



HAL
open science

Etude des méthodes de quantification en microbiologie

Armand Maul

► **To cite this version:**

Armand Maul. Etude des méthodes de quantification en microbiologie. Microbiologie et Parasitologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1981. Français. NNT : 1981METZ006S . tel-01775531

HAL Id: tel-01775531

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775531>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT
1, rue des Récollets 57000 METZ.

EXCLU
DU
PRET

THESE 1981

A. MAUL. ~~ASIMEMO~~

Etude des Méthodes de quantification
en Microbiologie.

U. 1. 1. 2

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19810115
Cote	S/Mz 81/6
Loc	

ETUDE DES METHODES DE QUANTIFICATION EN MICROBIOLOGIE

ATMAUL
ATMAUL



SOMMAIRE

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	
PREMIERE PARTIE : LOIS DE DISTRIBUTION	
I - 1 <u>La distribution binomiale. Approximation par la loi de Poisson et la loi normale.....</u>	2
I - 2 <u>Relations entre le nombre de germes présents dans un inoculum et les effets observés.....</u>	3
I - 2 - 1 Comptage direct sur boîtes.....	3
I - 2 - 2 Inoculation en milieu liquide....	4
DEUXIEME PARTIE : ESTIMATION DU NOMBRE DE MICROORGANISMES PAR LA METHODE DU NOMBRE LE PLUS PROBABLE (N.P.P.)	
II - 1 <u>Hypothèses fondamentales.....</u>	7
II - 2 <u>Calcul du N.P.P.</u>	7
II - 2 - 1 La fonction de vraisemblance.....	7
II - 2 - 2 Interprétation graphique du N.P.P. Etude d'un exemple.....	10
II - 2 - 3 Intervalle de confiance. Interprétation graphique.....	11
II - 3 <u>Les tables.....</u>	12
II - 4 <u>Fiabilité d'un résultat.....</u>	13

II - 5	<u>Réponses à trois questions essentielles.....</u>	16
II - 5 - 1	Volume le plus petit et volume le plus grand à inoculer.....	16
II - 5 - 2	Aspect qualitatif de l'estimation par le N.P.P.	18
II - 5 - 3	Distribution log-normale du N.P.P.	19
II - 5 - 3 - 1	Expression de l'écart-type.....	20
II - 5 - 3 - 2	Etude d'un exemple.....	20
II - 5 - 3 - 3	Indépendance de l'écart-type avec la densité.....	23
II - 5 - 3 - 4	Relation entre l'écart-type et le nombre de tubes.....	24
II - 5 - 4	Recherche d'un intervalle de confiance.....	26
II - 5 - 5	Conclusion.....	29
II - 6	<u>Etude du cas particulier : n = 96.....</u>	31
II - 7	<u>Interprétation des résultats et quelques applications.....</u>	33
II - 7 - 1	Choix du meilleur triplet.....	33
II - 7 - 2	Exploitation des résultats de plusieurs titrages pratiqués sur un même échantillon.....	34
II - 7 - 3	Mise en évidence d'une différence significative entre les densités de deux échantillons.....	37

II - 8	<u>Estimation de la densité à partir d'une dilution unique.....</u>	38
II - 8 - 1	Relation entre la loi binomiale et la loi normale.....	39
II - 8 - 2	Estimation de la densité u.....	39
II - 8 - 3	Relation entre la précision et la densité.....	41
II - 9	<u>Conclusion.....</u>	43

TROISIEME PARTIE : ESTIMATION DU NOMBRE DE MICROORGANISMES PAR
COMPTAGE DIRECT SUR MILIEU GELOSE

III - 1	<u>Estimation du titre d'une suspension en exploitant les résultats lus sur une seule boîte.....</u>	44
III - 2	<u>Précision de l'estimation.....</u>	46
III - 3	<u>Estimation de u à partir de plusieurs boîtes correspondant à des dilutions successives.....</u>	48
III - 4	<u>Etude comparative de la précision obtenue pour plusieurs méthodes.....</u>	50

QUATRIEME PARTIE : AUTRES METHODES DE TITRAGE

IV - 1	<u>La méthode de FISHER.....</u>	55
--------	----------------------------------	----

IV - 2 <u>La dose 50 %</u>	59
IV - 2 - 1 Définition.....	59
IV - 2 - 2 Méthode des Probits.....	61
IV - 2 - 3 Méthode des surfaces selon BEHRENS et KARBER.....	64
IV - 2 - 4 Méthode de REED et MUENCH.....	66
IV - 2 - 5 Discussion.....	67
 CONCLUSION GENERALE.....	 69
 ANNEXES.....	 71
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 89

INTRODUCTION

Depuis le début du siècle, de nombreux statisticiens se sont intéressés à l'évaluation quantitative d'une population bactérienne.

Plusieurs méthodes ont été mises au point. Parmi les plus utilisées figurent la numération directe des colonies apparues sur un milieu et surtout la méthode du nombre le plus probable (N.P.P.) qui est sans aucun doute celle qui présente le plus de difficultés mais aussi le plus d'intérêt sur le plan théorique.

Le présent travail se propose d'étudier quelques techniques de quantification en microbiologie en insistant plus particulièrement sur les deux méthodes précitées.

Les résultats des titrages en microbiologie se distinguent par leur mauvaise précision, qui n'a rien de comparable à ce que l'on peut attendre, par exemple, d'un dosage en chimie. Aussi cette étude tentera de faire ressortir les limites de chaque méthode ainsi que l'importance relative des différents paramètres affectant la précision des estimations, ceci afin de pouvoir choisir la technique la plus appropriée et de la mener dans les conditions les plus avantageuses, compte tenu des exigences fixées a priori sur la qualité du résultat.

Pour concrétiser l'exposé, le texte sera illustré de quelques exemples numériques, et les développements mathématiques qui risqueraient de lui donner une apparence trop abstraite ont été regroupés en annexe.

La première partie rappelle les principales distributions utilisées en microbiologie appliquée ainsi que quelques notions sur l'aspect quantitatif du développement des microorganismes sur un milieu solide ou liquide.

La deuxième partie est entièrement consacrée à la méthode du nombre le plus probable, ou N.P.P. L'approximation de la distribution du N.P.P. par la loi Log-normale y est mise à profit pour l'étude d'un cas particulier permettant une amélioration notable des résultats.

La troisième partie porte sur la méthode du comptage direct des colonies sur milieu gélosé et propose un estimateur de la population bactérienne par l'interprétation des résultats lus sur plusieurs boîtes ensemencées par des dilutions successives.

L'accent est mis sur l'importance du rapport de dilution pour la qualité de l'estimation.

Enfin deux autres méthodes de dosage sont exposées dans la quatrième partie : la méthode de Fisher ainsi que la dose effective 50 % qui en particulier est pratiquée en virologie et en toxicologie.

PREMIERE PARTIE

LOIS DE DISTRIBUTION

La première partie décrit de façon succincte les principales distributions utilisées dans les méthodes de quantifications exposées dans ce document et aborde quelques notions sur les phénomènes pouvant apparaître lors du développement des microorganismes dans un milieu nutritif.

Les éléments essentiels sont tirés de MEYNELL et MEYNELL.

1 LA DISTRIBUTION BINOMIALE - APPROXIMATION PAR LA LOI DE POISSON ET LA LOI NORMALE

. Soit une suspension mère de V ml contenant b microorganismes, et un aliquote de v ml. En supposant que les microorganismes sont isolés et ne forment pas d'amas, la probabilité pour un germe donné de se trouver dans l'échantillon est $\frac{v}{V}$ et la probabilité pour ce même germe d'être absent du prélèvement est égale à $1 - \frac{v}{V}$.

Si on désigne par X le nombre de microorganismes présents dans le prélèvement, X suit la loi binomiale de paramètres b et $\frac{v}{V}$.

La probabilité pour que X prenne la valeur k (k étant un nombre entier compris entre 0 et b) est :

$$P(X = k) = \binom{b}{k} \left(\frac{v}{V}\right)^k \left(1 - \frac{v}{V}\right)^{b-k}$$

L'espérance mathématique de X est donnée par $\frac{b v}{V}$

et son écart-type est égal à : $\sqrt{b \frac{v}{V} \left(1 - \frac{v}{V}\right)}$

. Dans le cas où $\frac{v}{V}$ est petit ($\frac{v}{V} \ll \frac{1}{10}$) et b est grand ($b \gg 50$)

la distribution binomiale précédente est approchée de façon satisfaisante par la loi de Poisson de paramètre $\lambda = \frac{b v}{V}$,

où $\frac{b v}{V} = \mu$ représente le nombre de microorganismes de la suspension mère par unité de volume.

$$P(X = k) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^k}{k!}$$

Cette distribution est fondamentale en microbiologie car, en effet, les hypothèses $\frac{v}{V} \ll \frac{1}{10}$ et $b \gg 50$ sont généralement satisfaites. Par conséquent, dans la plupart des cas, on pourra supposer que le nombre de germes présents dans un inoculum suit une loi de Poisson.

L'espérance mathématique et l'écart-type d'une telle distribution sont respectivement λ et $\sqrt{\lambda}$.

. Si de plus $\lambda \geq 50$, la distribution de Poisson peut être avantageusement remplacée par la loi normale de moyenne λ et d'écart-type $\sqrt{\lambda}$, ce qui permet une exploitation des résultats beaucoup plus facile et plus rapide. (11)

2 RELATIONS ENTRE LE NOMBRE DE GERMES PRESENTS DANS UN INOCULUM ET LES EFFETS OBSERVES

2 - 1 Comptage direct sur boîtes

Le nombre de microorganismes se développant dans un inoculum est en général proportionnel au nombre de microorganismes initialement contenus dans cet inoculum.

y étant le nombre de colonies et x le nombre de germes inoculés on a : $y = p x$; le coefficient de proportionnalité p représentant la probabilité qu'a un germe de se développer.

Dans certains cas, la formation d'une colonie nécessite la participation de plusieurs microorganismes, c'est le phénomène de synergie (surtout observable dans le cas des virus).

Dans d'autres cas, au contraire, à partir d'une certaine densité, on peut déceler des phénomènes d'antagonisme. Ces différentes possibilités sont schématisées sur la figure 1.

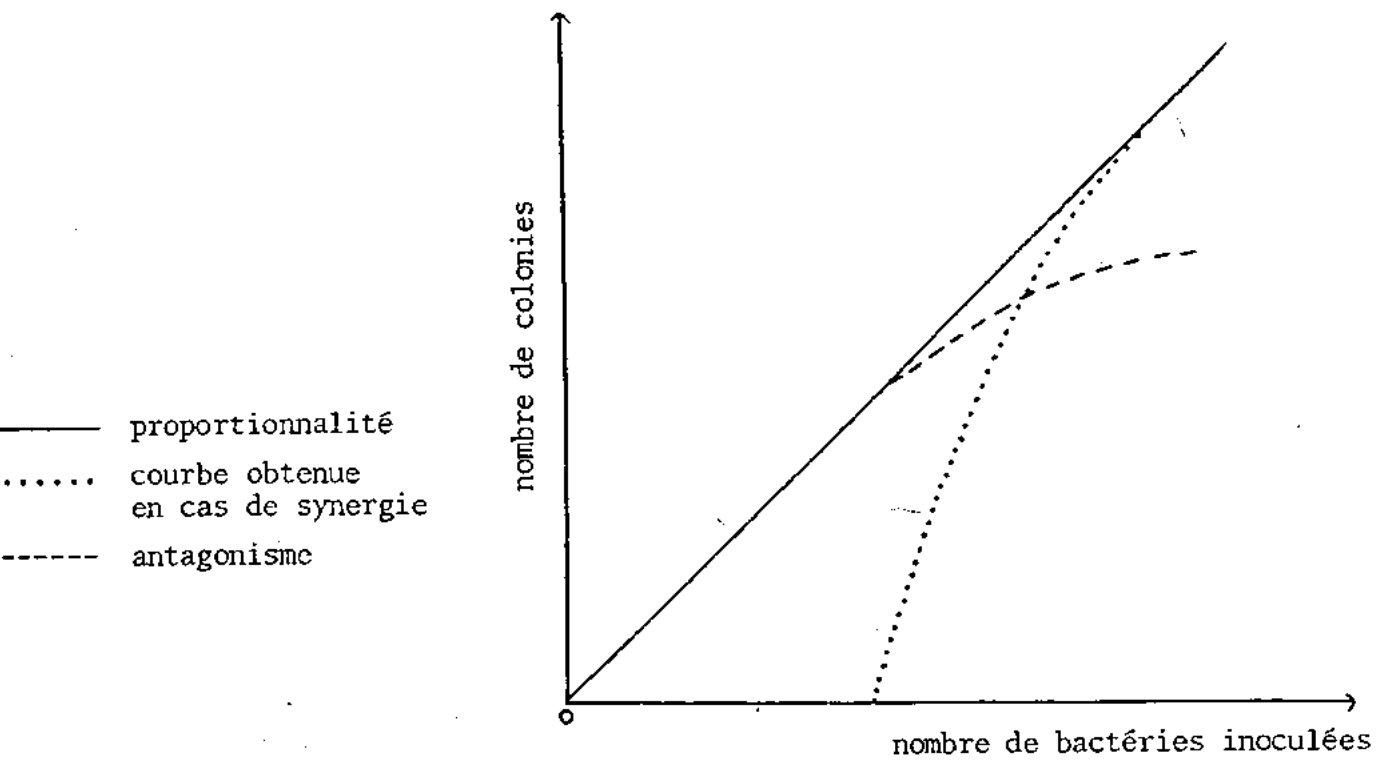


Figure 1 : Relation entre le résultat du comptage et le nombre de bactéries inoculées.

2 - 2 Inoculation en milieu liquide

La technique d'inoculation en milieu liquide suppose que toute bactérie inoculée se développe ($p = 1$).

La suspension à titrer est diluée à plusieurs niveaux et un volume donné de chaque dilution est inoculé dans 1 ou plusieurs tubes contenant un milieu nutritif. Après inoculation, des systèmes révélateurs permettent de mettre en évidence les tubes ayant reçu au moins un germe ainsi que les tubes stériles. Si m désigne le nombre moyen de microorganismes contenus dans un inoculum à un niveau de dilution donné, la probabilité pour un tube d'être stérile est égale à e^{-m} (c'est le premier terme de la distribution de Poisson avec $\lambda = m$) et la probabilité pour un tube d'être positif est égale à : $1 - e^{-m} = P$.

En représentant graphiquement P en fonction de $\log m$, on obtient une courbe caractéristique appelée courbe dose-réponse (Figure 2).

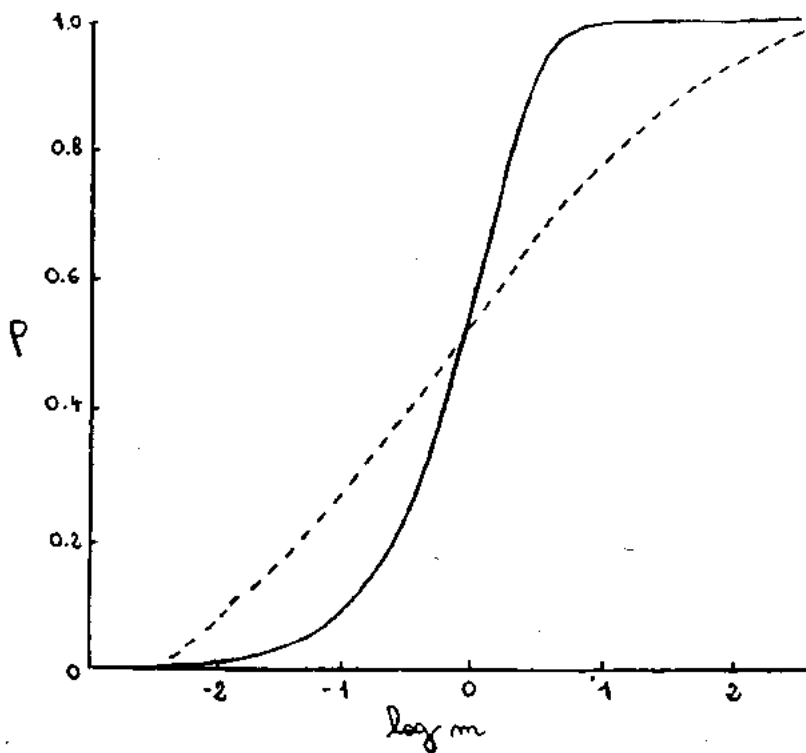


Figure 2 : Courbe dose-réponse ; expression de P en fonction de $\log m$

Il est possible d'estimer m à partir de la proportion de tubes positifs (cf. paragraphe II.8)

Une valeur de p inférieure à 1 se traduit graphiquement par un déplacement de la courbe vers la droite, sa forme restant inchangée.

L'aplatissement d'une courbe dose-réponse obtenue expérimentalement reflète une certaine hétérogénéité du milieu récepteur ou peut s'expliquer par des erreurs au cours de la manipulation (Fig. 2 tracé en pointillé).

DEUXIEME PARTIE

ESTIMATION DU NOMBRE DE MICROORGANISMES
PAR LA METHODE DU NOMBRE LE PLUS PROBABLE (N.P.P.)

Pour estimer le titre d'une suspension par la méthode du nombre le plus probable, des dilutions successives du liquide initial doivent être effectuées. Des milieux de culture sont ensuite ensemencés par ces différentes dilutions (cf. & I - 2 - 2).

En exploitant les résultats obtenus à partir d'une ou plusieurs dilutions successives, il est possible d'évaluer la densité de la suspension initiale par la méthode du maximum de vraisemblance.

II - 1 HYPOTHESES FONDAMENTALES

La validité des calculs développés ci-dessous repose sur deux hypothèses essentielles :

. La présence d'un microorganisme est suffisante pour provoquer une croissance ($p = 1$) ; en d'autres termes, un tube négatif est un tube qui ne contenait aucun microorganisme ;

. Les microorganismes sont distribués au hasard dans la suspension, ce qui signifie que chaque germe a la même probabilité de se trouver dans un inoculum donné.

II - 2 CALCUL DU N.P.P.

II - 2 - 1 La fonction de vraisemblance

Pour un microorganisme donné, la probabilité pour qu'il se trouve dans l'inoculum est donnée par $\frac{v}{V}$; la probabilité pour que ce même germe ne se trouve pas dans l'inoculum est $1 - \frac{v}{V}$,

où V représente le volume en ml de la suspension à titrer,

b le nombre de microorganismes contenus dans cet échantillon,

et v la quantité exprimée en millilitres d'un prélèvement (inoculum) effectué dans la suspension mère.

D'après la première hypothèse, il n'y aura pas de croissance, si et seulement si le prélèvement ne contient aucun germe.

La probabilité pour qu'aucun des b microorganismes ne se trouvent dans l'inoculum est : $\left(1 - \frac{v}{V}\right)^b = p$ (probabilité d'évènements indépendants).

Si $\frac{v}{V}$ est petit $1 - \frac{v}{V}$ est approché par $e^{-\frac{v}{V}}$ d'où $p = \left(1 - \frac{v}{V}\right)^b \approx e^{-\frac{bv}{V}}$

$\frac{b}{V}$ représente la densité, u , de microorganismes par ml ; finalement, la probabilité pour que l'inoculum soit stérile est égale à $p = e^{-uv}$.

Considérons n prélèvements de même volume v .

X étant la variable aléatoire correspondant au nombre d'inoculum stériles, X suit la loi binomiale de paramètres (n, p) .

Et la probabilité pour que s prélèvements parmi les n considérés soient stériles est :

$$P(X = s) = \binom{n}{s} p^s (1 - p)^{n-s} = \frac{n!}{s! (n-s)!} p^s (1 - p)^{n-s}$$

comme $p = e^{-uv}$ $P(X = s) = \frac{n!}{s! (n-s)!} e^{-suv} (1 - e^{-uv})^{n-s}$

Si l'on considère k dilutions successives, la probabilité de trouver respectivement $s_1, s_2, s_3, \dots, s_k$ tubes stériles est donnée par :

$$L(u) = \prod_{i=1}^k \frac{n_i!}{s_i! (n_i - s_i)!} e^{-s_i u v_i} (1 - e^{-u v_i})^{n_i - s_i}$$

Les évènements étant indépendants, $L(u)$ s'obtient en faisant le produit des probabilités de chacun d'eux.

n_i est le nombre de tubes inoculés à la $i^{\text{ième}}$ dilution.

v_i est la quantité de liquide initial que contient un inoculum de la $i^{\text{ième}}$ dilution.

