution si nécessaire)}$$

où :

C = concentration ;

$C_{\text{étalonnage}}$ = concentration issue de la fonction d'étalonnage ;

V = volume.

5.1.2 Analyse du processus de mesure

— Dans un deuxième temps, identifier et recenser les différentes composantes de l'incertitude associée au résultat d'analyse à partir d'un diagramme «causes-effets» traduit par la méthode des 5M :

— À titre d'exemple :

- **Main d'œuvre** : Effet opérateur, etc.
- **Matière** : Effet échantillon (homogénéité, stabilité de l'échantillon, etc.) et consommables (réactifs, produits, solutions étalons de référence), Matrice, etc.
- **Matériel** : Effet équipement (réponse, sensibilité, mode d'intégration, etc.) et matériel de laboratoire (balance, verrerie, etc.).
- **Méthode** : Effet application du mode opératoire (conditions opératoires, succession des opérations, nombre de mesures, traitement des informations), etc.
- **Milieu** : Conditions ambiantes (température, pression, éclairage, vibration, rayonnement, humidité), etc.

5.2 Partie I : Approche découlant du GUM

5.2.1 Principe

Le principe est de regrouper les sources d'incertitudes identifiées dans l'analyse du processus de mesure (voir 5.1.2) en :

— une incertitude liée à l'échantillon : $u_{\text{échantillon}}(C)$.

Il s'agit de quantifier les sources d'incertitudes intervenant sur un échantillon, comme par exemple, l'homogénéité de l'échantillon, l'application du mode opératoire concernant l'échantillon par plusieurs personnes, d'où la prise en compte de l'effet «Matière», l'effet «Méthode» et de l'effet «Main d'œuvre».

— une incertitude liée aux grandeurs d'entrées intervenant directement dans le résultat d'analyse : $u_{\text{grandeurs}}(C)$.

Il s'agit de quantifier les sources d'incertitudes liées aux grandeurs d'entrées intervenant directement dans le résultat et qui n'ont pas été prises en compte dans $u_{\text{échantillon}}(C)$, comme certaines sources d'incertitudes liées aux matériels.

L'incertitude-type composée sur C est alors définie par $u_T(C) = \sqrt{u_{\text{échantillon}}(C)^2 + u_{\text{grandeurs}}(C)^2}$ pour un niveau de concentration donné.

5.2.2 Organisation des essais

5.2.2.1 Estimation de $u_{\text{échantillon}}(C)$: étude de fidélité

L'incertitude-type $u_{\text{échantillon}}(C)$ est estimée par l'analyse de 10 échantillons réels différents autour d'un niveau de concentration donné et pour une matrice équivalente.

Chaque échantillon est analysé en double dans une période de stabilité de l'échantillon et dans la durée de validité de l'étalonnage de la méthode en tenant compte par exemple de l'homogénéité de l'échantillon, de l'application du mode opératoire concernant l'échantillon par plusieurs personnes, de la dérive éventuelle de l'instrument.

L'incertitude-type $u_{\text{échantillon}}(C)$ est alors l'écart-type de fidélité calculés sur les 10 échantillons analysés en double et relatifs à un même niveau de concentration.

Tableau 2 — Organisation des essais pour l'étude de fidélité

Échantillon	Répétitions		Mesure	
	A	B	$S_{\text{fidélité},i}$	$VAR_{\text{fidélité},i}$
n° 1				
n° 2				
n° 3				
n° 4				
n° 5				
n° 6				
n° 7				
n° 8				
n° 9				
n° 10				

$$u_{\text{échantillon}}(C) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} VAR_{\text{fidélité},i}}{10}}$$

NOTE La détection de valeurs aberrantes pourra être étudiée à travers le test de Cochran [NF ISO 5725-2].

5.2.2.2 Estimation de $u_{\text{grandeurs}}(C)$: loi de propagation des incertitudes

L'incertitude-type $u_{\text{grandeur}}(C)$ est estimée par la loi de propagation des incertitudes intervenant directement dans le résultat.

Pour un résultat d'analyse $C = \frac{X \times Y}{Z}$ où X , Y et Z sont des grandeurs d'entrées indépendantes entre elles et intervenant directement dans le calcul du résultat d'analyse alors l'incertitude-type liée aux grandeurs sur l'échan-

tillon est $u_{\text{grandeurs}}(C)$ défini par $u_{\text{grandeurs}}(C) = C \times \sqrt{\left[\frac{u(X)}{X}\right]^2 + \left[\frac{u(Y)}{Y}\right]^2 + \left[\frac{u(Z)}{Z}\right]^2}$.

— Pour un résultat d'analyse $C = \frac{X - Y}{Z}$ où X , Y et Z sont des grandeurs d'entrées indépendantes entre elles et intervenant directement dans le calcul du résultat d'analyse alors l'incertitude-type liée aux grandeurs sur

l'échantillon est $u_{\text{grandeurs}}(C)$ défini par $u_{\text{grandeurs}}(C) = C \times \sqrt{\left[\frac{u(Z)}{Z}\right]^2 + \left[\frac{u(X)}{X - Y}\right]^2 + \left[\frac{u(Y)}{X - Y}\right]^2}$.