$L(u)$ est une fonction qui à chaque valeur de u associe la probabilité d'obtenir la combinaison $s_1, s_2, s_3, \dots, s_k$.

$L(u)$ s'appelle la fonction de vraisemblance.

La valeur de u qui correspond au maximum de la fonction L , c'est-à-dire la densité qui attribue à la combinaison $s_1, s_2, s_3, \dots, s_k$ la plus grande probabilité est le N.P.P.

Le principe utilisé est la méthode du maximum de vraisemblance. (16)

Afin de simplifier les résultats, nous prendrons le logarithme de $L(u)$.

$$\text{Log } L(u) = K - u \sum_{i=1}^k v_i s_i + \sum_{i=1}^k (n_i - s_i) \text{Log } (1 - e^{-u v_i})$$

(K désigne une constante)

la dérivée de $\text{Log } L$ s'écrit :
$$\frac{d \text{Log } L}{d u} = - \sum_{i=1}^k s_i v_i + \sum_{i=1}^k (n_i - s_i) \frac{v_i e^{-u v_i}}{1 - e^{-u v_i}}$$

en annulant cette dérivée, on trouve la valeur de u la plus probable.

Finalement, le N.P.P. est la valeur de u solution de l'équation :

$$\sum_{i=1}^k s_i v_i = \sum_{i=1}^k \frac{(n_i - s_i) v_i e^{-u v_i}}{1 - e^{-u v_i}}$$

en posant $p_i = n_i - s_i$ (c'est le nombre de résultats positifs)

on obtient :
$$\sum_{i=1}^k (n_i - p_i) v_i = \sum_{i=1}^k \frac{p_i v_i e^{-u v_i}}{1 - e^{-u v_i}}$$

La résolution de cette équation n'est pas simple, aussi faut-il procéder par approximations successives. Un exemple de programme de résolution par calculateur électronique est proposé dans le chapitre II (Deuxième partie).

II - 2 - 2 Interprétation graphique du N.P.P. Etude d'un exemple

Pour le titrage d'une suspension de bactéries *Escherichia coli* par la méthode des dilutions, on a utilisé cinq tubes par dilution et un rapport de dilution égal à 10 ; trois dilutions successives ont donné respectivement 5, 2 et 0 tubes positifs.

La fonction de vraisemblance peut s'explicitier par :

$$k = 3$$

$$n_1 = n_2 = n_3 = 5$$

$$s_1 = 0 \quad s_2 = 3 \quad s_3 = 5$$

$$v_1 = 1 \quad v_2 = 0,1 \quad v_3 = 0,01$$

$$\text{tel que } L(u) = 10 e^{-0,35u} (1 - e^{-u})^5 (1 - e^{-0,1u})^2.$$

Une représentation graphique en est donnée par la figure 3.

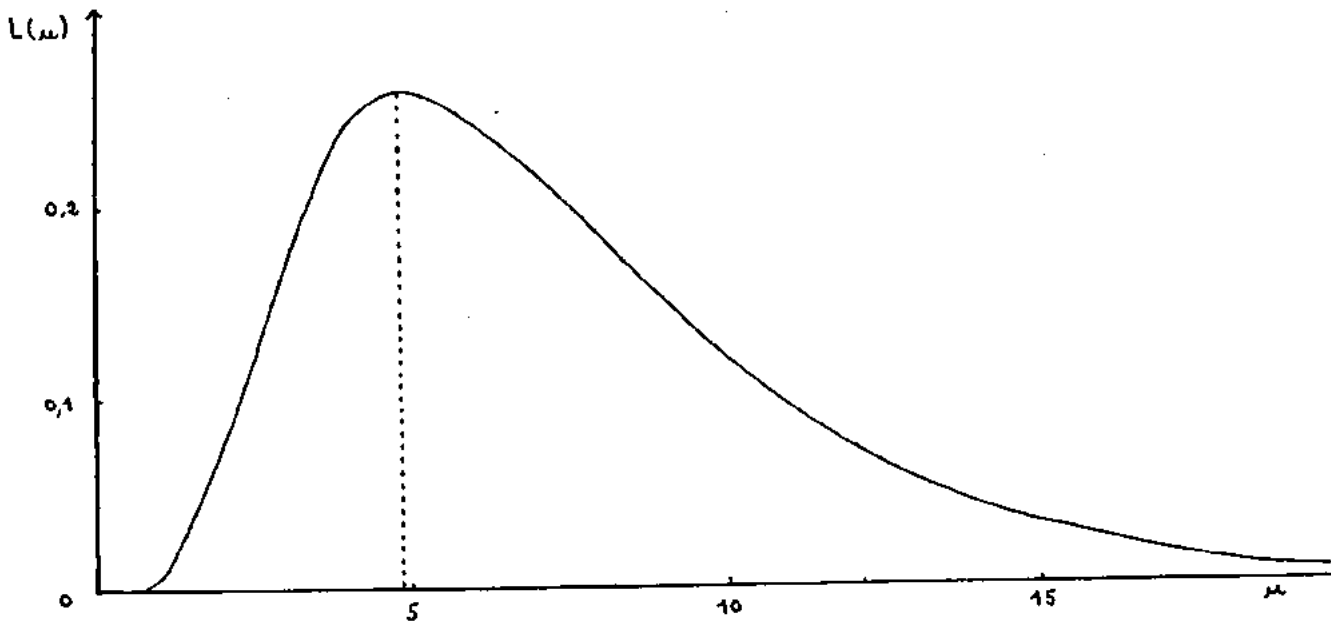


Figure 3 : représentation de la fonction de vraisemblance

Si à chaque valeur de u , on associe la probabilité d'obtenir la combinaison 5 - 2 - 0, cette probabilité est maximale pour la valeur $u = 4,9$; le nombre le plus probable de germes dans le premier inoculum est donc de 4,9.

II - 2 - 3 Intervalle de confiance + interprétation graphique

Le N.P.P. par lui-même n'a pas une très grande signification si on ne dispose d'aucune indication sur sa fiabilité. Pour cette raison, il faut joindre à la valeur trouvée un intervalle dans lequel la densité réelle de la suspension a une certaine probabilité (assez grande, en général 95 % ou 99 %) de se trouver.

Considérons un intervalle I sur l'axe des abscisses, on peut montrer (voir démonstration en annexe 1) que la probabilité pour que la densité réelle u appartienne à I est égale au rapport de l'aire de la surface délimitée par cet intervalle et la courbe sur l'aire totale de la portion de plan délimité par la courbe et l'axe des abscisses.

Un intervalle de confiance à 95 % est obtenu dans le cas où le rapport précédent vaut 0,95.

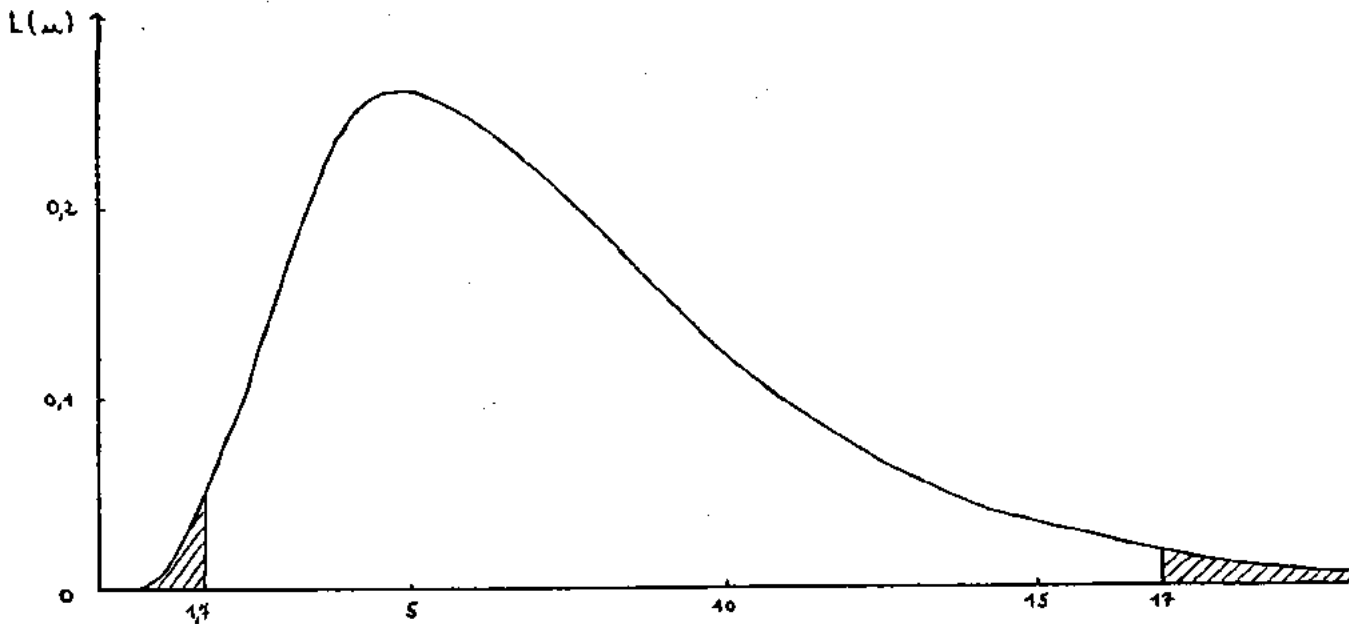


Figure 4 : Intervalle de confiance à 95 %, interprétation graphique

Ainsi, l'aire de la surface hachurée de la figure 4 représente 5 % de l'aire totale. En fait, il y a plusieurs façons de donner un intervalle de confiance à 95 %, car tout dépend en effet de l'importance relative de chacune des deux surfaces hachurées.

II - 3 LES TABLES

Les intervalles de confiance à 95 % ou à 99 % de même que le N.P.P. sont calculés sur ordinateur et présentés sous forme de tables facilement utilisables par les microbiologistes.

Ces calculs ont été faits dans le cas de trois dilutions successives, avec un rapport de dilution égal à 10, le nombre de tubes à chaque dilution étant : 3, 5 ou 10. Le tableau 1 donne un exemple de cas où le nombre de tubes par dilution est de 5. Le N.P.P. est donné pour l'inoculum de la première dilution.

Tableau 1 : N.P.P. et intervalles de confiance à 95 % et 99 % (d'après de MAN) (6)

5x1	5x0,1	5x0,01 (ml)	Catégorie lorsque le nb de test est :					Limite de confiance				
			Résultat	N.P.P./ml	1	2	3	5	10	95 %	99 %	
0	0	0	<0.2	2	2	2	1	1	<0.1	1.0	<0.1	1.3
0	0	1	0.2	1	1	1	1	1	<0.1	1.0	<0.1	1.3
0	1	0	0.2	0	0	0	2	2	<0.1	1.3	<0.1	1.7
0	1	1	0.4	0	2	2	2	1	<0.1	1.3	<0.1	1.7
0	2	0	0.4	1	1	1	1	1	<0.1	1.1	<0.1	1.5
1	0	0	0.2	2	1	1	1	1	0.1	1.5	<0.1	1.9
1	0	1	0.4	1	1	1	1	1	0.1	1.5	<0.1	1.9
1	1	0	0.4	0	2	2	2	1	0.2	1.8	0.1	2.3
1	1	1	0.6	2	1	1	1	1	0.2	1.8	0.1	2.3
1	2	0	0.6	0	0	0	0	2	0.3	2.1	0.2	2.6
1	2	1	0.8	0	0	0	0	2	0.3	2.1	0.2	2.7
1	3	0	0.8	1	1	1	1	1	0.1	1.7	<0.1	2.2
2	0	0	0.4	2	1	1	1	1	0.2	2.0	0.1	2.6
2	0	1	0.7	1	1	1	1	1	0.2	2.1	0.1	2.6
2	1	0	0.7	2	2	1	1	1	0.3	2.4	0.2	3.0
2	1	1	0.9	1	1	1	1	1	0.3	2.5	0.2	3.1
2	2	0	0.9	0	0	2	2	2	0.5	2.9	0.3	3.5
2	2	1	1.2	0	2	2	2	1	0.5	2.9	0.3	3.5
2	3	0	1.2	1	1	1	1	1	0.3	2.4	0.2	3.1
3	0	0	0.8	1	1	1	1	1	0.4	2.9	0.3	3.7
3	0	1	1.1	0	0	0	2	2	0.6	3.4	0.4	4.2
3	0	2	1.3	1	1	1	1	1	0.4	2.9	0.3	3.7
3	1	0	1.1	2	1	1	1	1	0.6	3.5	0.4	4.2
3	1	1	1.4	0	0	0	0	2	0.7	3.9	0.5	4.8
3	1	2	1.7	1	1	1	1	1	0.6	3.5	0.4	4.3
3	2	0	1.4	2	2	2	1	1	0.7	4.0	0.5	4.9
3	2	1	1.7	2	2	1	1	1	0.7	4.1	0.5	5.0
3	3	0	1.7	0	0	2	2	2	1.0	4.6	0.7	5.6
3	3	1	2.1	0	0	2	2	2	0.9	4.7	0.7	5.7
3	4	0	2.1	1	1	1	1	1	0.5	3.8	0.3	4.9
4	0	0	1.3	1	1	1	1	1	0.7	4.5	0.5	5.7
4	0	1	1.7	0	2	2	2	2	0.9	5.3	0.6	6.6
4	0	2	2.1	1	1	1	1	1	0.7	4.6	0.5	5.9
4	1	0	1.7	1	1	1	1	1	0.9	5.5	0.6	6.8
4	1	1	2.1	0	0	2	2	2	1.2	6.3	0.8	7.8
4	1	2	2.6	1	1	1	1	1	0.9	5.6	0.6	7.1
4	2	0	2.2	2	1	1	1	1	1.2	6.5	0.9	8.1
4	2	1	2.6	0	0	0	2	2	1.5	7.4	1.1	9.1
4	2	2	3.2	1	1	1	1	1	1.2	6.7	0.9	8.3
4	3	0	2.7	2	2	1	1	1	1.5	7.7	1.1	9.4
4	3	1	3.3	0	0	0	0	2	1.9	8.6	1.4	10.4
4	3	2	3.9	2	2	1	1	1	1.6	8.0	1.1	9.7
4	4	0	3.4	0	0	2	2	2	1.9	9.0	1.4	10.8
4	4	1	4	0	0	0	0	2	2	9	1	11
4	5	0	4	0	0	0	0	2	0.9	8.6	0.6	11

MPN/g(ml) 5x1 5x0.1 5x0.01 g(ml) Result MPN		Category when number of tests is					Confidence limits					
		1	2	3	5	10	95%		99%			
5	0	2	4	0	2	2	2	1	2	14	1	17
5	1	0	3	1	1	1	1	1	1	12	<1	16
5	1	1	5	1	1	1	1	1	2	15	1	20
5	1	2	6	2	2	1	1	1	3	18	2	23
5	1	3	8	0	0	0	0	2	4	22	2	27
5	2	0	5	1	1	1	1	1	2	17	1	22
5	2	1	7	1	1	1	1	1	3	21	2	27
5	2	2	9	2	2	1	1	1	4	25	2	31
5	2	3	12	0	0	2	2	2	5	29	3	36
5	3	0	8	1	1	1	1	1	3	25	2	32
5	3	1	11	1	1	1	1	1	4	30	3	38
5	3	2	14	1	1	1	1	1	6	36	4	44
5	3	3	17	0	2	2	2	1	8	41	5	51
5	3	4	21	0	0	0	0	2	10	48	7	58
5	4	0	13	1	1	1	1	1	5	39	3	50
5	4	1	17	1	1	1	1	1	7	48	5	61
5	4	2	22	1	1	1	1	1	10	58	6	73
5	4	3	28	2	1	1	1	1	12	69	9	86
5	4	4	35	2	2	2	1	1	16	82	12	101
5	5	0	24	1	1	1	1	1	10	94	6	126
5	5	1	30	1	1	1	1	1	10	130	<10	180
5	5	2	50	1	1	1	1	1	20	200	10	250
5	5	3	90	1	1	1	1	1	30	290	20	380
5	5	4	160	1	1	1	1	1	60	530	40	690
5	5	5	>160									

Catégorie 0 : Combinaisons de tubes inacceptables, ayant, dans des conditions normales, la moindre chance d'être obtenues. Les combinaisons non mentionnées dans la table appartiennent aussi à cette catégorie.

Catégorie 1 : Combinaisons acceptables, ayant, dans des conditions normales, la plus grande chance d'être obtenues. Les combinaisons de la catégorie 1 devraient normalement être obtenues dans 95 % des cas.

Catégorie 2 : Combinaisons qui pourraient être acceptées si les décisions basées sur elles ne sont pas des plus importantes. Elles ont moins de chances d'être obtenues que les combinaisons de la catégorie 1, mais pas de façon aussi peu probable que la catégorie 0. En 99 % des cas, une combinaison appartenant à la catégorie 1 ou 2 devrait être obtenue.

II - 4 FIABILITE D'UN RESULTAT

Tous les triplets possibles de trois nombres entiers compris entre 0 et n ne figurent pas dans la table ; en effet, certaines de ces combinaisons sont très improbables et les résultats sont de ce fait dépourvus d'intérêt. Les combinaisons sont classées en catégories, ce qui donne une indication sur leur fiabilité (Tableau 1).

Pour chaque combinaison possible et chaque N.P.P. trouvé, on calcule à l'aide de la fonction L la probabilité d'apparition de tous les triplets possibles ; ces probabilités sont classées dans l'ordre décroissant ; soient $C_1, C_2, \dots, C_i, \dots, C_t$ ces nombres.

On effectue ensuite la somme de ces nombres qu'on arrête dès qu'elle atteint une valeur P fixée à l'avance. $C_1 + C_2 + \dots + C_i = Q_i$ avec $Q_i = P$

Si $P = 0,95$ les triplets retenus entrent dans la catégorie 1, pour $P = 0,99$ les triplets supplémentaires font partie de la catégorie 2 ; La catégorie 0 comprend tous les autres.

Le titrage étant répété N fois, la probabilité de trouver à chaque fois un résultat compris entre 1 et i est égale à Q_i^N .

Donc, si les seules combinaisons retenues sont celles qui apparaissent dans 95 % des cas, on a : $Q_i^N = 0,95$ ce qui donne, si $N = 5$, $Q_i = 0,99$.

Ceci explique le fait qu'une combinaison puisse changer de catégorie selon le nombre de titrages effectués.

Un autre moyen d'apprécier la conformité d'une combinaison avec la théorie, qui se traduit par la courbe dose-réponse de la figure 2, est le test de MORAN (8).

Ce test, qui ne s'applique que si les dilutions extrêmes donnent approximativement 100 % et 0 % de résultats positifs, permet de mettre en évidence un aplatissement de la courbe dose-réponse.

On calcule la quantité $T = \sum f_i (N - f_i)$ dans laquelle f_i représente le nombre de tubes positifs à chaque dilution et N le nombre total de tubes par dilution.

Lorsque les résultats sont compatibles avec la théorie, on obtient une valeur de T voisine de 0 alors qu'un aplatissement de la courbe dose-réponse se traduit par des valeurs élevées de T.

Le tableau 2 donne l'espérance mathématique de T, notée E(T), ainsi que l'écart-type, noté S.E.(T), en fonction du nombre de tubes inoculés pour chaque dilution et pour différents rapports de dilution, sous l'hypothèse que la théorie est respectée.

Tableau 2 : Valeurs de E(T) et de S.E.(T)

N	E(T)				S.E.(T)			
	2*	4*	$\sqrt{10^*}$	10*	2*	4*	$\sqrt{10^*}$	10*
5	20	10	12.04	6.02	5.69	4.02	4.42	3.12
6	30	15	18.06	9.03	7.63	5.40	5.92	4.19
7	42	21	25.29	12.64	9.75	6.89	7.57	5.35
8	56	28	33.72	16.86	12.02	8.50	9.33	6.60
9	72	36	43.35	21.67	14.46	10.22	11.22	7.93
10	90	45	54.19	27.09	17.03	12.04	13.21	9.34
11	110	55	66.23	33.11	19.74	13.96	15.32	10.83
12	132	66	79.47	39.74	22.58	15.97	17.52	12.39
13	156	78	93.92	46.96	25.55	18.07	19.82	14.02
14	182	91	109.58	54.79	28.63	20.24	22.21	15.71
15	210	105	126.43	63.22	31.83	22.51	24.70	17.74
16	240	120	144.50	72.25	35.14	24.85	27.27	19.28
17	272	136	163.76	81.88	38.56	27.27	29.92	21.16
18	306	153	184.23	92.12	42.07	29.75	32.64	23.08
19	342	171	205.91	102.95	45.70	32.31	35.46	25.08
20	380	190	228.79	114.39	49.41	34.94	38.34	27.11
30	870	435	523.80	261.90	91.53	64.72	71.02	50.22
40	1560	780	939.23	469.61	141.49	100.05	109.79	77.63

N est le nombre de tubes inoculés pour chaque dilution

* désigne le rapport de dilution.

La quantité $M = \frac{T - E(T)}{S.E.(T)}$ est ensuite comparée à la loi normale centrée réduite par un test unilatéral.

Si $M \geq 1,645$ l'hypothèse est rejetée et la probabilité de rejeter à tort une hypothèse vraie (erreur de première espèce) est inférieure à 0,05.

Si $M \geq 2,326$ l'hypothèse de compatibilité avec la théorie est également rejetée et la probabilité de commettre une erreur est inférieure à 0,01.

Dans ce dernier cas, le test est dit très significatif et il est préférable de ne pas exploiter la combinaison obtenue. L'exemple suivant tiré de MEYNELL et MEYNELL (8) permet de l'expliquer concrètement.

"Soit la combinaison : 10 - 9 - 2 - 1 - 0

N = 10 et le rapport de dilution étant 10

$$T = 10(10 - 10) + 9(10 - 9) + 2(10 - 2) + 1(10 - 1) + 0(10 - 0)$$

$$T = 34$$

$$M = \frac{34 - 27,09}{9,34} = 0,74$$

La valeur trouvée étant inférieure à 1,645 la combinaison est compatible avec la théorie et peut par conséquent être retenue."

Cependant, un inconvénient de ce test réside dans le fait que l'ordre des éléments d'une combinaison n'affecte pas la valeur de T ; en effet, la combinaison 10 - 2 - 9 - 1 - 0 donne également T = 34.

De telles combinaisons ne sont évidemment pas compatibles avec la théorie et seront facilement écartées (surtout si le rapport de dilution est élevé).

II - 5-REPNSES A TROIS QUESTIONS ESSENTIELLES

Pour établir le planning de la méthode des dilutions, il faut pouvoir répondre aux trois questions suivantes (9) :

. Quelles sont les volumes les plus grands et les plus petits qu'il faut inoculer afin d'obtenir un résultat exploitable avec une grande probabilité ?

. Quel rapport de dilution faut-il utiliser ?

. Combien de tubes faut-il inoculer à chaque niveau de dilution ?

S'il est relativement facile de répondre à la première question, il faut, avant de pouvoir répondre aux deux autres, faire une étude préliminaire sur l'impact qu'ont le rapport de dilution et le nombre de tubes sur la précision des résultats. La réponse aux deux dernières questions est en effet subordonnée à la précision escomptée.

II - 5 - 1 Volume le plus petit et volume le plus grand à inoculer

L'objectif est ici d'éviter d'obtenir une série contenant des échantillons uniformément stériles ou fertiles, ce qui empêcherait toute exploitation intéressante des résultats.

Désignons respectivement par v_g et v_p le volume le plus grand et le volume le plus petit à inoculer.

Dans le volume le plus grand, le nombre moyen de particules doit être au moins égal à 1 ; en effet, la probabilité pour qu'un tube soit stérile à ce niveau de dilution est : $e^{-1} \approx 0,37$ (cf. I - 2 - 2).

Si le nombre de tubes par dilution est 5, la probabilité pour qu'ils soient tous stériles est : $(e^{-1})^5 \approx 0,01$ (en fait, cet évènement est très improbable).

Il est prudent de choisir v_p tel que le nombre moyen de microorganismes qu'il contient ne dépasse pas 0,5 afin que la probabilité de n'obtenir que des résultats positifs à ce niveau soit faible.

La probabilité d'obtenir un tube positif est : $1 - e^{-0,5} \approx 0,39$,
par conséquent la probabilité pour que cinq tubes sur cinq soient fertiles vaut
 $(1 - e^{-0,5})^5 \approx 0,01$.

En conclusion, la densité u de la suspension à titrer devra satisfaire la double inégalité :

$$\frac{1}{v_g} \ll u \ll \frac{0,5}{v_p}$$

Si u est estimé être compris entre deux valeurs limites u_p et u_g , les volumes v_p et v_g devront vérifier :

$$v_g \gg \frac{1}{u_p} \quad \text{et} \quad v_p \ll \frac{0,5}{u_g}$$

Par exemple, supposons que la densité u soit comprise entre 10 et 500 germes par ml ; $v_g \gg \frac{1}{10}$ et $v_p \ll \frac{0,5}{500}$

Les trois dilutions de rapport 10 : $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$; et $\frac{1}{1000}$

ainsi que les quatre dilutions de rapport 5 : $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{250}$, et $\frac{1}{1250}$
sont adaptées à ce titrage.

L'étude de la fonction L définie au § II - 2 - 1, dont un cas particulier a été représenté à la figure 3, permet de déduire que la courbe de fréquence du N.P.P. est une courbe en cloche biaisée à droite.

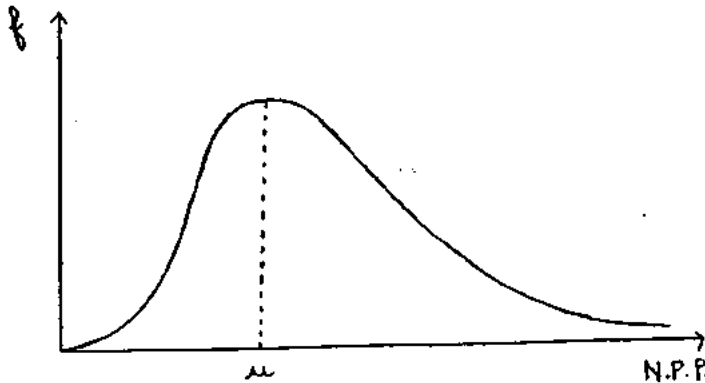


Figure 5 : Courbe de fréquence du N.P.P.

La courbe de fréquence n'étant malheureusement pas une courbe de Gauss, il n'est pas possible pour le moment d'utiliser les propriétés de la distribution normale pour calculer les intervalles de confiance de u et étudier de façon théorique l'influence des divers paramètres (rapport de dilution et nombre de tubes) sur la précision des résultats. Le paragraphe III - donne un moyen de résoudre ce problème.

L'asymétrie de la courbe de fréquence est à l'origine d'un autre phénomène gênant : la surestimation par le N.P.P. de la densité réelle u .

Par exemple, si une suspension, dont la densité réelle est de 100 microorganismes par ml, est titrée par la méthode du N.P.P. (10 tubes par dilution), la moyenne arithmétique d'un très grand nombre de valeurs obtenues par cette méthode sur le même échantillon donnerait 108.

Il faut cependant noter que l'importance du biais diminue lorsque le nombre des tubes utilisés pour chaque dilution augmente, comme le montre le tableau 3. Un calcul permettant l'évaluation du biais en fonction du nombre de tubes est donné en annexe 2.

Tableau 3 : Importance du biais en fonction du nombre de tubes (rapport de dilution 10)

Nombre de tubes utilisés pour chaque dilution	Biais exprimé en %
3	31
5	18
10	8
20	4
96	<1

Le biais tend vers la valeur zéro lorsque le nombre de tubes devient de plus en plus grand. Le N.P.P. est un estimateur asymptotiquement non biaisé de la densité réelle.

II - 5 - 3 Distribution log-normale du N.P.P.

. L'asymétrie de la courbe de fréquence du N.P.P. est atténuée lorsque le nombre de tubes par dilution augmente ; la distribution est très voisine de la loi normale quand ce nombre atteint 100. (9)

Le nombre des tubes utilisés dans les titrages étant généralement faible (3, 5 ou 10), la détermination des intervalles de confiance est faite directement sur ordinateur selon le principe décrit au § II - 2 - 3.

. Un autre moyen de corriger l'asymétrie de la courbe de fréquence consiste à reporter en abscisse le logarithme du N.P.P.

Halverson et Ziegler ont montré que le logarithme du N.P.P. suit pratiquement une loi normale.

Cette approximation est d'autant meilleure que le nombre de tubes par dilution est plus grand. Ils ont montré en outre que l'écart-type de la distribution dépend essentiellement du nombre de tubes et du rapport de dilution et non de la densité de la suspension à titrer.

Dans le cas où une seule dilution est pratiquée, la précision est par contre étroitement liée à la densité de l'échantillon ; ce problème sera étudié ultérieurement. (voir paragraphe II.8.3)

II - 5 - 3 - 1 Expression de l'écart-type

L'écart-type de la distribution du logarithme du N.P.P., dans le cas où le rapport de dilution est 10, est donné par :

$$\sigma_{\log} = \frac{0,5487}{\sqrt{n}}$$

n étant le nombre de tubes à chaque dilution.

Plus généralement, si le rapport de dilution est a,

$$\sigma_{\log} = \frac{0,55 \sqrt{\log a}}{\sqrt{n}}$$

log désigne le logarithme décimal.

II - 5 - 3 - 2 Etude d'un exemple

. L'étude qui suit a pour but de vérifier la normalité de la distribution du logarithme du N.P.P. dans un cas particulier.

Le tableau 4 donne les résultats de 16 titrages d'une eau dont la qualité est supposée constante, par la méthode du N.P.P. (10 tubes par dilution) (d'après Welz -15-)

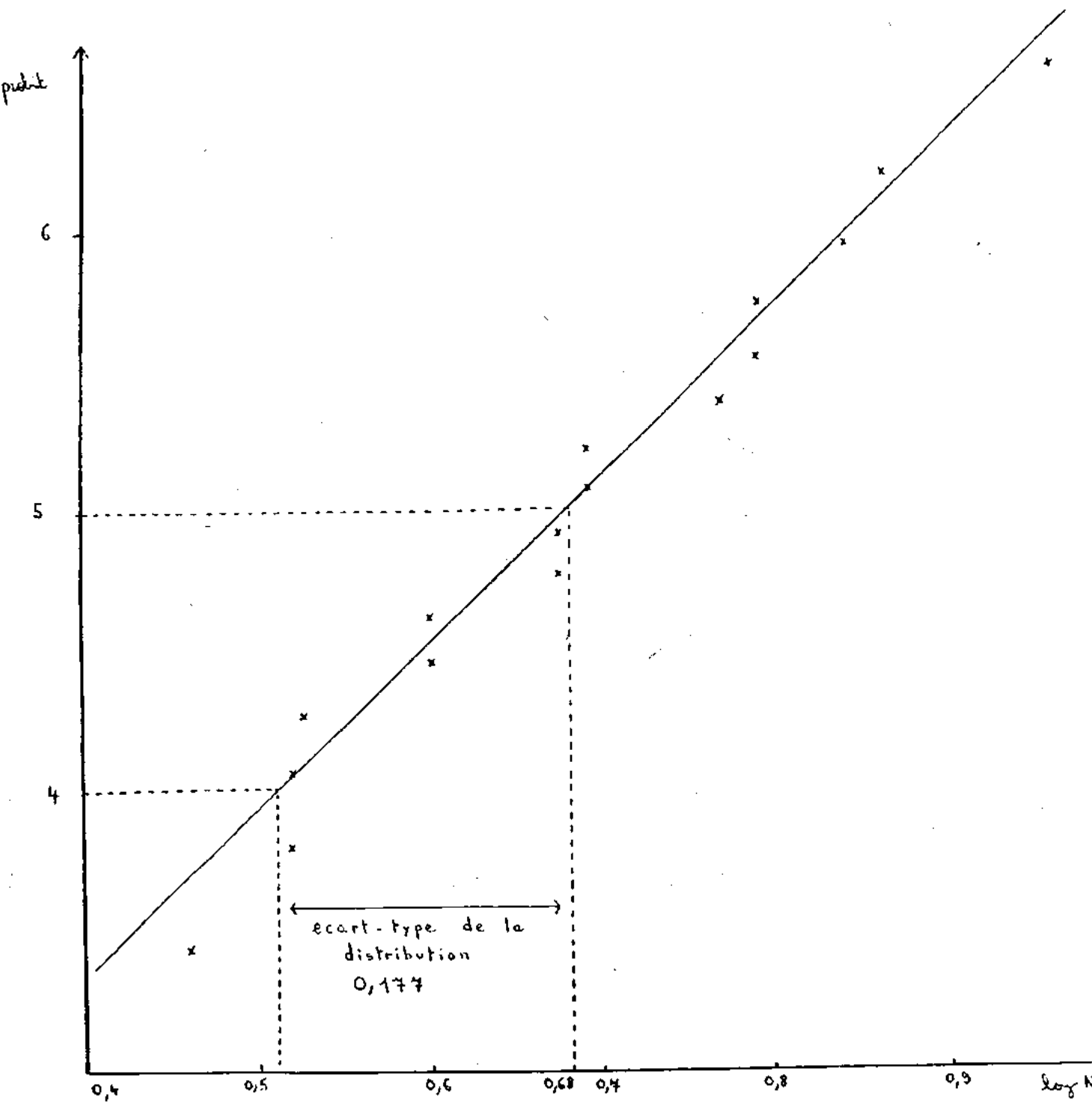
Tableau 4 : Etude de la distribution du N.P.P.

Nombre le plus probable par ml	Logarithme du nombre le plus probable	Fréquence cumulée $\frac{100 \text{ m}}{17}$	Probit.
2,88	0,459	5,88	3,44
3,29	0,517	11,8	3,81
3,29	0,517	17,6	4,07
3,34	0,524	23,5	4,28
3,99	0,601	29,4	4,46
3,99	0,601	35,3	4,62
4,74	0,676	41,2	4,77
4,74	0,676	47,0	4,92
4,93	0,693	52,8	5,07
4,93	0,693	58,8	5,22
5,89	0,770	64,6	5,37
6,22	0,794	70,5	5,53
6,22	0,794	76,5	5,73
7,00	0,845	82,3	5,93
7,42	0,870	88,2	6,19
9,33	0,970	94,1	6,56

La méthode utilisée pour vérifier la normalité de cette distribution est un procédé graphique : la droite de HENRY (Figure 6).

Le travail est facilité par l'utilisation de papier gaussio-logarithmique ; les points obtenus, en portant en abscisses la valeur du N.P.P et en ordonnées la fréquence cumulée correspondante, sont alignés si la distribution est gaussienne. Dans le cas où on ne dispose pas d'échelle gaussienne, il est nécessaire de faire une transformation préalable ; à chaque fréquence cumulée est associé un nombre appelé probit qui est donné par une table.

Figure 6 : Reconnaissance de la distribution gaussienne du N.P.P.



Les points sont sensiblement alignés, et la droite de HENRY est obtenue en passant le plus près possible de ces points mais en donnant le plus d'importance aux points situés vers le centre.

La moyenne du logarithme du N.P.P. est déterminée graphiquement : 0,68, ce qui correspond à une moyenne de 4,82 pour le N.P.P.

L'écart-type de la distribution, déterminé graphiquement par l'inverse du coefficient directeur de la droite est 0,177 ; alors que l'écart-type théorique donné par la formule de Halverson et Ziegler est :

$$\frac{0,5487}{\sqrt{10}} = 0,174.$$

Cet exemple est très cohérent avec le modèle donné par Halverson et Ziegler ; toutefois, une augmentation de l'écart-type, c'est-à-dire une diminution de la pente de la droite, révèle une source de variation autre que celle due à l'échantillonnage (par exemple une variation de la qualité bactériologique de l'eau pendant la prise des échantillons).

II - 5 - 3 - 3 Indépendance de l'écart-type avec la densité

La figure 7 représente la courbe obtenue lors du titrage (rapport de dilution 10 avec 10 tubes par dilution) de quatre échantillons dont les densités réelles sont : 0,15 ; 0,25 ; 0,5 et 1,5 microorganismes par ml.

Afin de rendre les résultats comparables, le rapport de la densité trouvée sur la densité réelle a été reporté en ordonnées.

Les points sont sensiblement situés sur une même droite indépendamment de l'échantillon considéré. La pente de la droite, $\sigma_{\log} = 0,1735$, est par conséquent indépendante de la densité bactérienne.

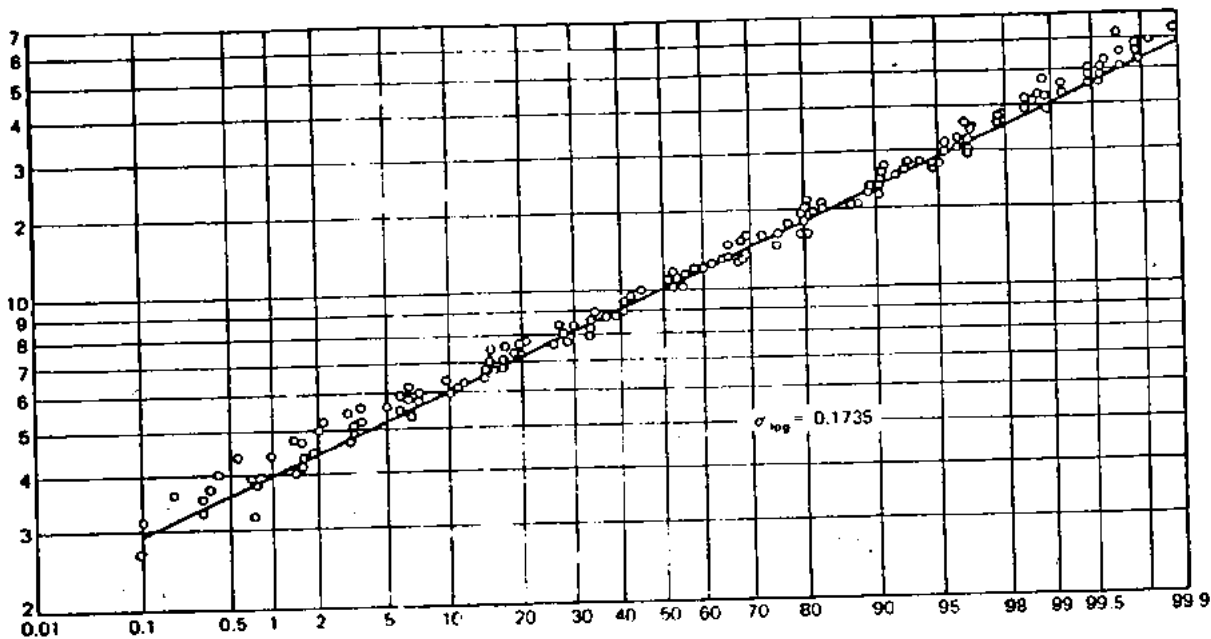


Figure 7

Courbe exprimant la relation entre écart-type et densité

En abscisses : fréquences cumulées (échelle laplacienne)

En ordonnées : rapport de la densité expérimentale sur la densité réelle
(échelle logarithmique)

II - 5 - 3 - 4 Relation entre l'écart-type et le nombre de tubes

Le rapport de dilution étant fixé (par exemple 10), l'écart-type de la distribution ne dépend que de n.

$$\sigma_{\log} = \frac{0,5487}{\sqrt{n}}$$

La figure 8 illustre la diminution de l'écart-type lorsque n augmente ; celle-ci est très rapide quand n est inférieur à 30 mais elle est considérablement ralentie au delà de cette valeur.