— Par exemple :

$$\bullet \quad C = 1\,000 \frac{(M_b - M_a)}{V} \Rightarrow u_{\text{grandeurs}}(C) = C \times \sqrt{\left[\frac{u(V)}{V}\right]^2 + \left[\frac{u(M_a)}{M_b - M_a}\right]^2 + \left[\frac{u(M_b)}{M_b - M_a}\right]^2}$$

$$\bullet \quad C \times C_{\text{étalonnage}} \times \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{prélevé}}} \text{ avec } C_{\text{étalonnage}} = \text{concentration issue de la fonction d'étalonnage}$$

$$\Rightarrow u_{\text{grandeurs}}(C) = C \times \sqrt{\left[\frac{u(C_{\text{étalonnage}})}{C_{\text{étalonnage}}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{\text{final}})}{V_{\text{final}}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{\text{prélevé}})}{V_{\text{prélevé}}}\right]^2}$$

5.2.3 Cas particulier : lorsque la concentration de l'échantillon est donnée directement par un étalonnage

Si la concentration sur un échantillon est donnée directement par un étalonnage alors $C = C_{\text{étalonnage}}$, une approche GUM pourra être utilisée pour estimer $u_T(C) = u_T(C_{\text{étalonnage}})$.

$$u_T(C) = \sqrt{u_{\text{échantillon}}(C)^2 + u_{\text{grandeurs}}(C)^2} = \sqrt{u_{\text{échantillon}}(C)^2 + u_{\text{étalonnage}}(C)^2}$$

$$u_T(C) = \sqrt{u_{\text{échantillon}}(C)^2 + u_{\text{étalonnage,A}}(C)^2 + u_{\text{étalonnage,B}}(C)^2}$$

avec :

$u_{\text{échantillon}}(C)$: l'incertitude-type liée au traitement de l'échantillon ;

$u_{\text{étalonnage}}(C)$: l'incertitude-type liée aux sources d'incertitude qui existent dans l'étalonnage.

NOTE Dans le cas d'une dilution éventuelle, en tenir compte dans $u_{\text{grandeurs}}(C)$ selon l'exemple défini en 5.2.2.2 et dans le choix de la concentration des échantillons pour $u_{\text{échantillon}}(C)$.

— $u_{\text{étalonnage,B}}(C)$: l'incertitude-type liée aux sources d'incertitude de type B qui existent dans l'étalonnage et qui ne sont pas prises en compte dans les répétitions des résultats du plan A de la norme XP T 90-210.

Par exemple, c'est l'incertitude, sur les étalons apportée par l'erreur de justesse du matériel ou/et sur la solution mère qui intervient dans la préparation des étalons.

REMARQUES Préparer un étalon $C_{\text{étalon}}$ à partir d'un volume prélevé $V_{\text{prélevé}}$ d'une solution mère $C_{\text{mère}}$ et en complétant dans un volume final V_{final} apporte une incertitude-type égale à $u(C_{\text{étalon}})$.

$$u_{\text{étalonnage,B}}(C) = u(C_{\text{étalon}})$$

$$= C_{\text{étalon}} \times \sqrt{\left[\frac{u(C_{\text{mère}})}{C_{\text{mère}}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{\text{final}})}{V_{\text{final}}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{\text{prélevé}})}{V_{\text{prélevé}}}\right]^2}$$

Si l'incertitude sur une grandeur X est donnée par l'EMT (écart maximum toléré) et en absence d'une information supplémentaire, alors l'incertitude-type sur la grandeur X est $u(X) = \frac{EMT}{\sqrt{3}}$.

— $u_{\text{étalonnage,A}}(C)$: l'incertitude-type liée aux sources d'incertitude de type A qui existent dans l'étalonnage :

- préparation des solutions d'étalonnage ;
- matériels utilisés ;
- système d'intégration ;
- mesure de la réponse ;
- sensibilité de l'appareil sur la durée de vie de l'étalonnage ;
- erreur du modèle utilisé (erreur résiduelle).