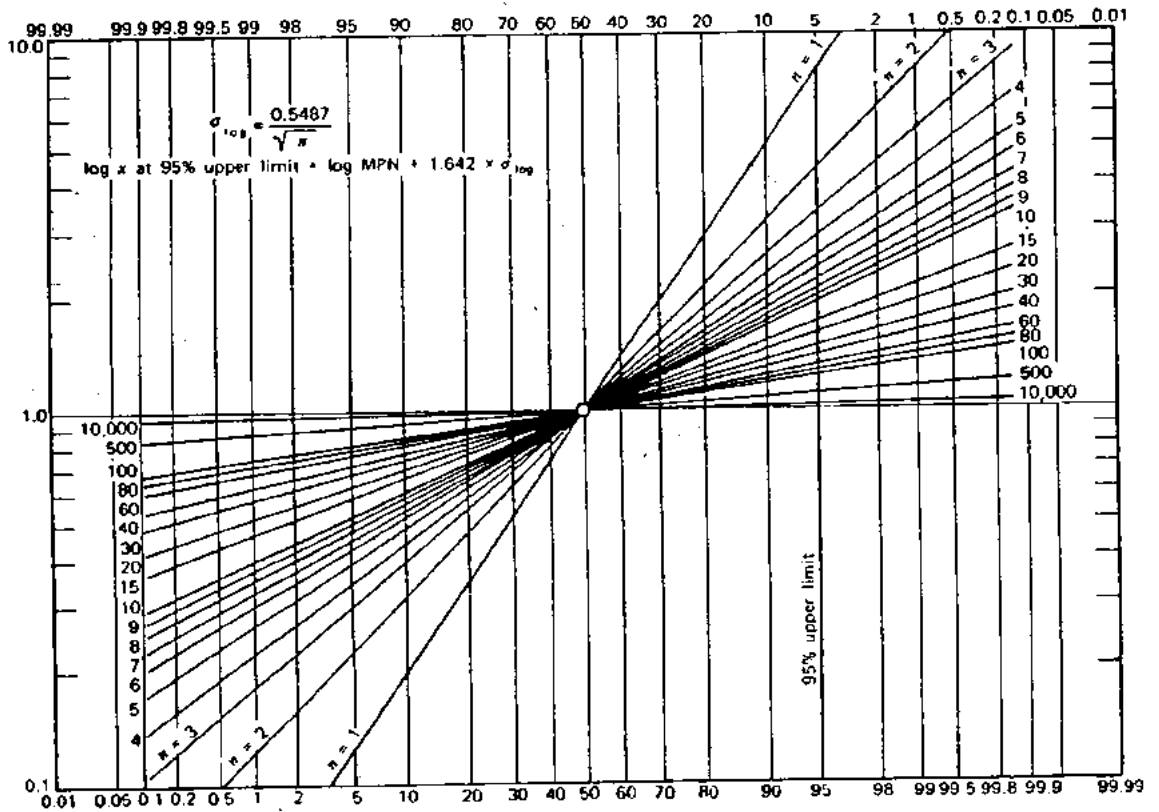


Figure 8

L'écart-type de la distribution du logarithme du N.P.P. est donné par la pente de la droite

II - 5 - 4 Recherche d'un intervalle de confiance

D'après ce qui a été rapporté au chapitre II - 5 - 3, le logarithme du N.P.P. suit la loi normale de moyenne $\log u$ (u est le titre réel de la suspension) et d'écart-type σ_{\log} (qui sera désormais noté σ afin de simplifier l'écriture).

La variable $\frac{\log \text{N.P.P.} - \log u}{\sigma}$ suit par conséquent la loi normale centrée réduite (11).

Un intervalle de confiance à 95 % est obtenu par l'ensemble des valeurs de u vérifiant la double inégalité :

$$- 1,96 < \frac{\log \text{N.P.P.} - \log u}{\sigma} < 1,96$$

(Pour avoir un intervalle de confiance à 99 %, il suffit de remplacer 1,96 par 2,57).

$$\begin{aligned} \text{D'où} \quad \log \text{N.P.P.} - 1,96 \sigma &< \log u < \log \text{N.P.P.} + 1,96 \sigma \\ \log \text{N.P.P.} - \log 10^{1,96\sigma} &< \log u < \log \text{N.P.P.} + \log 10^{1,96\sigma} \\ \log \frac{\text{N.P.P.}}{10^{1,96\sigma}} &< \log u < \log \text{N.P.P.} + \log 10^{1,96\sigma} \end{aligned}$$

$$\text{Finalement} \quad \frac{\text{N.P.P.}}{10^{1,96\sigma}} < u < 10^{1,96\sigma} \text{N.P.P.}$$

Un intervalle de confiance est donc de la forme

$$\left] \frac{\text{N.P.P.}}{c} , c \text{ N.P.P.} \left[\quad \text{en posant} \quad c = 10^{1,96\sigma}$$

Le tableau 5 donne les valeurs de c en fonction du rapport de dilution et du nombre de tubes.

Tableau 5 Valeurs de c en fonction du rapport de dilution et du nombre de tubes

Nombre de tubes par dilution	Rapport de dilution			
	2	4	5	10
1	4,00	7,14	8,32	14,45
2	2,67	4,00	4,47	6,61
3	2,23	3,10	3,39	4,68
4	2,00	2,68	2,88	3,80
5	1,86	2,41	2,58	3,30
6	1,76	2,23	2,38	2,98
7	1,69	2,10	2,23	2,74
8	1,64	2,00	2,21	2,57
9	1,58	1,92	2,02	2,43
10	1,55	1,86	1,95	2,32
96	1,15	1,22	1,24	1,29

Les intervalles de confiance à 95 % donnés par la table 1 sont approximativement de la forme $\left] \frac{N.P.P.}{3,3} ; 3,3 N.P.P. \right[$.

Les différences constatées s'expliquent en partie par le fait que le modèle de Halverson et Ziegler s'applique d'autant mieux que le nombre n de tubes est grand. Ce qui précède a pour le moment un intérêt surtout théorique, car il permettra d'étudier l'importance du rapport de dilution et du nombre de tubes sur la précision de l'estimation.

Lorsque le nombre de tubes par dilution est grand (disons supérieur à 10), les formules précédentes fournissent une très bonne approximation ; dans le cas contraire, il est préférable d'utiliser les valeurs données par les tables de N.P.P.

La précision d'un résultat étant définie par le rapport de l'écart-type sur la densité, exprimé en %, le tableau 5 permet d'établir les résultats suivants lorsque le rapport de dilution est 10.

Avec	5	tubes	par	dilution,	la	précision	est	de	l'ordre	de	60	%
"	10	"	"	"	,	"	"	"	"	"	40	%
"	20	"	"	"	,	"	"	"	"	"	30	%
"	96	"	"	"	,	"	"	"	"	"	14	%
"	200	"	"	"	,	"	"	"	"	"	9	%

(La justification de ces données est rapportée en annexe III).

II - 5 - 5 Conclusion

Le tableau 5 confirme ce qui a déjà été signalé en II - 5 - 4 - 4, c'est-à-dire le gain de précision lorsque n augmente.

Il ressort également du tableau que la précision est meilleure quand le rapport de dilution est petit.

Mais l'utilisation d'un petit rapport de dilution a deux inconvénients : tout d'abord, elle nécessite un plus grand nombre de niveaux de dilution pour couvrir la même plage de densité, ce qui demande l'usage d'un plus grand nombre de tubes si n reste le même ; d'autre part, la pratique d'un plus grand nombre de dilutions augmente les risques d'erreurs lors des manipulations.

D'après COCHRAN (cité par MEYNELL et MEYNELL, 8), pour un nombre total de tubes donné (produit du nombre de dilutions par le nombre de tubes utilisés pour chaque dilution), la précision est très peu affectée par le rapport de dilution, à condition toutefois que celui-ci soit inférieur à 10.

La figure 9 fait apparaître la variation de la précision de l'estimation par le N.P.P. en fonction de la densité de la suspension à titrer.

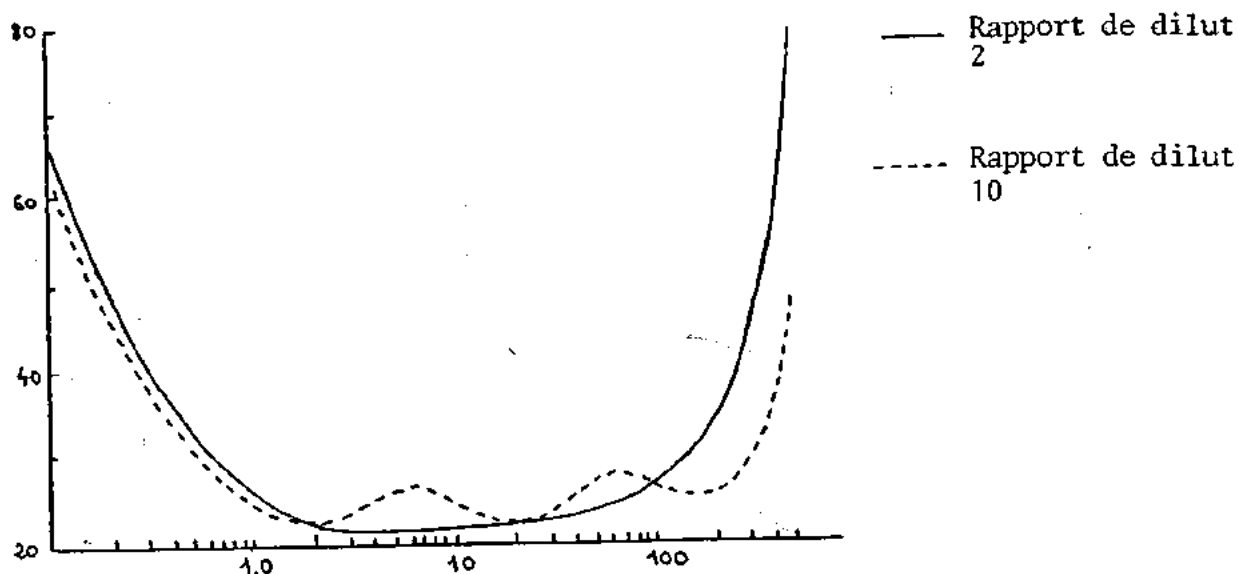


Figure 9

Précision de l'estimation en fonction de la densité de la suspension à titrer

En abscisses : densité réelle de la suspension mère (échelle logarithmique)

En ordonnées : précision exprimée en pourcentage du N.P.P.

Les courbes correspondant aux rapports de dilution 2 (ligne continue) et 10 (ligne en pointillés) ont été représentées.

Dans les deux cas, 72 tubes ont été inoculés : 8 niveaux de dilution, avec 9 tubes par niveau pour le rapport 2 et 3 niveaux de dilution avec 24 tubes par niveau pour le rapport 10.

La précision est très mauvaise pour des densités très faibles ou au contraire très fortes. Dans ces cas extrêmes, les tubes tendent à devenir uniformément négatifs ou positifs et l'estimation par le N.P.P. ne s'applique plus.

D'après FISHER, le maximum d'information, au sens statistique du terme (et par voie de conséquence, la meilleure précision) est atteint pour un nombre moyen de 1,6 microorganismes par inoculum, ce qui correspond à une proportion de 80 % de tubes positifs ($1 - e^{-1,6} \approx 0,8$). La démonstration est proposée en annexe IV.

La valeur optimale de 1,6 germes par inoculum est obtenue avec une probabilité plus grande lorsque le rapport de dilution est faible ; ceci explique les fluctuations observables sur la figure 9 pour la dilution décimale. De même, la courbe associée au rapport de dilution 5 présente aussi des maximums, moins prononcés mais plus nombreux (7).

Bien que le choix d'un faible rapport permette une meilleure précision dans les résultats, la perte de précision enregistrée pour un rapport égal à 10, par exemple, n'est pas très importante. Le choix final dépendra du modèle des tables de N.P.P. disponibles.

II - 6 Etude du cas particulier : n = 96

L'intérêt d'augmenter n et l'existence des plaques formées de 96 cupules nous ont incités à faire des titrages par la méthode du N.P.P. avec n = 96.

L'intérêt de cette méthode est double : tout d'abord, le biais de l'estimateur est négligeable (< 1 %) ; d'autre part, la précision (14 %) est considérablement améliorée. Pour l'obtention d'un intervalle de confiance, l'approximation du § II - 5 - 4 est très bonne.

La borne inférieure et la borne supérieure d'un intervalle de confiance à 95 % s'obtiennent en divisant et en multipliant le N.P.P. par 1,30.

Le N.P.P. est la solution de l'équation donnée au II - 2 - 1 qui devient :

$$(96 - p_1) + 0,1(96 - p_2) + 0,01(96 - p_3) =$$

$$\frac{p_1 e^{-u}}{1 - e^{-u}} + \frac{0,1p_2 e^{-0,1u}}{1 - e^{-0,1u}} + \frac{0,01p_3 e^{-0,01u}}{1 - e^{-0,01u}}$$

dans laquelle p_1 , p_2 , p_3 désignent le nombre de résultats positifs à chacun des trois niveaux.

Un programme de résolution de cette équation est donné en annexe V.

Exemple : Titrage de *Escherichia coli* par la méthode des 96 cupules

A partir d'une suspension d'*Escherichia coli* des dilutions ont été réalisées de 10 en 10 dans l'eau physiologique stérile. Chaque dilution a étéensemencée dans une plaque Microtest II comportant 96 cupules (1 plaque par dilution).

A cet effet, chaque cupule contenant 0,15 ml de bouillon lactosé au bleu de bromothymol a été inoculée par 0,05 ml de dilution.

Après incubation pendant 24 heures à 37°C, le dénombrement des cupules dans lesquelles le milieu a viré au jaune et traduisant la multiplication bactérienne, donne les résultats ci-dessous :

dilution 10^{-6}	:	94	cupules	positives
dilution 10^{-7}	:	49	"	"
dilution 10^{-8}	:	10	"	"

Le titre d'un inoculum à la dilution 10^{-6} est estimé par 6,14 à 10^{-2} près ; c'est la solution de l'équation précédente dans laquelle p_1 , p_2 et p_3 ont été remplacés respectivement par 94, 49 et 10.

Finalement, la densité de la suspension initiale est comprise entre $0,95 \cdot 10^8$ et $1,59 \cdot 10^8$ bactéries par ml avec une probabilité de 0,95, la valeur la plus probable étant $1,23 \cdot 10^8$ bactéries par ml.

II - 7 Interprétation des résultats et quelques applications

II - 7 - 1 Choix du meilleur triplet (8)

Le résultat d'un titrage par la méthode des dilutions ayant donné la combinaison : 10 - 10 - 9 - 2 - 1 - 0 ; quatre triplets : 10 - 10 - 9 ; 10 - 9 - 2 ; 9 - 2 - 1 et 2 - 1 - 0 peuvent être exploités pour le calcul du N.P.P. et la question du choix de l'un de ceux-ci se pose.

- . Une méthode consiste à retenir le triplet dont la valeur statistique est la plus grande ; c'est celui pour lequel le terme intermédiaire se rapproche le plus de 80 % de résultats positifs (voir II - 5 - 5). En l'occurrence, il s'agit de 10 - 9 - 2 ;
- . D'autre part, la moyenne géométrique des logarithmes des N.P.P. obtenus à partir de chaque triplet peut être calculée. Cette moyenne est un estimateur non biaisé de la densité réelle ; mais il faudra préalablement écarter tous les triplets donnant 100 % de réponses positives ou négatives.

L'inconvénient de cette méthode réside dans le fait qu'elle accorde la même importance à chaque triplet alors qu'ils n'ont pas la même valeur statistique. TAYLOR (cité par MEYNELL et MEYNELL (8) préconise, dans le cas où plusieurs dilutions donnent 100 % de tubes positifs, de ne conserver que le niveau le plus dilué, et de ne retenir que le plus concentré parmi ceux dont les résultats sont tous négatifs. S'il ne reste qu'un seul triplet, on en calculera le N.P.P. et s'il en reste plusieurs, la moyenne des logarithmes des N.P.P. calculés doit être effectuée.

Dans l'exemple proposé, la moyenne géométrique des N.P.P. déterminés à partir des triplets : 10 - 9 - 2 ; 9 - 2 - 1 et 2 - 1 - 0 donne 259.

II - 7 - 2 Exploitation des résultats de plusieurs titrages pratiqués sur un même échantillon

Le but de ce paragraphe est de montrer comment il est possible d'évaluer la densité d'une suspension ainsi qu'un intervalle de confiance de cette densité à partir de plusieurs titrages effectués sur le même échantillon.

Le titrage d'une suspension d'*Escherichia coli* par la méthode du N.P.P. a été réalisé quatre fois sur le même échantillon, dans des conditions identiques (5 tubes par dilution, rapport de dilution 10).

Le tableau 6 donne les résultats pour chaque essai.

Essai	Combinaison	N.P.P.	Intervalle de confiance à 95 %
1	5 - 3 - 0	7,9	2,5 - 19
2	5 - 2 - 1	7,0	2,3 - 17
3	5 - 2 - 0	4,9	1,7 - 17
4	5 - 0 - 1	3,1	1,1 - 8,9

Tableau 6 Valeur des N.P.P. et des limites de confiance obtenus à partir de 4 titrages d'une même suspension

(Remarque : l'essai n° 3 correspond à l'exemple traité en II - 2 - 2)

Ces essais menés parallèlement peuvent être considérés comme étant le résultat d'un seul titrage avec 20 tubes par dilution et dont la combinaison est : 20 - 7 - 2.

Le N.P.P. ainsi qu'un intervalle de confiance à 95 % peuvent être déterminés à l'aide de la représentation graphique de la fonction de vraisemblance associée au triplet 20 - 7 - 2 ; c'est ce que montre la figure 10. La courbe tracée présente une asymétrie discrète et un pic beaucoup plus net que celui de la courbe figure 4 ; ceci est l'impact sur le graphique de l'augmentation de n.

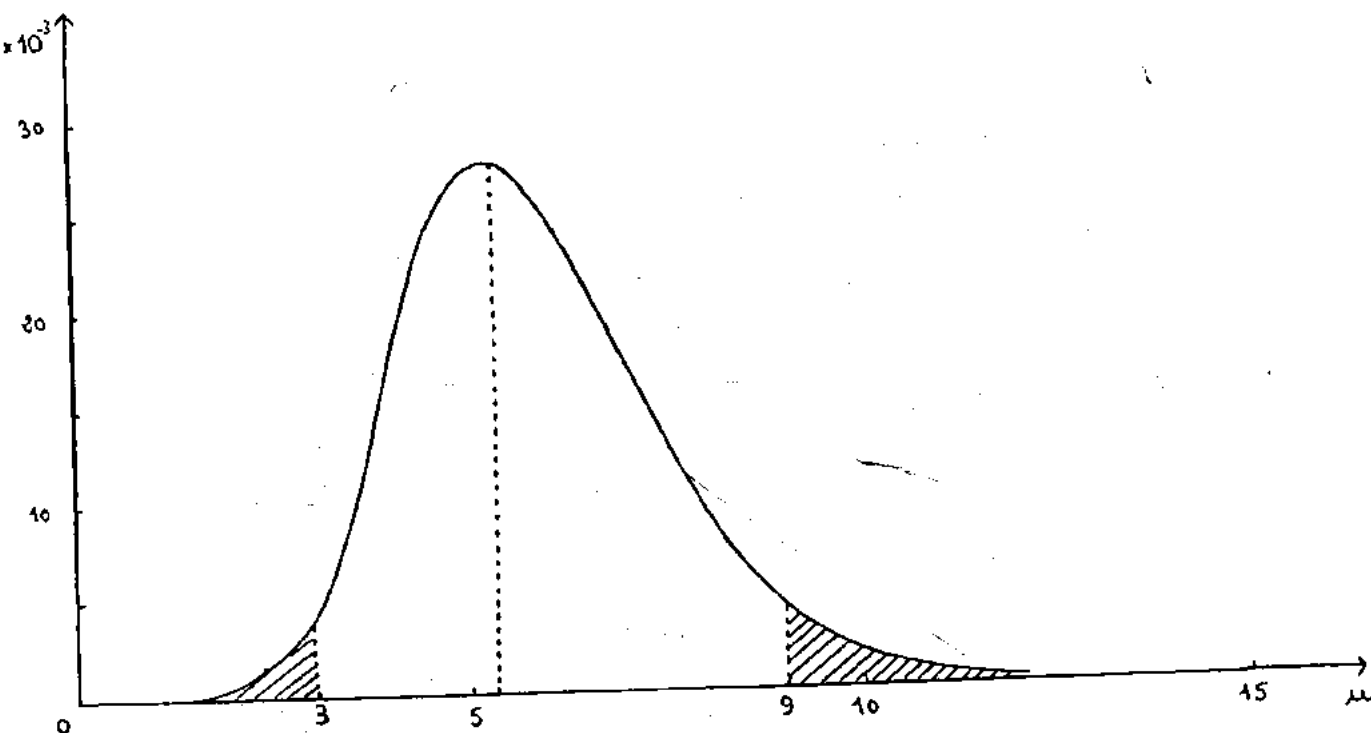


Figure 10

Représentation graphique de la fonction de vraisemblance associée au triplet 20 - 7 - 2.