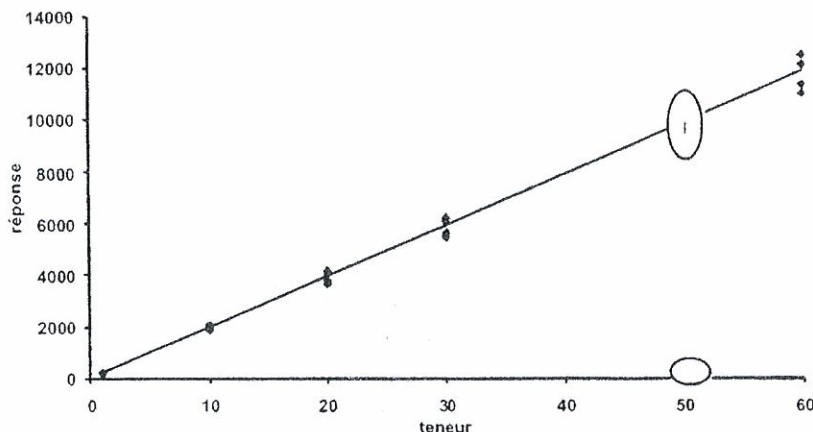


Figure 1 — Courbe d'étalonnage

Deux approches possibles :

Cas 1 :

$u_{\text{étalonnage, A}}(C)$ est estimée par le plan A de la norme XP T 90-210 en prenant l'écart-type des teneurs estimées (voir Annexe A).

Le principe est d'exploiter les résultats (valeurs d'information ou concentrations recalculées) de cinq gammes d'étalonnage, préparées par des opérateurs différents et analysées à des temps régulièrement répartis sur la période de réétalonnage choisie par le laboratoire.

Tableau 3 — Organisation des essais pour l'estimation de l'incertitude due à l'étalonnage de type A

Grandeurs	Gamme d'étalonnage : n°				
	1	...	i	...	n
Niv 1 : x_1	y_{11}		y_{ij}		y_{1n}
...					
Niv i : x_i	y_{i1}		y_{ij}		y_{in}
...					
Niv p : x_p	y_{p1}		y_{pj}		y_{pn}

où :

x_i est la grandeur de l'étalon i ; $x_{i,j}$ est la grandeur de l'étalon i de la gamme d'étalonnage n° j .

y_{ij} est la $j^{\text{ème}}$ valeur d'information pour l'étalon de grandeur x_i .

Cas 2 :

Le laboratoire possède dans le temps un suivi de courbes d'étalonnage et un suivi de solutions étalon (par exemple 20 et 80 % du domaine d'étalonnage).

L'écart-type de fidélité obtenu par le suivi des solutions étalons dans le temps est une estimation de $u_{\text{étalonnage, A}}(C)$.

NOTE Dans le cas où la solution mère varie à chaque étalonnage ainsi que la verrerie utilisée, alors toutes les sources d'incertitude seront prises en compte dans les répétitions des résultats du plan A de la norme XP T 90-210 et il ne faut pas ajouter $u_{\text{étalonnage, B}}(C)$.

5.2.4 Représentation numérique et graphique des effets

Il est intéressant de calculer et de représenter graphiquement la contribution des effets composant l'incertitude totale.

Pour une concentration C liée à deux grandeurs X et Y indépendantes dont l'incertitude-type totale $u_T(C)$ est définie par :

$$u_T(C) = \sqrt{u_{\text{échantillon}}(C)^2 + u_{\text{grandeur X}}(C)^2 + u_{\text{grandeur Y}}(C)^2}$$

Tableau 4 — Bilan des incertitudes-type

Niveau	$u_X(C)$	$u_Y(C)$	$u_{\text{échantillon}}(C)$	$u_T(C)$
Niv 1				
Niv 2				
Niv 3				

L'effet de la grandeur X pour un niveau donné est estimé par le rapport $\frac{u_X(C)^2}{u_T(C)^2}$ en %.

Un Tableau récapitulatif sur chaque effet et sur chaque niveau est donné puis est représenté graphiquement.

Tableau 5 — Bilan des effets

Niveau	effet _{grandeur X}	effet _{grandeur Y}	effet _{échantillon}
Niv 1			
Niv 2			
Niv 3			

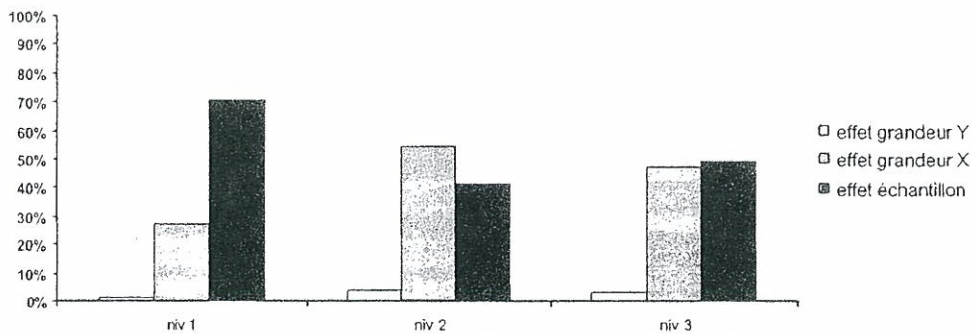


Figure 2 — Représentation des différentes sources d'incertitude

5.2.5 Conclusion

Les résultats de l'estimation de l'incertitude pour l'approche GUM pour 3 niveaux (par exemple) sont regroupés dans le Tableau suivant (voir Tableau 6)

$$u_T(C) = \sqrt{u_{\text{échantillon}}(C)^2 + u_{\text{grandeurs}}(C)^2}$$

Tableau 6 — Bilan de l'approche GUM

Niveau	Incertitude-type due aux grandeurs	Incertitude-type due à l'échantillon	Incertitude-type composée absolue	Incertitude-type composée relative
Niveau 1 : C ₁	$u_{\text{grandeurs}}(C_1)$	$u_{\text{échantillon}}(C_1)$	$u_T(C_1)$	$u_T(C_1) / C_1$ en %.
Niveau 2 : C ₂	$u_{\text{grandeurs}}(C_2)$	$u_{\text{échantillon}}(C_2)$	$u_T(C_2)$	$u_T(C_2) / C_2$ en %.
Niveau 3 : C ₃	$u_{\text{grandeurs}}(C_3)$	$u_{\text{échantillon}}(C_3)$	$u_T(C_3)$	$u_T(C_3) / C_3$ en %.

5.3 Partie II : Approche contrôle interne

5.3.1 Principe

Le principe est d'analyser un témoin (matériau synthétique ou un matériau de référence) comme un échantillon dans le temps pour une concentration donnée.

L'étude de l'incertitude revient à l'étude de la reproductibilité interne de la méthode $s_{R \text{ interne}}$.

5.3.2 Organisation des essais

L'organisation des essais est la suivante : effectuer des mesures pendant p jours (voir Tableau 7). Faire au moins $p = 20$ mesures. Mettre les données sur une colonne.

Tableau 7 — Organisation des essais pour l'étude du contrôle interne

Jour	Répétitions
1	x_1
...	...
i	x_i
...	...
p	x_p

5.3.3 Calcul de la reproductibilité interne

Calculer l'écart-type de la reproductibilité interne $S_{R \text{ interne}}$ au niveau du témoin

$$S_{R \text{ interne}} = \sqrt{\frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (\bar{x} - x_i)^2}$$

Calculer le coefficient de variation de reproductibilité interne $CV_{R \text{ interne}} = S_{R \text{ interne}} / \text{cible}$ en pourcentage. où la cible est égale à \bar{x} ou la valeur cible théorique.

5.3.4 Représentation graphique

À partir des paramètres : cible (valeur cible théorique du contrôle interne ou moyenne obtenue) et écart-type de reproductibilité interne $S_{R \text{ interne}}$.

Les limites de surveillance et les limites de contrôle autour de la cible sont :

- $LS_1^S = \text{cible} \pm 2 S_{R \text{ interne}}$ (variation «normale» d'un résultat : 95,45 %) ;
- $LC_1^S = \text{cible} \pm 3 S_{R \text{ interne}}$ (variation «presque sûre» d'un résultat, 99,73 %).

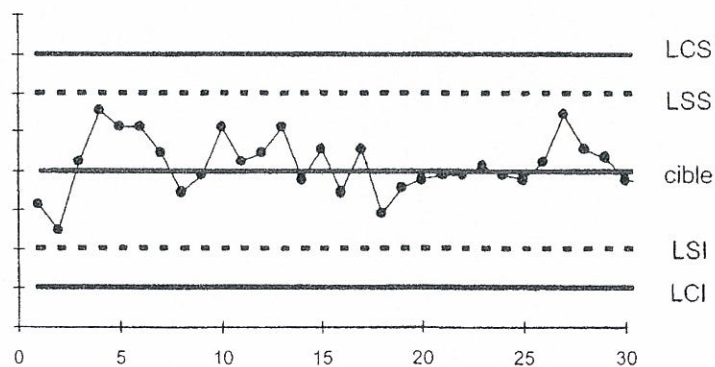


Figure 3 — Carte de contrôle

5.3.5 Conditions particulières d'utilisation

Dans le cas où le contrôle interne ne représente pas la totalité du processus d'analyse, une étude de fidélité par un calcul de $u_{\text{échantillon}}(C)$ (voir 5.2.2.1) peut permettre d'approcher l'estimation de l'incertitude :

$$u_T(C) = \sqrt{u_{\text{échantillon}}(C)^2 + s_{R \text{ interne}}(C)^2}$$

5.3.6 Conclusion

Les résultats de l'estimation de l'incertitude par l'approche contrôle interne sont regroupés dans le Tableau suivant (voir Tableau 8).

Tableau 8 — Bilan du contrôle interne

Niveau de concentration du contrôle interne	\bar{x} ou cible
Incertitude-type composée absolue = écart-type de reproductibilité interne	$s_{R \text{ interne}}$
Incertitude-type composée relative = coefficient de variation de reproductibilité interne	$CV_{R \text{ interne}}$

5.4 Partie III : Approche plans d'expériences spécifiques

5.4.1 Principe

L'approche plans d'expériences spécifiques ne peut être utilisée qu'avec des échantillons réels stables dans le temps. Le temps de stabilité de l'échantillon correspond au temps de mise en œuvre de l'analyse fixée depuis le prélèvement des échantillons selon les critères soit indiqués dans les méthodes de référence soit selon les recommandations de la norme NF EN ISO 5667-3 soit définis et justifiés par le laboratoire.