Le N.P.P. déterminé graphiquement vaut sensiblement 5,3 alors que les bornes d'un intervalle de confiance à 95 % sont approximativement 3 et 9. L'exploitation des résultats des quatre essais simultanément a eu pour effet de réduire de manière appréciable l'amplitude de l'intervalle de confiance.

Il est possible d'aboutir aux mêmes conclusions en utilisant la distribution log-normale du N.P.P., dont la description théorique est rappelée ci-après.

Rappel théorique

Si X_i suit la loi $N(m, \sigma)$ (loi normale de moyenne m et d'écart-type σ)

Alors $\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$ suit la loi $N\left(m, \frac{\sigma}{\sqrt{n}}\right)$

D'après II - 5 - 3, $\log \text{N.P.P.}_i$ suit la loi $N\left(\log u, \frac{0,55}{\sqrt{n}}\right)$

D'après ce qui précède et lorsque le nombre d'essais est r

log N.P.P. suit la loi N $(\log u, \frac{0,55}{\sqrt{nr}})$

Tout se passe comme si un seul titrage avec n x r tubes par dilution avait été effectué.

log N.P.P. = log 5,38 dans l'exemple considéré.

Un intervalle de confiance à 95 % est défini par l'ensemble des valeurs u vérifiant la double inégalité (voir II - 5 - 4)

$$\frac{5,38}{10^{1,96\sigma}} < u < 5,38 \times 10^{1,96\sigma} \quad \text{où } \sigma = \frac{0,55}{\sqrt{20}}$$

Finalement, la densité bactérienne pour le premier inoculum est 5,4 ; les limites de confiance à 95 % étant respectivement 3,1 et 9,4 cette estimation est tout à fait en accord avec les résultats précédemment obtenus par la méthode graphique.

II - 7 - 3 Mise en évidence d'une différence significative entre les densités de deux échantillons

La mise en évidence d'une différence significative entre les densités de deux échantillons repose sur la différence entre deux distributions normales. Un rappel théorique est donné ci-dessous.

Rappel théorique

Si X_1 suit la loi N (m_1, σ_1)
et si X_2 suit la loi N (m_2, σ_2) alors $X_1 - X_2$ suit la loi
N $(m_1 - m_2, \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2})$

u_1 et u_2 étant respectivement la densité des échantillons I et II.
Supposons que r_1 titrages ont été effectués sur I et r_2 sur l'échantillon

$\log \text{N.P.P.}_1$ suit la loi $N(\log u_1, \frac{0,55}{\sqrt{nr_1}})$

et $\log \text{N.P.P.}_2$ suit la loi $N(\log u_2, \frac{0,55}{\sqrt{nr_2}})$

L'hypothèse à vérifier est : $u_1 = u_2$

Sous cette hypothèse $\log \text{N.P.P.}_1 - \log \text{N.P.P.}_2$ suit la loi

$$N(0, 0,55 \sqrt{\frac{1}{nr_1} + \frac{1}{nr_2}})$$

Le test consiste à calculer : $\frac{\log \text{N.P.P.}_1 - \log \text{N.P.P.}_2}{0,55 \sqrt{\frac{1}{nr_1} + \frac{1}{nr_2}}}$ que l'on

examine par rapport à la loi normale centrée réduite $N(0,1)$

La puissance de ce test (c'est-à-dire sa capacité à rejeter les hypothèses fausses) est accrue lorsque n , r_1 et r_2 augmentent.

II - 8 Estimation de la densité à partir d'une dilution unique

La connaissance a priori de l'ordre de grandeur de la densité permet d'estimer la population bactérienne à partir des résultats d'une dilution unique.

La précision, à condition toutefois d'utiliser le niveau de dilution le plus approprié, peut être comparable à celle obtenue avec des dilutions multiples.

Il est aussi intéressant de pouvoir estimer la densité à l'aide d'une seule dilution quand les autres niveaux de dilution donnent des résultats inexploitable (tubes brisés) ou qu'il est préférable d'écarter (croissance anormale dans certains tubes, phénomènes de toxicité, etc...) (9).

II - 8 - 1 Relation entre la loi binomiale et la loi normale

Soit X une variable suivant la loi binomiale de paramètres N et p , $B(N, p)$. Quand N est grand et quand ni p ni $q = 1 - p$ ne sont trop proches de zéro, la loi binomiale peut être approchée par la distribution normale correspondant à la variable centrée réduite

$$\frac{X - Np}{\sqrt{Npq}}$$

L'approximation est très bonne si Np et Nq sont tous les deux supérieurs à 5. (11).

C'est selon ce principe qu'il est possible d'estimer u et de donner un intervalle de confiance ; afin de rendre les formules plus explicites, nous prendrons $N = 96$ et u sera donné avec des limites de confiance à 95 %. Le même raisonnement peut être mené avec N quelconque.

II - 8 - 2 Estimation de u

Soit X la variable aléatoire associée au nombre de tubes négatifs.

u étant la densité moyenne par inoculum, la probabilité pour qu'un tube soit stérile est e^{-u} , la probabilité pour qu'il soit fertile est par conséquent $1 - e^{-u}$.

Ainsi, X suit la loi binomiale de paramètres 96 et e^{-u} : $B(96, e^{-u})$

D'après la remarque faite au début de ce paragraphe,

$$\frac{X - 96 e^{-u}}{\sqrt{96e^{-u} (1 - e^{-u})}} \quad \text{suit la loi normale centrée réduite.}$$

(e^{-u} est estimé par $\frac{X}{96}$ c'est-à-dire le rapport du nombre de tubes stériles sur le nombre total de tubes ; $-\text{Log} \frac{X}{96}$ est donc un estimateur de u . Le résultat est établi en annexe IV).

Un intervalle de confiance à 95 % est défini par l'ensemble des valeurs u vérifiant la double inégalité :

$$- 1,96 < \frac{X - 96e^{-u}}{\sqrt{96e^{-u} (1 - e^{-u})}} < 1,96$$

Soit :

$$\frac{X}{96} - \frac{1,96 \sqrt{96e^{-u} (1 - e^{-u})}}{96} < e^{-u} < \frac{X}{96} + \frac{1,96 \sqrt{96e^{-u} (1 - e^{-u})}}{96}$$

Ce qui donne, en remplaçant dans les membres extrêmes e^{-u} par son estimateur $\frac{X}{96}$,

$$\frac{X}{96} - \frac{1,96}{96} \sqrt{\frac{X (96 - X)}{96}} < e^{-u} < \frac{X}{96} + \frac{1,96}{96} \sqrt{\frac{X (96 - X)}{96}}$$

Les conditions de validité de l'approximation par la loi normale :

$Np \gg 5$ et $Nq \gg 5$ imposent à X d'être compris entre 5 et 91 pour que la méthode puisse être employée.

TROISIEME PARTIE

ESTIMATION DU NOMBRE DE MICROORGANISMES

PAR COMPTAGE DIRECT SUR MILIEU GÉLOSÉ.

Exemple : Prenons $X = 20$

Le nombre le plus probable de microorganismes par inoculum est

$$- \text{Log} \frac{20}{96} = 1,57$$

$$0,13 < e^{-u} < 0,29$$

$$\text{d'où } - \text{Log} 0,29 < u < - \text{Log} 0,13$$

Les limites de confiance à 95 % sont : 1,24 et 2,04.

II - 8 - 3 Relation entre la précision et la densité

La précision de l'estimation est liée à la densité par la relation :

$$\frac{\sigma}{u} = \sqrt{\frac{e^u - 1}{96u^2}} \quad (\text{voir annexe IV})$$

La courbe de la figure 11 exprime la précision en fonction du nombre de tubes positifs.

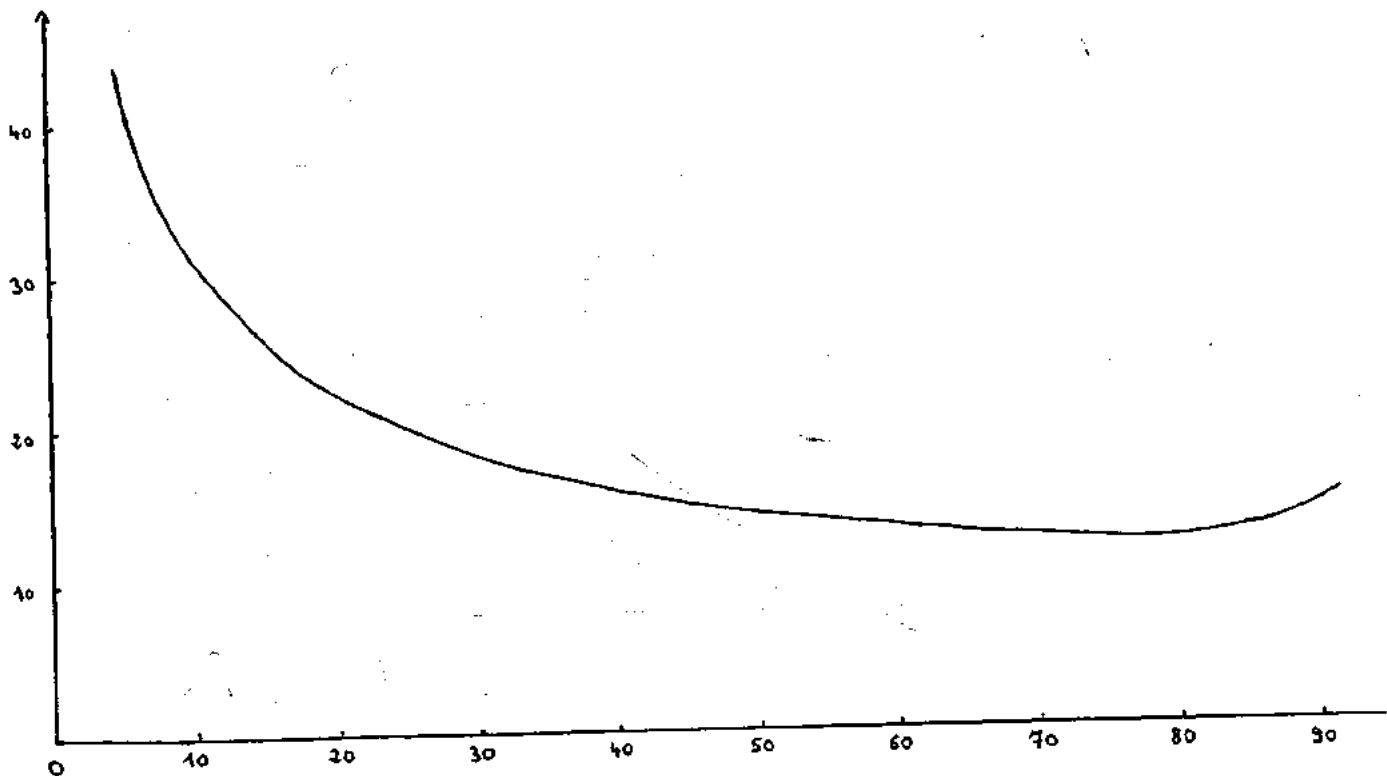


Figure 11

Courbe exprimant la relation entre la précision d'un titrage et le nombre de tubes positifs.

En abscisses : nombre de tubes positifs,
 En ordonnées : la précision exprimée en %.

La précision ne varie pas beaucoup lorsque le nombre de tubes positifs dépasse 30 ; elle se situe alors aux environs de 14 %.

Le graphique montre bien que les meilleurs résultats s'obtiennent lorsqu'il y a une majorité de tubes positifs.

Deux zones sont inintéressantes :

D'une part, en deçà de 5 tubes positifs, puisque la borne inférieure de l'intervalle de confiance est 0 ; et d'autre part, au-delà de 91 tubes positifs, car l'intervalle de confiance n'est plus borné.

II - 9 Conclusion

La précision obtenue en faisant une dilution unique, bien que liée à la densité, est très comparable (à condition cependant qu'il y ait une majorité de tubes positifs) avec celle qu'on a en exploitant trois niveaux de dilution.

Dans cette deuxième partie, il apparaît clairement que le choix de l'une ou l'autre des deux méthodes dépend de la connaissance a priori de la densité bactérienne. La dilution unique peut par exemple s'appliquer lors du titrage routinier d'une eau dont la qualité bactériologique varie peu.

Notons que l'intervalle dans lequel la densité de l'inoculum doit se trouver pour que l'estimation, avec une seule dilution comprenant 96 tubes, soit possible par la méthode décrite au § II - 8 - avec une probabilité de 0,95 (c'est la probabilité pour que le nombre de tubes positifs soit compris entre 5 et 91) est : 0,1 - 2,4.

Si la dilution de l'échantillon à analyser est nécessaire, le problème se résume à trouver le niveau de dilution tel que la densité en microorganismes par inoculum se trouve comprise entre ces deux valeurs.

La méthode du comptage direct consiste à ensemercer des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif puis à recenser les colonies formées après incubation. Le nombre de ces colonies étant proportionnel au nombre de microorganismes inoculés (voir § I - 2 - 1), il permettra d'estimer la densité de l'inoculum.

Par souci de simplification, le coefficient de proportionnalité p sera supposé égal à l'unité.

L'hypothèse fondamentale sur laquelle repose tout le calcul est que le nombre de germes contenus dans un inoculum suit une loi de Poisson. Les conditions de validité de cette hypothèse ont été données en I - 1.

III - 1 Estimation du titre d'une suspension en exploitant les résultats lus sur une seule boîte

Soient u le nombre moyen de germes contenus dans un inoculum au niveau de dilution considéré et X le nombre de colonies recensées.

X suit la loi de Poisson de paramètre u .

Quel que soit l'entier k supérieur ou égal à 0,

$$P(X = k) = e^{-u} \frac{u^k}{k!}$$

L'espérance mathématique de X étant égale à u , X constitue un estimateur non biaisé de la densité bactérienne u .

Recherche d'un intervalle de confiance

Plusieurs cas doivent être envisagés.

$$X \gg 100$$

X suit la loi normale de moyenne μ et d'écart-type $\sqrt{\mu}$;
autrement dit, la variable $\frac{X - \mu}{\sqrt{\mu}}$ suit la loi normale centrée réduite.

Un intervalle de confiance à 95 % est défini par l'ensemble des valeurs μ vérifiant la double inégalité

$$-1,96 < \frac{X - \mu}{\sqrt{\mu}} < 1,96$$

ce qui donne, en remplaçant l'écart-type $\sqrt{\mu}$ par son estimation :

$$X - 1,96 \sqrt{X} < \mu < X + 1,96 \sqrt{X}$$

Exemple

Un comptage sur boîte a totalisé 150 colonies ; les limites de confiance à 95 % de la densité bactérienne dans l'inoculum sont :

$$\begin{aligned} 150 - 1,96 \sqrt{150} &\approx 126 \\ \text{et } 150 + 1,96 \sqrt{150} &\approx 174 \end{aligned}$$

Il y a une probabilité de 95 % pour que la densité de l'inoculum soit comprise entre 126 et 174 et sa meilleure estimation est 150.

$$15 \leq X \leq 100$$

Dans ce cas, l'approximation par la loi normale n'est plus très satisfaisante.

La limite inférieure d'un intervalle de confiance à 95 % est donnée par :

$$\frac{1}{4} (\sqrt{4X - 1} - 1,96)^2 \quad \text{et la limite supérieure par :}$$

$$\frac{1}{4} (\sqrt{4X + 3} + 1,96)^2 \quad (\text{d'après la référence 1}).$$

Remarque

Des intervalles de confiance à 99 % sont obtenus en remplaçant dans toutes les relations 1,96 par 2,57.

Le cas $X < 15$ est traité dans l'ouvrage précité (1).

Notons pour terminer qu'il existe des tables donnant les intervalles de confiance correspondant à chaque valeur de X .

III - 2 Précision de l'estimation

L'écart-type de la distribution de Poisson de moyenne u valant \sqrt{u} , la précision de l'estimation s'exprime par le rapport

$$\frac{\sqrt{u}}{u} = \frac{1}{\sqrt{u}} ; \quad \text{elle est de ce fait inhérente au}$$

nombre de colonies recensées.

Il est clair que la précision s'améliore lorsque le nombre de colonies est grand, mais comme dans le cas du N.P.P., le gain de précision est de plus en plus difficile à acquérir ; il est minime au delà de 200 colonies (figure 12).

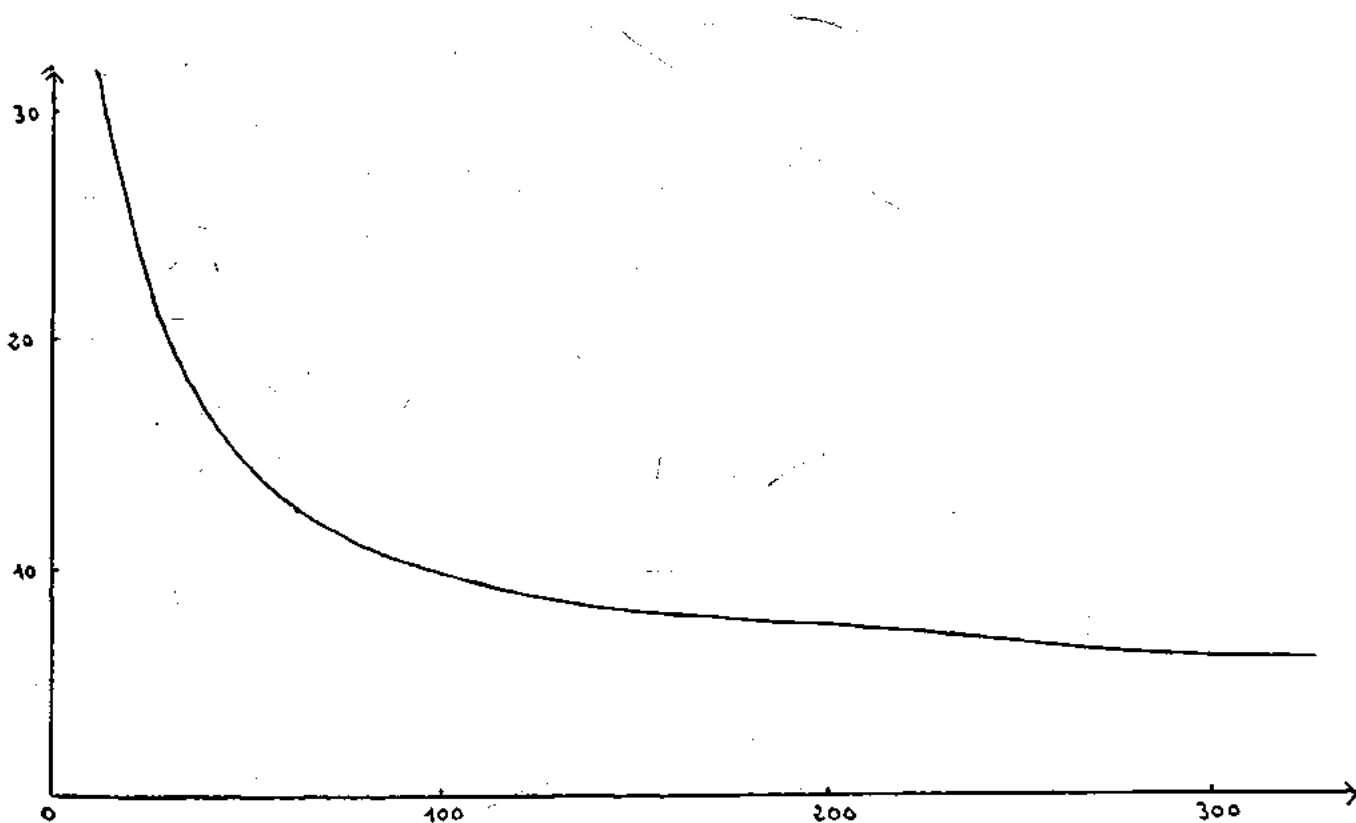


Figure 12

Relation entre le nombre de colonies et la précision de l'estimation

En abscisses : le nombre de colonies,
En ordonnées : la précision exprimée en %.