Cette approche doit être appliquée à des matrices réelles et des niveaux de concentrations généralement rencontrés par le laboratoire.

5.4.2 Organisation des essais

Le laboratoire effectue 10 analyses sur le même échantillon réel en changeant les conditions de mesure, chaque analyse étant répétée 2 fois dans des conditions qui prennent en compte la dérive de l'équipement dans une série d'analyse (par exemple en début et fin de série d'analyse).

Tableau 9 — Organisation des essais pour l'étude intra-laboratoire

Changement de conditions	Répétitions		Calculs		
	1	2	\bar{x}_i	s_i	VAR_i
n° 1					
n° 2					
n° 3					
n° 4					
n° 5					
n° 6					
n° 7					
n° 8					
n° 9					
n° 10					

\bar{x}_i , s_i et Var_i la moyenne, l'écart-type et la variance des répétitions dans le changement de conditions n° i.

5.4.3 Calcul de la reproductibilité intralaboratoire

À travers une analyse de variance, nous obtenons :

$$S_{\text{répét}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} VAR_i}{10}}$$

$$S_{R \text{ intra}} = \sqrt{VAR(\bar{x}_i) + \frac{S_{\text{répét}}^2}{2}}$$

La reproductibilité intralaboratoire est évaluée par un écart-type $S_{R \text{ intra}}$ et un coefficient de variation $CV_{R \text{ intra}}$.

Calculer le coefficient de variation de reproductibilité pour un niveau, $CV_{R \text{ intra}} = S_{R \text{ intra}} / \bar{x}$ en %.

Où \bar{x} est la moyenne des \bar{x}_i , définis 5.4.2.

NOTE La détection de valeurs aberrantes pourra être étudiée à travers le test de Cochran et le test de Grubbs [NF ISO 5725-2].

5.4.4 Validation des changements de conditions opératoires

Pour que cette approche soit significative, il est important que le changement des conditions opératoires soit représentatif des sources d'incertitude les plus importantes (exemple : changement d'étalonnage par un autre opérateur à chaque analyse).

[NF X 06-072]

Un test statistique peut être mis en place pour valider l'effet «changement des conditions opératoires». Il s'agit de comparer l'erreur due aux changements de conditions à l'erreur de répétabilité par la comparaison du rapport $F = \frac{2 \times \text{Variance des 10 moyennes}}{\text{Variance de répétabilité}}$ et de le comparer à la valeur critique de Fisher au seuil de 5 %.

$VC = F(9 ; 10 ; 5\%) = 3,02$.

Mener l'interprétation de la manière suivante :

- si le rapport F est **supérieur** à la valeur critique VC , l'effet «changements de conditions opératoires» est significatif. L'écart-type de reproductibilité intra-laboratoire est exploitable.
- si le rapport F est **inférieur ou égal** à la valeur critique VC , l'effet «changements de conditions opératoires» est négligeable. L'écart-type de reproductibilité n'est pas exploitable. Le plan d'expérience est à recommencer en tenant compte des sources d'incertitude négligées.

5.4.5 Conclusions

Les résultats de l'approche des plans d'expériences spécifiques intralaboratoires pour trois niveaux (par exemple) sont regroupés dans le Tableau suivant (voir Tableau 10).

Tableau 10 — Bilan des plans d'expérience spécifiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Moyenne	\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{x}_3
Incertitude-type composée absolue = écart-type de reproductibilité intra-laboratoire	$S_{R \text{ intra},1}$	$S_{R \text{ intra},2}$	$S_{R \text{ intra},3}$
Incertitude-type composée relative = coefficient de variation de reproductibilité intra-laboratoire	$CV_{R \text{ intra},1}$	$CV_{R \text{ intra},2}$	$CV_{R \text{ intra},3}$

5.5 Partie IV : Approche essais interlaboratoires

5.5.1 Principe et exploitation des essais

Le principe est d'exploiter les données des essais interlaboratoires auxquels le laboratoire participe.

Dans un premier temps, il convient de collecter les données des essais interlaboratoires sous la forme d'un tableau suivant pour une matrice donnée :

Tableau 11 — Bilan des essais interlaboratoires

Date	Valeur consensuelle de référence M	$s_{R\ inter}$	$CV_{R\ inter}$ en %	Valeur du laboratoire m	Z-score
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Le Z-score est défini par le calcul de $(m - M) / s_{R\ inter}$.

NOTE Un Z-score supérieur à + 3 ou inférieur à - 3 permet de considérer que le laboratoire a eu un résultat très éloigné de M.

Une représentation graphique des Z-score peut accompagner le Tableau 11.

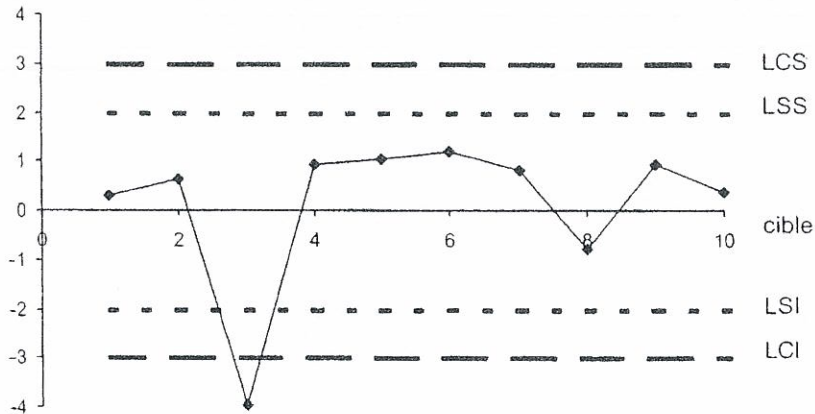


Figure 4 — Représentation graphique des Z-score

Dans un deuxième temps, il convient d'exploiter ces données pour estimer l'incertitude de mesure :

5.5.1.1 1^{er} cas : Le laboratoire dispose d'un nombre réduit de données d'essais interlaboratoires auxquels il participe

Dans ce cas, le laboratoire ne peut exploiter directement que l'écart-type de reproductibilité interlaboratoire $s_{R\ inter}$ ou le CV de reproductibilité interlaboratoire $CV_{R\ inter}$ de l'essai auquel il a participé à la valeur consensuelle de référence (M).

5.5.1.2 2^e cas : Le laboratoire dispose de nombreuses données à différents niveaux de concentration d'essais interlaboratoires auxquels il participe

Dans ce cas, le laboratoire trace dans un premier temps graphiquement l'écart-type de reproductibilité interlaboratoire $s_{R\ inter}$ ou le CV de reproductibilité interlaboratoire $CV_{R\ inter}$ en fonction de la valeur consensuelle de référence de l'essai (M).

- 1) L'écart-type de reproductibilité interlaboratoire $s_{R\ inter}$ est constant en fonction de la valeur consensuelle de référence de l'essai, alors l'incertitude peut être exprimée directement sur tout le domaine d'application de la méthode à partir de L'écart-type de reproductibilité interlaboratoire $s_{R\ inter}$
- 2) Le CV de reproductibilité interlaboratoire $CV_{R\ inter}$ est constant en fonction de la valeur consensuelle de référence de l'essai, alors l'incertitude peut être exprimée directement sur tout le domaine d'application de la méthode à partir du CV de reproductibilité interlaboratoire $CV_{R\ inter}$
- 3) Ni le CV de reproductibilité interlaboratoire $CV_{R\ inter}$, ni l'écart-type de reproductibilité interlaboratoire $s_{R\ inter}$ n'est constant en fonction de la concentration de la valeur consensuelle de référence de l'essai, dans ce cas exprimer l'incertitude soit en CV soit en écart-type pour des domaines séparés de concentration.

5.5.2 Conclusion

Les résultats de l'approche essais interlaboratoires sont regroupés dans le Tableau suivant (voir Tableau 12).

Tableau 12 — Bilan des essais interlaboratoires

Si	Si	Si
$CV_{R\ inter}$ constant sur le domaine de concentration	$s_{R\ inter}$ constant sur le domaine de concentration	$CV_{R\ inter}$ et $s_{R\ inter}$ n'est pas constant sur le domaine de concentration
incertitude-type relative = $CV_{R\ inter}\%$	Incetitude-type absolue = $s_{R\ inter}$	Incetitude-type s'exprimera en fonction des domaines de concentrations en écart-type ou en coefficient de variation

NOTE La dispersion intra-laboratoire $s_{R\ intra}$ peut être estimée par $\lambda s_{R\ inter}$ avec $s_{R\ inter}$ la dispersion inter-laboratoire établie dans le Tableau 12 et λ une valeur simple ($\lambda = 1/2$ ou $\lambda = 1/3$ ou $\lambda = 1/4$).

λ représente une estimation du rapport entre la dispersion intra et interlaboratoire.

Deux tests statistiques doivent valider la valeur λ avec un minimum de $p = 10$ Z-scores obtenus dans le Tableau 11.

— Test de fidélité pour valider le rapport λ

Si l'écart-type des Z-scores est compris dans l'intervalle : $\left[\lambda \sqrt{\frac{\chi_{99,5\%}^2(p-1)}{p-1}} ; \lambda \sqrt{\frac{\chi_{0,5\%}^2(p-1)}{p-1}} \right]$.

— Test de justesse pour valider le rapport λ

Si la moyenne des Z-scores est compris dans l'intervalle : $\left[-3 \frac{\lambda}{\sqrt{p}} ; +3 \frac{\lambda}{\sqrt{p}} \right]$.