L'ensemencement de plusieurs boîtes à un même niveau de dilution est possible afin d'augmenter le nombre des colonies tout en évitant des phénomènes gênants qui pourraient se manifester sur une surface réduite ; en particulier les effets d'antagonisme ainsi que la confluence des colonies.

Si k boîtes sontensemencées par un même volume v d'inoculum, le nombre total X des colonies présentes sur les boîtes est la somme $X_1 + X_2 + \dots + X_k$ de k variables indépendantes suivant chacune la loi de Poisson de paramètre u.

X suit une loi de Poisson de paramètre k u. Un intervalle de confiance est alors déterminé par des tables ou par le calcul fait en III - 1.

Cette estimation se rapporte à un volume valant k v. En fait, tout se passe comme si un seul milieu avait étéensemencé par un inoculum de volume k v.

III - 3 Estimation de u à partir de plusieurs boîtes correspondant à des dilutions successives.

L'estimation de la densité bactérienne peut se faire à partir du nombre total de colonies apparues sur plusieurs boîtes correspondant à des dilutions successives. Ce procédé est intéressant uniquement pour un petit rapport de dilution (inférieur ou égal à 2).

La densité u d'un inoculum à la dilution la moins élevée est estimée par $\frac{X}{A}$ et les limites d'un intervalle de confiance à 95 %

sont données par : $\frac{X}{A} + \frac{1,92 - 1,96 \sqrt{X}}{A}$ pour la limite inférieure et

$\frac{X}{A} + \frac{1,92 + 1,96 \sqrt{X}}{A}$ pour la limite supérieure,

X étant le nombre total de colonies,

A étant un coefficient qui dépend du rapport de dilution et du nombre de boîtes considérées.

Ainsi, pour un rapport de dilution égal à 2, A vaut 1,75 lorsque 3 boîtes successives sont lues et A prend la valeur 1,875 si quatre boîtes successives sont prises en considération.

Le calcul permettant d'établir ces résultats est donné en annexe VI.

Exemple

Le tableau 7 donne les résultats d'un essai de numération bactérienne réalisé avec un rapport de dilution égal à 2 ; chaque inoculum a un volume de 0,1 ml.

Tableau 7

DILUTIONS	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$
Nombre de colonies	195	102	48	23	13	7	3	1

Le nombre total des colonies apparues sur les quatre premières boîtes est :

$$X = 195 + 102 + 48 + 23 = 368$$

Le nombre de bactéries dans le premier inoculum est estimé par : $\frac{X}{A} \simeq 196,3$

borne inférieure d'un intervalle de confiance à 95 % : 177,2
borne supérieure d'un intervalle de confiance à 95 % : 217,3

Conclusion

La concentration de l'échantillon est comprise entre 3 540 et 4 350, avec une probabilité de 0,95 ; sa meilleure estimation étant 3 930 germes par ml.

En appliquant la méthode du § III - 1 et en tenant compte de la première boîte seulement, la densité est estimée à 3 920, avec pour intervalle de confiance : 3 350 - 4 450.

Cette estimation est moins bonne que la précédente.

L'augmentation de l'information recueillie par la lecture de plus d'une boîte se traduit par un gain de précision appréciable mais il est inutile de prendre plus de quatre boîtes car l'amélioration du résultat devient ensuite négligeable.

III - 4 Etude comparative de la précision obtenue pour plusieurs méthodes

u étant la densité pour un inoculum à une dilution donnée, la précision de l'estimation par la lecture d'une seule boîte est égale

$$\text{à } \frac{1}{\sqrt{u}}$$

Si deux boîtes sontensemencées au même niveau de dilution, la précision devient $\frac{1}{\sqrt{2u}}$ (voir III - 2)

Enfin, la précision de l'estimation obtenue par l'utilisation de quatre boîtes correspondant à des dilutions successives de rapport 2 s'exprime par

$$\frac{1}{\sqrt{1,875u}} \quad (\text{voir annexe VI})$$

La figure 13 donne la précision en fonction de u dans les trois cas considérés.

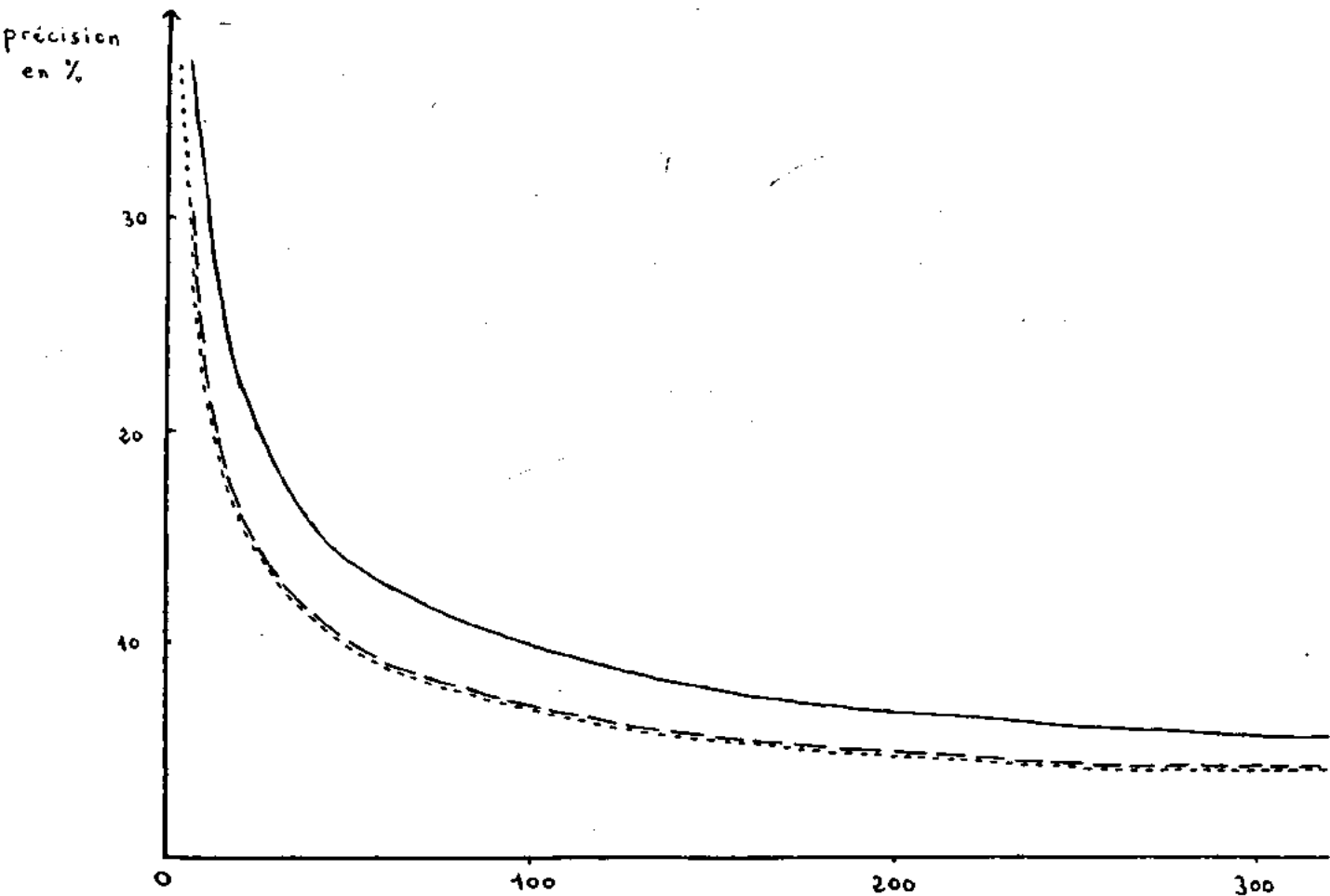


Figure 13

Précision de l'estimation en fonction de u pour trois cas diff

- estimation à partir d'une seule boîte
- estimation à partir de deux boîtes au même niveau de dilution
- - - utilisation de quatre boîtes successives (rapport de dilution

La précision est pratiquement équivalente dans les deux derniers cas.

La méthode exposée en III - 3 peut s'appliquer pour des rapports de dilution inférieurs à 2. A titre d'exemple, pour un rapport de dilution égal à 1,5 le coefficient A prend les valeurs 2,6 et 2,74 si respectivement 4 et 5 boîtes successives sont prises en considération.

La précision est alors comparable à celle obtenue pour trois boîtesensemencées au même niveau de dilution.

Ceprocédé permet théoriquement d'améliorer indéfiniment la qualité de l'estimation au gré de l'opérateur. Il faut cependant émettre quelques réserves ; le gain de précision est de plus en plus difficile à acquérir et de ce fait, à partir d'un certain niveau, il n'est plus justifié par les moyens mis en oeuvre ; d'autre part, il a été fait abstraction, dans ce qui précède, de toutes les sources de variation autres que celles dues à l'échantillonnage (par exemple, les erreurs dans le comptage des colonies, dans les prélèvements de liquide, etc...).

Or, l'utilisation d'un faible rapport de dilution présente l'inconvénient de favoriser ce genre d'erreurs.

Exemple

Essais de numération bactérienne sur une eau de rivière (Moselle) avec des dilutions au $\frac{1}{10}$ (tableau 8) et au $\frac{1}{2}$ (tableau 9).

DILUTIONS		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Nombre de colonies	Boîte 1	illisible (confluence des colonies)	7	0
	Boîte 2	95	8	1

Tableau 8 Résultats pour les dilutions décimales (deux boîtes ont été ensemencées à chaque niveau par un inoculum de 0,1 ml).

DILUTIONS	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1 024	1/2 048
Nombre de Colonies	309	137	71	27	13	4	2

Tableau 9 Résultats pour des dilutions successives de rapport 2 (une boîte a été inoculée à chaque niveau par un inoculum de 0,1 ml).

Pour le premier essai, la meilleure estimation est obtenue par la dilution 10^{-2} ; u est estimé par 95 000 et se trouve compris entre 77 000 et 116 000 avec une probabilité de 95 %.

Si la dilution 10^{-3} est utilisée, alors la densité est estimée par 75 000 avec des limites de confiance à 95 % valant : 40 000 et 122 000.

Ce résultat moins précis que le précédent s'explique par le nombre peu important de colonies dénombrées.

Pour le deuxième essai, l'estimation de la densité de la suspension à partir des nombres 309 - 137 - 71 - 27 donne : 93 000 bactéries ; les limites de confiance étant 85 000 et 101 000 microorganismes par ml. L'amplitude de l'intervalle de confiance est nettement plus petite que pour les deux cas précédents.

Cet exemple de numération bactérienne sur une même eau par deux méthodes différentes fait nettement ressortir l'importance du rapport de dilution. En effet, le risque, lorsque le rapport de dilution est élevé, est de "sauter" les niveaux intéressants et d'être amené à interpréter les résultats des boîtes ne contenant qu'un faible nombre de colonies ; ceci est beaucoup plus improbable avec un petit rapport de dilution.

Néanmoins, pour couvrir la même plage de densité, la deuxième méthode nécessite un nombre plus important de boîtes, celui-ci étant multiplié par un facteur d'environ 1,6.

Cette partie présente deux techniques de dosage couramment utilisées en virologie : la méthode de FISHER et la dose 50 %.

IV - 1 La méthode de FISHER

Cette méthode a été particulièrement bien décrite dans le travail de WYSHAK et DETRE (16).

Des milieux récepteurs appropriés sont inoculés par des dilutions successives de la suspension bactérienne ou virale à titrer.

Une estimation du nombre de microorganismes u présents dans un inoculum à la plus forte concentration est donnée par la solution de l'équation :

$$\frac{T}{n} = e^{-u} + e^{-\frac{u}{a}} + e^{-\frac{u}{a^2}} + \dots + e^{-\frac{u}{a^{k-1}}}$$

où a est le rapport de dilution, k le nombre de niveaux de dilution, n le nombre de tubes à chaque niveau et T le nombre total de résultats négatifs (voir annexe VII).

L'estimation qui est ici basée uniquement sur le nombre total de tubes négatifs en omettant de noter les niveaux peut paraître de prime abord beaucoup moins intéressante que le N.P.P. car une partie de l'information est perdue. FISHER (3) a cependant montré que 87,7 % de l'information est contenue dans le seul nombre T .

Les combinaisons possibles devenant trop nombreuses au delà de trois niveaux, les tables de N.P.P. ont été établies pour des triplets ;

QUATRIÈME PARTIE

AUTRES MÉTHODES DE TITRAGE

la simplification de FISHER permet par contre d'obtenir assez facilement une estimation même pour un grand nombre de niveaux de dilution.

Il faut toutefois noter que le fait d'augmenter indéfiniment le nombre des dilutions n'améliore pas toujours la qualité de l'estimation ; les niveaux extrêmes, c'est-à-dire ceux pour lesquels tous les tubes sont négatifs ou positifs, n'apportent que très peu d'information. En effet, à partir d'un certain rang, tous les tubes sont stériles et de ce fait, $\frac{T}{n}$ augmente d'une unité pour chaque dilution supplémentaire et il en est de même pour

$$\sum_{i=0}^{k-1} e^{-\frac{u}{a^i}}$$

car les derniers termes de la série sont alors très voisins de 1.

Il est également inutile de considérer des niveaux correspondant à des concentrations trop fortes car $\frac{T}{n}$ ne varie pas et les premiers termes de la série sont pratiquement nuls.

La solution de l'équation de FISHER ne pouvant pas s'exprimer explicitement en fonction des autres paramètres, il est nécessaire de l'approcher par un procédé itératif comme cela a été fait en annexe V.

Des tables donnent une estimation de u pour des valeurs de $\frac{T}{n}$ comprises entre 0,4 et 5, d'après le rapport de dilution et le nombre de niveaux considérés.

Tableau 10

Estimation de u d'après le nombre de dilutions

T/n'	No. of Levels					
	6	8	10	12	14	20
0.4	38.4	153.7	614.0	2,458.4	9,833.7	629,359.2
0.5	33.0	132.0	528.1	2,112.4	8,449.5	540,765.0
0.6	28.8	115.2	460.8	1,843.1	7,372.2	471,821.9
0.7	25.4	101.6	406.5	1,625.8	6,503.4	416,217.0
0.8	22.6	99.4	361.5	1,446.2	5,784.7	370,221.0
0.9	20.2	80.9	323.7	1,295.7	5,178.9	331,449.9
1.0	18.2	72.8	291.3	1,165.2	4,660.8	298,289.7
1.1	16.5	65.8	263.3	1,053.1	4,212.5	269,598.5
1.2	14.9	59.7	238.8	955.2	3,820.9	244,539.4
1.3	13.6	54.3	217.3	869.1	3,476.3	222,481.4
1.4	12.4	49.5	198.2	792.7	3,170.9	202,937.8
1.5	11.3	45.3	181.2	724.7	2,898.8	185,525.8
1.6	10.4	41.5	166.0	663.8	2,655.3	169,939.0
1.7	9.5	38.1	152.3	609.1	2,436.4	155,928.6
1.8	8.7	35.0	139.3	559.7	2,238.9	143,290.0
1.9	8.0	32.2	126.8	515.0	2,060.2	131,852.8
2.0	7.4	29.7	118.0	474.5	1,898.0	121,474.0
2.1	6.8	27.4	109.4	437.6	1,750.9	112,032.3
2.2	6.3	25.3	101.0	404.0	1,616.0	103,424.2
2.3	5.8	23.3	93.3	373.3	1,493.1	95,560.5
2.4	5.4	21.6	86.3	345.2	1,380.7	88,364.1
2.5	5.0	20.0	79.9	319.4	1,277.6	81,768.0
2.6	4.6	18.5	73.9	295.8	1,183.0	75,713.3
2.7	4.3	17.1	68.5	274.1	1,096.1	70,148.4
2.8	4.0	15.9	63.5	254.0	1,016.0	65,028.6
2.9	3.7	14.7	58.9	235.9	942.3	60,310.3
3.0	3.4	13.7	54.6	218.6	874.4	55,960.5
3.1	3.2	12.7	50.7	202.9	811.6	51,945.8
3.2	2.9	11.8	47.1	188.4	753.7	48,237.5
3.3	2.7	10.9	43.8	175.0	700.1	44,809.6
3.4	2.5	10.2	40.7	162.6	650.6	41,638.6
3.5	2.3	9.4	37.8	151.2	604.7	38,703.4
3.6	2.2	8.8	35.1	140.6	562.3	35,985.1
3.7	2.0	8.2	32.7	130.7	522.9	33,466.1
3.8	1.9	7.6	30.4	121.6	486.4	31,130.6
3.9	1.7	7.1	28.3	113.1	452.6	28,964.4
4.0	1.6	6.6	26.3	105.3	421.2	26,954.3
4.5	1.0	4.6	18.4	73.7	294.7	18,859.6
5.0	0.6	3.2	12.9	51.7	206.8	13,238.0

T/n'	No. of Levels			
	4	6	8	10
0.4	916.6	91,655.2	9,165,522.3	916,552,231
0.5	695.1	69,506.5	6,950,650.6	695,065,054
0.6	520.0	52,006.7	5,200,571.4	520,057,142
0.7	386.9	38,694.3	3,869,430.8	386,943,083
0.8	292.5	29,254.7	2,925,467.3	292,546,730
0.9	227.1	22,712.7	2,271,273.5	227,127,353
1.0	180.2	18,022.9	1,802,269.0	180,226,905
1.1	144.9	14,467.3	1,449,733.3	144,874,330
1.2	117.0	11,639.0	1,169,901.0	116,990,037
1.3	94.2	9,420.6	942,060.6	94,206,057
1.4	75.1	7,511.6	751,162.7	75,116,265
1.5	59.0	5,896.6	589,665.0	58,966,502
1.6	45.6	4,556.4	455,640.4	45,564,531
1.7	35.0	3,504.4	350,445.3	35,044,531
1.8	27.2	2,725.9	272,590.9	27,259,068
1.9	21.6	2,158.5	215,850.3	21,585,035
2.0	17.3	1,734.7	173,409.3	17,346,900
2.1	14.0	1,406.0	140,599.3	14,059,934
2.2	11.4	1,141.8	114,179.8	11,417,980
2.3	9.2	923.1	92,313.5	9,231,349
2.4	7.4	735.3	73,833.6	7,383,362
2.5	5.8	581.1	58,114.2	5,811,422
2.6	4.5	450.3	45,028.7	4,502,666
2.7	3.5	347.3	34,731.4	3,473,146
2.8	2.7	270.8	27,061.2	2,706,118
2.9	2.1	214.8	21,481.1	2,148,113
3.0	1.7	172.8	17,283.2	1,728,320
3.1	1.4	140.2	14,019.0	1,401,902
3.2	1.1	113.9	11,390.8	1,139,980
3.3	0.9	92.1	9,212.9	921,282
3.4	0.7	73.7	7,370.8	737,082
3.5	0.6	58.0	5,803.1	580,306
3.6	0.4	45.0	4,497.6	449,760
3.7	0.3	34.7	3,470.0	347,006
3.8	0.2	27.1	2,706.4	270,636
3.9	0.1	21.5	2,147.1	214,708
4.0	0.0	17.3	1,727.7	172,769
4.5	0.0	5.8	580.2	58,022
5.0	0.0	1.7	172.8	17,276

a) rapport de dilution 2

b) rapport de dilution 10

la variable T étant normalement distribuée avec une moyenne

$$\sum_{i=1}^k e^{-\frac{u}{a^{i-1}}}$$

et un écart-type

$$\sqrt{\frac{\log 2}{n \log a}}$$

(voir annexe VII) il devient possible de

joindre un intervalle de confiance à l'estimation de u.