6 Détermination et présentation de l'incertitude

Une comparaison peut être réalisée par le laboratoire entre les valeurs obtenues par l'approche GUM, le contrôle interne, les plans d'expériences spécifiques, et les essais interlaboratoires.

Tableau 13 — Bilan des différentes démarches

	Incetitude-type composée absolue exprimée en écart-type ou incetitude-type composée relative exprimée en coefficient de variation pour une concentration proche de				
Approche «GUM»					
Approche «contrôle interne»					
Approche «plans d'expériences spécifiques»					
Approche «essais inter-laboratoire»					

La nature des échantillons analysés (matrice) ainsi que la nature des solutions utilisées pour le contrôle interne (synthétique ou matériau de référence certifié) doit être précisée.

L'incertitude s'exprimera sous la forme d'un écart-type ou d'un coefficient de variation, puis multiplié par 2 pour exprimer la dispersion des valeurs pouvant raisonnablement être attribuées au mesurande.

Dans le cas de l'expression d'un écart-type, l'arrondi de la valeur d'incertitude ($U = 2 s$) doit rester cohérent avec le format de résultat d'analyse.

Dans le cas de l'expression en coefficient de variation, la valeur d'incertitude ($U = 2 CV$) est arrondie à la valeur supérieure de 5 en 5.

Cas 1 :

L'écart-type est constant sur tout le domaine de concentration, alors l'incertitude peut être exprimée directement sur tout ce domaine à partir de l'écart-type s .

Cas 2 :

Le CV est constant sur tout le domaine de concentration, alors l'incertitude peut être exprimée directement sur tout ce domaine à partir du CV .

Cas 3 :

Ni le CV , ni l'écart-type ne sont constant sur tout le domaine de concentration, dans ce cas exprimer l'incertitude soit en CV soit en écart-type pour des domaines séparés de concentration.

Tableau 14 — Bilan de l'estimation de l'incertitude sur tout le domaine de concentration

Si	Si	Si
CV constant sur le domaine de concentration	s constant sur le domaine de concentration	CV et s n'est pas constant sur le domaine de concentration
Incertitude élargie relative $U = 2 CV$ (arrondie à la valeur supérieure de 5 en 5)	Incertitude élargie absolue $U = 2 s$	Incertitude élargie s'exprimera en fonction des domaines de concentrations en écart-type ou en coefficient de variation en multipliant par 2 ($U = 2 CV$ arrondie à la valeur supérieure de 5 en 5)

Dans tous les cas, quelque soit l'approche utilisée, le laboratoire doit exprimer l'incertitude de mesure associée à un résultat d'essai en précisant l'approche utilisée.

Document n° 5

spatiale et au minimum une séparation temporelle de l'ensemencement et de la préparation des milieux, afin de maîtriser le risque d'intercontamination. Il en va de même pour les différentes matrices « eau ».

Ces dispositions sont à décrire au sein de procédure(s).

Pour les analyses microbiologiques, celles-ci ne doivent, en aucun cas, être réalisées dans le même local que les analyses biomédicales ou de santé animale.

Conformément aux pratiques de la profession, les laboratoires doivent manipuler (et notamment ensemencer) en conditions d'ambiance maîtrisées, près d'un bec bunsen ou sous un poste de sécurité microbiologique par exemple.

Le contrôle qualité interne (contrôles à blanc, contrôle de l'air, des surfaces...) apportera la preuve de la pertinence des dispositions retenues pour limiter les contaminations. Les laboratoires pourront utiliser des systèmes actifs à impact d'air ou une méthode basée sur un impact « passif » des particules de l'air sur une gélose (sédimentation).

La fréquence et la pertinence de ces contrôles sont à établir en fonction de l'activité et de l'environnement de travail.

L'accumulation de résultats satisfaisants peut justifier une réduction de la fréquence des contrôles.

L'accumulation de résultats non satisfaisants peut justifier une augmentation de la fréquence des contrôles.

Pour les analyses de biologie moléculaire, le laboratoire devra mettre en place une organisation des locaux permettant d'éviter les contaminations croisées.

7.4 Méthode d'essai

*NF EN ISO CEI 17025 chap. 5.4
LAB REF 02 § 9.2*

7.4.1 Validation des méthodes

Pour chaque analyse, il convient de se reporter au domaine d'application défini par la norme.

Il est fortement recommandé de respecter les méthodes normalisées (AFNOR, CEN, ISO...). Cependant, conformément au document Cofrac LAB REF 08, les laboratoires ont la possibilité d'appliquer des méthodes internes (généralement basées sur des normes). Le recours à des méthodes internes doit être fait en accord avec le client et/ou avec la réglementation (santé ou environnement) lorsque applicable.

Pour tout écart aux normes et notamment une utilisation hors du domaine défini dans celles-ci, la méthode est considérée comme « interne » et doit être validée. Une expertise documentaire est généralement requise pour que le Cofrac puisse se prononcer sur l'accréditation du laboratoire pour l'emploi de la méthode en question.