Si le rôle de n dans la précision des résultats ne laisse aucun doute possible, celui du coefficient a est illusoire. Bien que l'écart-type de la distribution diminue lorsque a augmente, le choix d'un coefficient a élevé a pour effet de diminuer le nombre des dilutions apportant une information. Il est plus judicieux de choisir un rapport de dilution peu élevé de façon à augmenter le nombre des niveaux intermédiaires qui sont porteurs d'une information.

Exemple

Le tableau 11 donne les résultats du titrage d'une suspension virale par la méthode de FISHER avec huit dilutions décimales comportant chacune six répétitions (d'après une communication personnelle de BEYTOUT D. et PLISSIER M.).

Tableau 11 Résultats du titrage d'une suspension virale

DILUTION	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de tubes négatifs	0	0	5	6	6	6	6	6

$\frac{T}{n} = 5,83$ cette valeur ne figure pas dans la table.

Les deux derniers niveaux qui apportent très peu d'information peuvent être supprimés. $\frac{T}{n} = 3,83$ pour les six premières dilutions,

ce qui donne après interpolation linéaire $u \approx 25,5$ unités infectieuses par inoculum à la première dilution.

L'écart-type de $\frac{T}{n}$ est : $\sqrt{\frac{\log 2}{6 \log 10}} \approx 0,224$

et $3,83 - 1,96 \times 0,224 < \frac{T}{n} < 3,83 + 1,96 \times 0,224$ avec une probabilité de 0,95

$$3,39 < \frac{T}{n} < 4,27$$

et finalement par lecture des tables $11 < u < 75,5$

IV - 2 La dose 50 %

Ce chapitre qui n'a fait l'objet d'aucune recherche personnelle a été tiré de VAN DER WAERDEN (14) et de DOUGHERTY (2).

Il a paru cependant important de l'inclure pour tenter de présenter une photographie plus complète des différentes méthodes.

IV - 2 - 1 Définition

La courbe dose-réponse obtenue en exprimant la probabilité de réaction (infection) du milieu de culture en fonction du logarithme de la dose inoculée a une forme caractéristique de S.

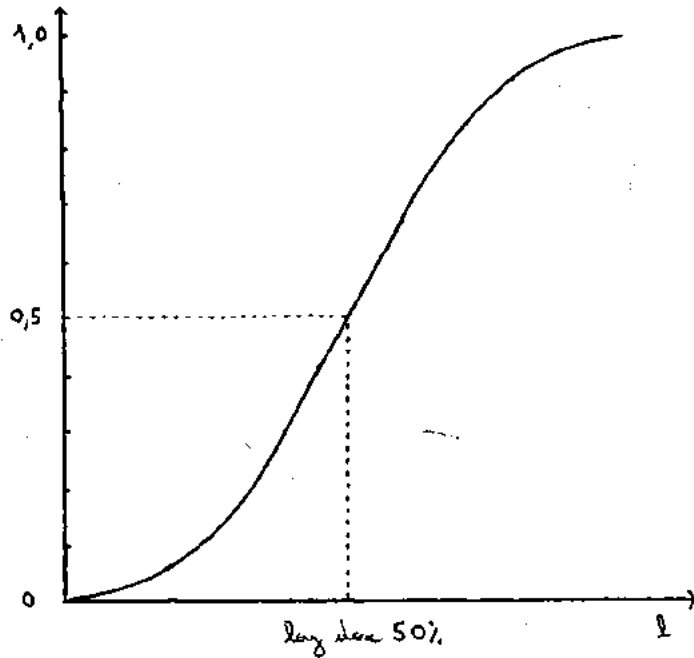


Figure 14

Courbe dose-réponse

En abscisses : logarithme de la dose (dilution) de l'inoculum,
 En ordonnées : probabilité d'obtention d'une réponse positive.

L'emploi du logarithme a, entre autres, l'avantage de permettre à deux courbes dose-réponse de deux suspensions, qui ne diffèrent que par leurs concentrations de se déduire l'une de l'autre par translation. Le logarithme du rapport des concentrations est caractéristique de la translation.

Une unité couramment utilisée en virologie par exemple est la dose cytopathique 50 % : c'est la concentration d'inoculum provoquant une réponse positive (effet cytopathique) avec une probabilité de 0,5. Cette valeur correspond en général à la partie de la courbe pour laquelle la pente est la plus accentuée, ce qui permet plus de précision dans sa détermination.

Malgré cela, la détermination graphique de la dose 50 % à partir d'une courbe obtenue expérimentalement en remplaçant les probabilités par les fréquences observées n'est pas aisée surtout lorsqu'on dispose de peu de points.

Il existe de nombreuses méthodes d'exploitation fondées sur des hypothèses plus ou moins restrictives. Nous n'aborderons que les trois méthodes les plus pratiquées : la méthode des probits, la méthode de Behrens et Kärber, la méthode de Reed et Muench.

IV - 2 - 2 Méthode des "Probits"

Sous l'hypothèse que la courbe dose-réponse est la fonction de répartition d'une distribution normale, il est possible par une anamorphose sur l'axe des ordonnées de transformer la sigmoïde en une droite ; ce qui permettra une lecture plus facile. Une correspondance est établie entre une échelle linéaire "les probits" et une échelle gaussienne. Ce travail est simplifié de façon appréciable par l'utilisation de papier gaussologarithmique.

L'hypothèse de normalité de la distribution, qui est très forte, est admise si les points sont sensiblement alignés, d'où le caractère arbitraire de cette méthode. La droite de HENRY (voir II - 5 - 3 - 2) est tracée en accordant le plus d'importance aux points situés vers le centre.

Le logarithme de la dose 50 % est l'abscisse du point de la droite associé au probit 5. Le graphique ne permet pas d'évaluer la précision de l'estimation qui requiert des calculs supplémentaires basés sur des procédés empiriques (2).

Une difficulté supplémentaire apparaît pour les valeurs donnant 0 % ou 100 % de réponses positives car les probits associés à ces deux nombres sont respectivement $-\infty$ et $+\infty$. On y remédie selon PRIGGE et SCHAFER (cités par VAN DER WAERDEN, 14) en calculant un intervalle de confiance pour chaque fréquence observée.

A chaque dose correspond un segment de droite parallèle à l'axe des ordonnées et dans le cas où les fréquences sont 0 % ou 100 %, le segment s'étend indéfiniment vers le bas ou vers le haut. Il suffit ensuite de tracer la droite de manière à couper la totalité ou la plus grande partie de ces segments.

L'exemple du tableau 12 et de la figure 15 a été tiré du travail de DOUGHERTY (2).

Tableau 12 Quantification du virus de la Psittacose sur oeuf embryonné

Logarithme de la dilution (1)	Nombre d'essais	Nombre de réponses positives	Fréquence	Probit
- 5	22	22	100	-
- 6	24	21	87,5	6,15
- 7	22	8	36,4	4,65
- 8	23	1	4,3	3,28

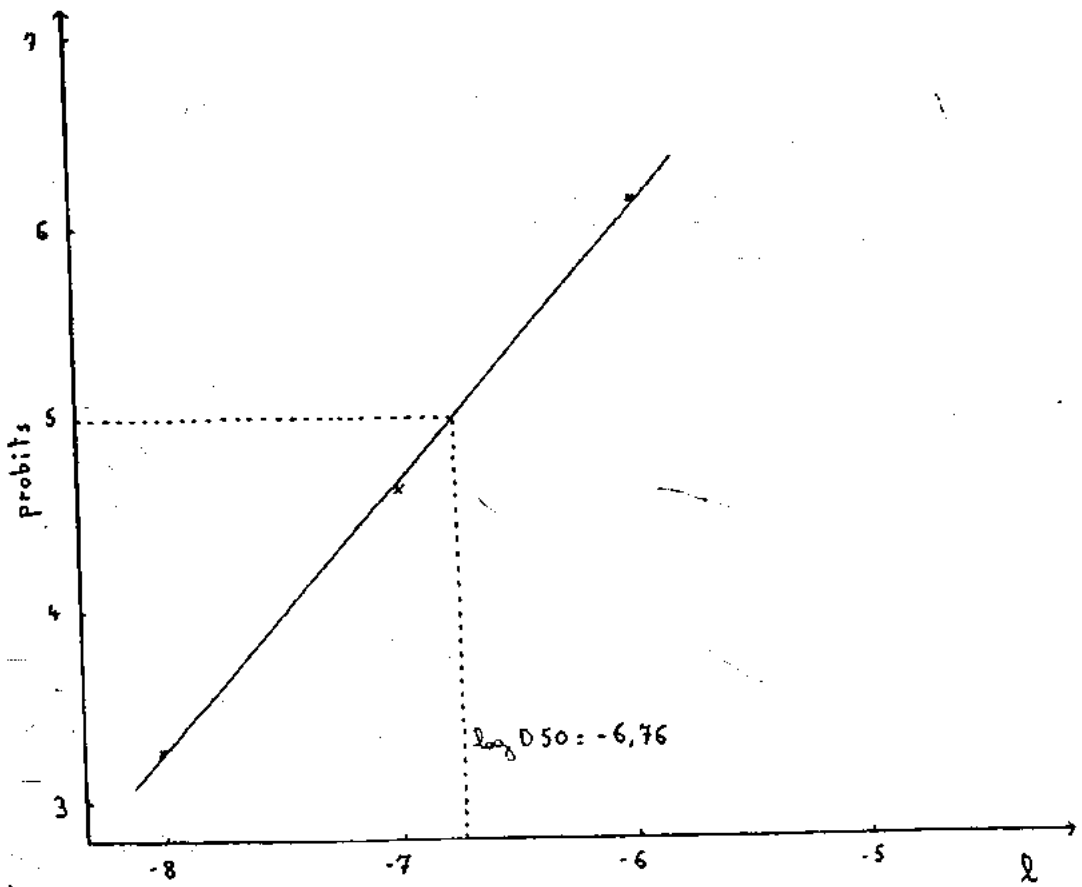


Figure 15

Détermination graphique de log D50 par la méthode des probits

En prenant l'abscisse du point correspondant au probit 5, on peut lire directement :

$$\log D 50 \% = - 6,76$$

$$D 50 \% = 10^{-6,76} = \frac{1}{5,75 \times 10^6} \quad \text{tel que } 5,75 \times 10^6$$

est le titre d'un inoculum de suspension non dilué.

Comme dans cet exemple, l'inoculum était de 0,2 ml par oeuf l'expression finale du titre de la suspension devient :

$$\frac{5,75 \times 10^6}{0,2} \approx 2,9 \times 10^7 \text{ D 50 \% par ml.}$$

IV - 2 - 3 Méthode des surfaces selon Behrens et Kärber

Le procédé exposé ci-après est indépendant de l'hypothèse de normalité de la distribution et ne nécessite que des hypothèses beaucoup plus faibles, à savoir : les pourcentages de réponses s'échelonnent entre 0 et 100 % et la distribution est symétrique (cette dernière hypothèse permet d'identifier la dose 50 % à la dose moyenne provoquant une réponse positive)

Lorsque les pourcentages 0 et 100 % n'ont pas été réalisés, on peut quelquefois admettre que des dilutions consécutives aux deux dilutions extrêmes effectuées auraient donné les proportions souhaitées.

Dans ces conditions, le logarithme de la dose 50 % est donné par la formule :

$$(1) \quad \log D \ 50 \% = l_r + \frac{1}{2}d - d \sum_{i=0}^r h_i$$

avec, l_r : logarithme de la dilution la plus élevée donnant 100 % de réponses positives,
 d : logarithme du rapport de dilution,
 h_i : proportion de réponses positives observées au niveau de dilution i .

La variance de $\log D \ 50 \%$ s'exprime par :

$$(2) \quad d^2 \sum_{i=1}^n \frac{h_i (1-h_i)}{N_i - 1}$$

où N_i est le nombre d'essais à la dilution i .

Ces formules sont établies en annexe VIII.

L'examen de la formule (2) montre que les premiers termes ainsi que les derniers termes de la série sont proches de 0 ; il est par conséquent inutile de faire un grand nombre d'essais pour les dilutions extrêmes car elles n'influent que très peu sur la précision.

L'information étant surtout portée par les termes intermédiaires, il est avantageux d'augmenter le nombre des essais pour les dilutions voisines de la D 50 %.

Enfin, il est clair que la précision est meilleure lorsque le rapport de dilution est petit.

Tableau 13 Résultats d'un titrage d'une suspension virale

Logarithme de la dilution	Nombre d'essais	Nombre de réponses positives	Proportion de réponses posi. h_i	$1 - h_i$
- 5	22	22	1	0
- 6	24	21	0,88	0,12
- 7	22	8	0,36	0,64
- 8	23	1	0,04	0,96

Les résultats du titrage donnés dans le tableau 13 reprenant ceux de l'exemple proposé en IV - 2 - 2 permettent d'appliquer la méthode de Kärber.

Ainsi, d'après la relation (1)

$$\log D 50 \% = - 5 + \frac{1}{2} (1) - (1) (2,28)$$

$$\log D 50 \% = - 6,78$$

et d'après la relation (2)
$$\sigma = \sqrt{\frac{0,88 \times 0,12}{23} + \frac{0,36 \times 0,64}{21} + \frac{0,04 \times 0,96}{22}}$$

$$\sigma = 0,13$$

D'où l'on peut donc tirer finalement :

$$\log D 50 \% = - 6,78 \pm 0,13$$

IV - 2 - 4 La méthode de Reed et Muench

Dans le cas de la méthode de Reed et Muench, le calcul de la dose 50 % est effectué par interpolation linéaire à partir des fréquences cumulées des réponses positives et négatives.

Le principe appliqué est le suivant : tout hôte atteint par un virus (par exemple) à une concentration donnée aurait aussi été atteint à une concentration plus élevée, et inversement un essai négatif pour une certaine dose aurait donné le même résultat pour une dose plus faible.

Tableau 14 Titrage du virus de la Psittacose par la méthode de Reed et Muench

Logarithme de la dilution	Nombre d'essais positifs	Nb d'essais négatifs	Réponses cumulées positives	Réponses cumulées négatives	Fréquence cumulée des essais positifs (%)
- 5	22	0	52	0	100
- 6	21	3	30	3	91
- 7	8	14	9	17	35
- 8	1	22	1	39	3

Dans l'exemple du tableau 14, la dilution donnant 50 % de réponses positives se situe entre les dilutions - 6 et - 7 qui correspondent respectivement à 91 % et 35 % de réponses cumulées.

Par interpolation linéaire, $\log D 50 \% = - 6 - \frac{91 - 50}{91 - 35} = \dots$

ce qui (d'après IV - 2 - 2) donne le titre de la suspension : $2,7 \times 10^7$ D50 % par ml.

L'application de cette méthode nécessite l'existence d'au moins deux points expérimentaux dont le pourcentage de réponses est compris entre 0 et 100 % ; d'autre part, le nombre d'essais pour chaque niveau de dilution doit être sensiblement le même.

IV - 2 - 5 Discussion.

Pour chaque méthode décrite précédemment, un certain nombre de critiques peuvent être avancées.

a) La méthode des probits ne permet pas d'apprécier facilement la précision du résultat ; de plus, l'hypothèse de normalité sur laquelle elle s'appuie n'autorise son emploi qu'après vérification du caractère gaussien de la distribution.

b) La méthode des surfaces selon Behrens et Kärber qui se distingue par sa plus grande rigueur, sa simplicité, la possibilité de calculer l'écart-type et enfin l'hypothèse relativement peu restrictive servant de support au développement mathématique, a de ce fait un avantage certain sur les deux autres procédés.

c) La méthode de Reed et Muench, bien que très largement utilisée pour l'estimation de la dose 50 %, a fait l'objet de nombreuses critiques. Notamment le principe sur lequel est basé le calcul (en l'occurrence, tout hôte atteint à une concentration donnée aurait été atteint à une concentration plus élevée) s'avère faux dans certaines situations (5). Par ailleurs, il n'est pas possible d'évaluer la précision du résultat bien que la formule établie de manière empirique par PIZZI (10) puisse être utilisée et enfin l'utilisation des fréquences cumulées porte à croire que l'estimation est faite à partir de nombres plus grands que les effectifs réels.

Avant de clore ce chapitre, il est nécessaire d'établir une correspondance entre les unités utilisées en microbiologie, ceci afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par différentes méthodes de quantification comme le N.P.P. et la dose 50 %.

Un problème important se pose : en effet, si les particules virales par exemple existent en tant qu'individus, il est très probable que dans une suspension, elles se trouvent essentiellement sous forme d'agrégats. Ceci amène alors à définir une unité infectieuse comme la plus petite quantité de virus pouvant provoquer une manifestation chez l'hôte. Le titre d'une suspension peut par conséquent s'exprimer par le nombre d'unités infectieuses ou par le nombre de doses 50 % par millilitre. Comme le nombre de particules actives dans un inoculum suit une loi de Poisson, une dose 50 % correspond à un nombre moyen m de particules efficaces contenues dans l'inoculum tel que

$$e^{-m} = 0,5 \quad (7)$$

Ainsi, une dose 50 % équivaut à une moyenne de 0,69 unités infectieuses.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail a permis d'évaluer l'impact de divers paramètres comme le rapport de dilution, le nombre des dilutions ainsi que le nombre des essais sur la fiabilité d'une estimation.

Abstraction étant faite des sources de variation autres que celles dues à l'échantillonnage (erreurs dans le comptage des colonies, dans les dilutions, etc...), l'étude comparative des deux principales méthodes de quantification montre une nette supériorité du comptage direct des colonies sur boîtes par rapport à l'estimation du nombre le plus probable (N.P.P.), en ce qui concerne la précision des résultats. De plus, l'utilisation d'un faible rapport de dilution (par exemple 2) offre l'avantage de pouvoir améliorer notablement la qualité d'une estimation par la lecture de plusieurs boîtes correspondant à des dilutions successives et aussi d'obtenir avec une plus grande probabilité un essai contenant un nombre appréciable de colonies.

Par ailleurs, le N.P.P. a tendance à surestimer le titre réel d'une suspension. Hormis le fait que les microorganismes se développent en général plus facilement dans un milieu liquide que sur un milieu solide, et que certains germes non étudiés susceptibles de donner un résultat positif en milieu liquide sont écartés lors du comptage sur boîtes, la surestimation est pour une large part inhérente aux propriétés mathématiques du N.P.P. En effet, le N.P.P. est un estimateur biaisé de la densité réelle mais l'importance du biais diminue lorsque le nombre de tubes augmente. L'ensemencement d'un grand nombre de milieux pour chaque niveau de dilution permet de pallier à ces deux inconvénients ; ainsi pour 96 tubes inoculés par niveau le biais devient négligeable et la précision atteint 14 %.