7.4.2 Incertitudes de mesure

Conformément au document LAB REF 02 § 9.2.3.1, les laboratoires doivent a minima identifier les sources d'incertitudes et établir un plan d'action précisant les étapes mises en œuvre pour déterminer leurs incertitudes de mesure. Ils doivent par ailleurs exploiter des données déjà acquises (provenant des comparaisons inter laboratoires, des contrôles internes de qualité par exemple).

Lors de la publication par l'AFNOR des normes « incertitudes de mesure en microbiologie », les laboratoires devront se mettre en conformité et achever leur démarche, pour les paramètres objets de ces normes.

7.5 Equipement

NF EN ISO CEI 17025 chap. 5.5

Les prescriptions qui suivent s'appliquent à la microbiologie.

Pour toute enceinte thermostatée (étuves, réfrigérateurs,...) ayant un impact critique sur les essais, et notamment celle au-dessus de 20°C, le contrôle effectif de la température est nécessaire, soit par enregistrement en continu soit par thermomètre mini-maxi.

Si l'enregistrement en continu est fortement recommandé, les laboratoires ont la possibilité d'effectuer leur contrôle à l'aide d'un système « mini-maxi ».

Dans tous les cas le laboratoire doit gérer les dépassements de température, et prendre les dispositions nécessaires pour garantir la validité des résultats fournis au client. Faut de preuve de la maîtrise de la température et de la durée de dépassement, les résultats doivent être invalidés.

Une cartographie doit être réalisée préalablement à la mise en service et en cas d'intervention importante. Il est recommandé d'effectuer cette cartographie en condition réelle (à mi-charge ou charge pleine). Le laboratoire devra par ailleurs se fixer une fréquence de contrôle pour assurer son suivi dans le temps.

Les laboratoires pourront par exemple suivre la norme XP X 15-140 pour effectuer leur cartographie. Les zones acceptables doivent être matérialisées.

La précision sur la température à atteindre doit être plus stricte quand la température est plus élevée et utilisée comme agent sélectif.

Ainsi, il est tolérable d'accepter $\pm 2^\circ\text{C}$ vers $+ 20 / + 22^\circ\text{C}$, et d'accepter $\pm 1^\circ\text{C}$ à $+ 37^\circ\text{C}$ et au-delà.

Les laboratoires doivent établir un schéma décisionnel de gestion de température d'incubation afin notamment de montrer la maîtrise des dépassements en température. Ce schéma prendra en compte au minimum le type d'analyses (souches), le type de dépassement (alarme haute ou basse) et la durée de l'écart de température par rapport à la consigne.

Les étuves ventilées sont acceptables, à condition de prendre des précautions pour éviter la dessiccation des géloses.

Pour les boîtes dont l'incubation se termine lors de jours chômés et le dimanche, il est possible (à titre d'exemples) de :

- soit passer les boîtes au réfrigérateur à l'issue de l'incubation habituelle (mais pour une durée inférieure à 48h),
- soit utiliser des étuves programmables, dont la température descend automatiquement vers $+ 4$ à $+ 6^\circ\text{C}$ à l'issue de l'incubation habituelle, et reporter la lecture. Pour les boîtes de gélose lactosée au Tergitol TTC, après sortie de l'enceinte réfrigérée, il est recommandé de les réchauffer à température ambiante avant de faire la lecture,
- soit assurer une permanence.

Document n° 6

Annexe A
(informative)

Exemple d'estimation de l'incertitude sur une méthode ELISA

Soit une méthode ELISA indirecte dont les résultats s'expriment en ratio DO échantillon / DO contrôle positif (E/P par exemple).

NOTE Les écarts-types sont exprimés en CV de reproductibilité (= écart-type de reproductibilité/moyenne du matériau de référence utilisé).

CV de reproductibilité observé sur le MRI du laboratoire :	12 %
CV de reproductibilité observé par le fournisseur du réactif :	7 %
CV reproductibilité observé lors de l'essai interlaboratoires :	11 %

Le laboratoire pourra retenir comme incertitude estimée toute valeur située entre la valeur minimale et la valeur maximale estimées avec un facteur d'élargissement $k = 2$.

Soit, dans le cas présent, une incertitude estimée située entre 14 % et 24 %.

Application :

Le seuil de positivité de la technique ELISA indirecte est de 0,40 (c'est-à-dire tout échantillon dont le E/P est supérieur à 0,40 est considéré comme positif).

Soit un échantillon dont le signal E/P observé est de 0,24.

Si le laboratoire a retenu l'incertitude estimée minimale de 0,14, il n'y a pas lieu d'attirer l'attention du client sur ce résultat.

Si le laboratoire a retenu l'incertitude estimée maximale de 0,24, il lui est recommandé d'attirer l'attention du client sur ce résultat, si le contexte lui paraît le nécessiter.