L'estimation par le nombre le plus probable réalisée à partir d'une dilution unique autorise, dans certains cas, des résultats aussi précis que le N.P.P. classique à trois dilutions, et peut être appliquée délibérément par souci d'économie si la connaissance a priori de la densité le permet.

L'originalité de la méthode de FISHER est qu'elle ne nécessite qu'un nombre limité de tables malgré un large éventail de possibilités dans la manière d'agencer la manipulation.

La méthode des surfaces de BEHRENS et KARBBER qui repose sur une hypothèse relativement peu restrictive et qui permet en outre le calcul de l'écart-type semble être le moyen le plus approprié pour la détermination de la dose 50 %.

Quelle que soit la méthode de quantification utilisée, il est possible d'améliorer à volonté la qualité des résultats mais le gain de précision étant de plus en plus difficile à acquérir, au delà d'une certaine limite, les moyens devant être mis en oeuvre ne sont plus justifiés par le bénéfice obtenu.

Nous faisons nôtre la considération de LURIA (5) et reconnaissons que, quoi qu'il en soit, le nombre estimé de germes n'a qu'une valeur statistique et n'est lié au nombre de microorganismes réellement présents dans le milieu à titrer que par des facteurs de proportionnalité inconnus qui dépendent très probablement du germe recherché ainsi que de la composition du milieu de culture. Dans ces conditions, il n'est pas vain de répéter que les résultats d'un titrage microbiologique doivent être utilisés avec la plus grande prudence et que du même coup, la valeur de normes guides (sinon "Guillotines") permettant de juger de la qualité microbiologique d'un eau ou d'un aliment n'est qu'illusion.

ANNEXES

Un titrage par la méthode des dilutions donne un triplet, évènement qu'on désignera par S.

I étant un intervalle, montrons que la probabilité pour que u appartienne à I est égale au rapport de l'aire définie par cet intervalle sur l'aire totale.

C'est-à-dire que :

$$P(u \in I/S) = \frac{\int_I L(u) \, du}{\int_{R^+} L(u) \, du}$$

$P(u \in I/S)$ représente la probabilité pour que u appartienne à I, sachant que S est réalisé.

$$P(u \in I/S) = \frac{P(S/u \in I)}{P(S/u \in I) + P(S/u \notin I)}$$

d'où
$$P(u \in I/S) = \frac{\int_I P(S/u) \, du}{\int_{R^+} P(S/u) \, du}$$

Or $P(S/u)$ est la probabilité d'obtenir S, sachant que la densité est u.

$$P(S/u) = L(u)$$

On a finalement :

$$P(u \in I/S) = \frac{\int_I L(u) \, du}{\int_{R^+} L(u) \, du}$$

Ce qu'il fallait r

Calcul du biais du N.P.P. par rapport à la densité réelle u

. rappel théorique

Si la variable x suit la loi $N(m, \sigma)$ alors la densité de x s'exprime par $f(x) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-m)^2}{2\sigma^2}}$

et la probabilité pour que x appartienne à un intervalle A est égale à :

$$P(A) = \int_A f(x) dx$$

Effectuons le changement de variable $x = \text{Log } X_1$ et cherchons la densité relative à X .

D'après 1) $X = e^x$ et $dx = \frac{1}{X} dX = \frac{1}{e^x} dX$

D'où $P(A) = \int_{A'} \frac{1}{X} f(\text{Log } X) dX$

A' est l'image de l'intervalle A par la fonction exponentielle base e

Finalement, $f(X) = \frac{1}{X} f(\text{Log } X)$ 2)

Notations

- u : densité réelle de la suspension
 X : N.P.P.
 σ : écart-type de la distribution de Log X
 (Log représente la fonction logarithme népérien)

Dans le cas présent,

$$\sigma = \frac{0,55 \times \text{Log } 10}{\sqrt{n}} = \frac{1,27}{\sqrt{n}}$$

- n : nombre de tubes à chaque dilution
 f(X) : densité du N.P.P. sachant que le titre réel est
 m : moyenne arithmétique du N.P.P.

D'après III - 3, Log X est normalement distribué, donc en tenant compte de 2)

$$f(X) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi} X} e^{-\frac{(\text{Log } X - \text{Log } \mu)^2}{2\sigma^2}}$$

La moyenne m est, par définition, égale à :

$$\int_0^{+\infty} X f(X) dX$$

$$m = \int_0^{+\infty} \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\text{Log } X - \text{Log } \mu)^2}{2\sigma^2}} dX$$

Calculons cette intégrale par le changement de variable suivant :

Posons $X = e^y$ d'où $\text{Log } X = y$ et $dX = e^y dy$

$$m = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{e^y}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(y - \text{Log } \mu)^2}{2\sigma^2}} dy$$

$$m = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{Y^2 - 2Y \text{Log } \mu + \text{Log}^2 \mu - 2Y\sigma^2}{2\sigma^2}} dY$$

$$m = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{Y^2 - 2Y(\text{Log } \mu + \sigma^2) + \text{Log}^2 \mu}{2\sigma^2}} dY$$

$$m = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(Y - (\text{Log } \mu + \sigma^2))^2 - 2\text{Log } \mu \times \sigma^2 - \sigma^4}{2\sigma^2}} dY$$

$$m = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(Y - (\text{Log } \mu + \sigma^2))^2}{2\sigma^2}} \times e^{\frac{\sigma^2}{2} + \text{Log } \mu} dY$$

$$m = e^{\frac{\sigma^2}{2} + \text{Log } \mu} \times \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(Y - (\text{Log } \mu + \sigma^2))^2}{2\sigma^2}} dY$$

Cette dernière intégrale étant égale à l'unité, il reste :

$$m = e^{\frac{\sigma^2}{2} + \text{Log } \mu} = \mu e^{\frac{\sigma^2}{2}}$$

Comme $\sigma = \frac{1,27}{\sqrt{n}}$ $m = \mu e^{\frac{1,27^2}{2n}}$

La moyenne arithmétique est le produit de μ par un facteur supérieur à 1, qui est à l'origine de la surestimation de la valeur réelle lorsqu'on fait la moyenne arithmétique des N.P.P. obtenus expérimentalement.

Notons, pour terminer, que l'importance du biais diminue quand n augmente.

Relation entre la précision et le nombre de tubes

. n = 5

$$\sigma_{\log} = \frac{0,55}{\sqrt{5}} \approx 0,246$$

La valeur se situant à une unité d'écart-type à droite du N.P.P. vaut sensiblement : $\text{N.P.P.} \times 10^{0,246} = \text{N.P.P.} \times 1,76$

L'erreur relative correspondante est donnée par $\frac{(1,76 - 1) \text{N.P.P.}}{\text{N.P.P.}} = 0,76$

La même valeur, mais à gauche du N.P.P. est : $\frac{\text{N.P.P.}}{10^{0,246}} = \frac{\text{N.P.P.}}{1,76}$

$$\text{d'où l'erreur relative} \frac{\left(1 - \frac{1}{1,76}\right) \text{N.P.P.}}{\text{N.P.P.}} = 0,43$$

Une approximation assez grossière de la précision est la moyenne des deux résultats précédents : soit environ 0,60.

Pour n = 10, 20, 96 et 200 un raisonnement analogue donne respectivement les résultats approchés suivants : 0,40 ; 0,30 ; 0,14 ; 0,09.

Cette approximation s'affine lorsque n augmente (cela est dû à une meilleure symétrie de la courbe de fréquence).

. ainsi pour n = 96

$$\sigma_{\log} = \frac{0,55}{\sqrt{96}} \approx 0,056$$

Les deux valeurs encadrant la précision sont cette fois :

$$\frac{(1,14 - 1) \text{N.P.P.}}{\text{N.P.P.}} = 0,14 \quad \text{et} \quad \frac{\left(1 - \frac{1}{1,14}\right) \text{N.P.P.}}{\text{N.P.P.}} \approx 0,12$$

Recherche du nombre de germes par inoculum pour lequel le résultat a la meilleure précision (4)

Considérons une dilution unique ; n étant le nombre total de tubes, p le nombre de tubes positifs et s celui des tubes stériles,

La fonction de vraisemblance s'écrit $L(u) = \frac{n!}{s! p!} e^{-s u} (1 - e^{-u})^p$

Appliquons le principe du maximum de vraisemblance.

L est maximal si son logarithme

$$\text{Log } L = K + p \text{ Log } (1 - e^{-u}) - s u$$

est maximal (K est une constante).

D'où $\frac{d \text{Log} L}{d u} = \frac{p e^{-u}}{1 - e^{-u}} - s = 0$

Finalement, $e^{-u} = \frac{s}{p+s} = \frac{s}{n}$ ou encore $u = - \text{Log } \frac{s}{n}$

$-\text{Log } \frac{s}{n}$ est un estimateur de la densité u.

L'écart-type σ de la distribution de u est relié à la quantité d'information de FISHER I par :

$$I = \frac{1}{\sigma^2} = - \frac{d^2 \text{Log} L}{d u^2} = \frac{p e^{-u}}{(1 - e^{-u})^2}$$

en remplaçant e^{-u} par $\frac{s}{n}$, il vient $I = \frac{1}{\sigma^2} = \frac{n s}{p}$

La précision est maximale lorsque $\frac{\sigma}{u}$ est le plus petit possible, c'est-à-dire lorsque $I u^2$ est le plus grand possible car

$$\left(\frac{\sigma}{u}\right)^2 = \frac{1}{I u^2}$$

$$I u^2 = \frac{u^2 n s}{p} \quad \text{or} \quad \frac{s}{p} = \frac{1}{e^u - 1}$$

$$I u^2 = \frac{u^2 n}{e^u - 1}$$

Annexe IV (suite)

En dérivant par rapport à u

$$\frac{n (2u e^u - 2u - u^2 e^u)}{(e^u - 1)^2}$$

la valeur u cherchée est solution de l'équation : $2e^u - 2 - u e^u = 0$

ce qui donne $e^u = \frac{2}{(2 - u)}$,

équation dont la valeur 1,59363 est une solution.

La précision est optimale quand le nombre moyen de micro-organismes par inoculum est de 1,6 ce qui donne 80 % de réponses positives.

Relation entre la précision et la densité u (dilution unique)

L'écart-type de u est $\sqrt{\frac{e^u - 1}{n}}$; la précision

(rapport de l'écart-type sur la densité) s'exprime par $\frac{\sigma}{u} = \sqrt{\frac{e^u - 1}{u^2 n}}$

ANNEXE V

Programme de résolution de l'équation permettant le calcul du N.P.P. avec 96 cupules

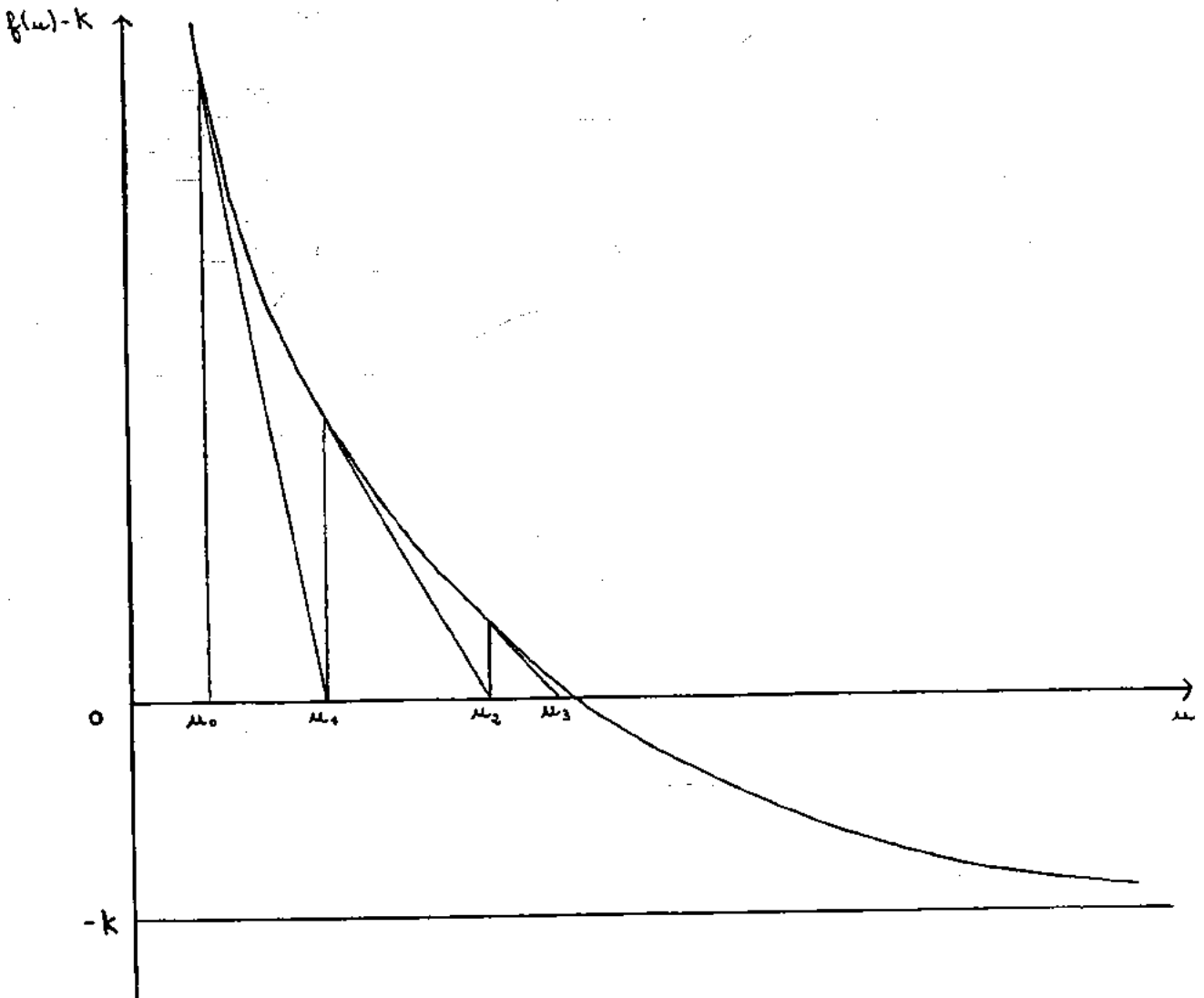
. principe L'équation

$$(96 - p_1) + 0,1(96 - p_2) + 0,01(96 - p_3) =$$

$$\frac{p_1 e^{-u}}{1 - e^{-u}} + \frac{0,1p_2 e^{-0,1u}}{1 - e^{-0,1u}} + \frac{0,01p_3 e^{-0,01u}}{1 - e^{-0,01u}}$$

est de la forme $f(u) - K = 0$

La résolution est faite par la méthode de NEWTON dont le principe est illustré par la figure 16.



Soit u_1 l'abscisse du point d'intersection avec l'axe Ou de la tangente à la courbe au point d'abscisse u_0 .

La réitération de ce procédé donne une suite $u_0, u_1, \dots, u_n, \dots$ convergent vers la solution de l'équation, à condition toutefois que la valeur initiale u_0 soit convenablement choisie.

Si la suite ne converge pas, il suffit de changer la valeur u_0 .

Dans le programme * ci-dessous, l'initialisation à 0,2 convient pour la plupart des triplets.

```
1 CE PROGRAMME, ECRIT (EN BASIC) POUR ETRE UTILISE SUR UN
3 MINI-ORDINATEUR LX 500 (LOGABAX) PERMET LA RESOLUTION
5 EN UTILISANT LA METHODE DE NEWTON, DE L'EQUATION PRECEDEN
7 ENTREE DES VALEURS DE P1, P2 ET P3
9 INPUT P1;P2;P3
11 K=(96-F1)+(96-F2)*0.1+(96-F3)*0.01
13 INITIALISATION DE U; CALCUL DE F(U) (ICI F(U)=X1)
15 U=0.2
17 U0=U
19 A=EXP(-U0)
21 B=EXP(-0.1*U0)
23 C=EXP(-0.01*U0)
25 X1=F1*A/(1-A)+F2*B*0.1/(1-B)+F3*C*0.01/(1-C)
27 CALCUL DE LA DERIVEE DE F (ICI F'(U)=X2)
29 LE CARRE DE A EST ICI NOTE A^2
31 X2=-F1*A/(1-A)^2 -F2*B*(0.1^2)/(1-B)^2-F3*C*(0.01^2)/(1-C)
33 CALCUL DE LA NOUVELLE VALEUR DE U
35 U=(K-X1+U0*X2)/X2
37 TEST D'ARRET
39 IF ABS(U-U0)<0.01 THEN GOTO 43 ELSE GOTO 17
41 IMPRESSION DE LA SOLUTION
43 PR U
45 END
```

* Programme réalisé avec la collaboration de M. VAGOST D., à qui nous exprimons nos plus vifs remerciements.

Notations

a :	rapport de dilution
k :	nombre de dilutions
X _i :	nombre de colonies à la i ^{ème} dilution
u :	densité du premier inoculum

Si le nombre de microorganismes dans le premier inoculum suit la loi P(u) (loi de Poisson de paramètre u), alors le nombre de microorganismes dans un inoculum de la i^{ème} dilution suit la loi P($\frac{u}{a^{i-1}}$)

Pour k boîtes successives contenant respectivement X₁, X₂, ..., X_k colonies, la fonction de vraisemblance est :

$$L(u) = \prod_{i=0}^{k-1} e^{-\frac{u}{a^i}} \cdot \frac{(\frac{u}{a^i})^{X_{i+1}}}{X_{i+1}!}$$

Cherchons un estimateur de u par la méthode du maximum de vraisemblance.

$$\text{Log } L(u) = - \sum_{i=0}^{k-1} \frac{u}{a^i} + \sum_{i=0}^{k-1} X_{i+1} \text{Log } \frac{u}{a^i} + K \quad (K \text{ est une constante})$$

$$\frac{d \text{Log } L}{d u} = - \sum_{i=0}^{k-1} \frac{1}{a^i} + \sum_{i=0}^{k-1} \frac{X_{i+1}}{u}$$

ce qui donne l'équation de vraisemblance : $-\sum_{i=0}^{k-1} \frac{1}{a^i} + \sum_{i=0}^{k-1} \frac{X_{i+1}}{u} = 0$

La solution de l'équation de vraisemblance, notée \hat{u} , est un estimateur de u.

$$\hat{u} = \frac{\sum_{i=0}^{k-1} X_{i+1}}{\sum_{i=0}^{k-1} \frac{1}{a^i}} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_k}{1 + \frac{1}{a} + \dots + \frac{1}{a^{k-1}}}$$

$$E(\hat{u}) = \frac{1}{1 + \frac{1}{a} + \dots + \frac{1}{a^{k-1}}} \cdot [E(X_1) + E(X_2) + \dots + E(X_k)]$$

E(\hat{u}) est l'espérance mathématique de \hat{u} .

Annexe VI (suite)

$$E(\hat{u}) = \frac{\mu + \frac{\mu}{a} + \dots + \frac{\mu}{a^{k-1}}}{1 + \frac{1}{a} + \dots + \frac{1}{a^{k-1}}} = \mu$$

\hat{u} est par conséquent un estimateur non biaisé de u .

Posons $X = \sum_{i=0}^{k-1} X_{i+1}$ et $A = \sum_{i=0}^{k-1} \frac{1}{a^i}$

de ce fait, $\hat{u} = \frac{X}{A}$

X étant la somme de plusieurs variables aléatoires indépendantes suivant chacune une loi de Poisson, elle suit également une loi de Poisson dont le paramètre est la somme des paramètres des variables X_i .

X suit la loi $P \left(\mu + \frac{\mu}{a} + \dots + \frac{\mu}{a^{k-1}} \right)$

Si le paramètre de cette dernière distribution est grand (il en est généralement ainsi pour les résultats expérimentaux), la loi de X peut être approchée par une loi normale de moyenne μA et d'écart-type $\sqrt{\mu A}$

et $\frac{X - \mu A}{\sqrt{\mu A}}$ suit la loi normale centrée réduite.

Il en est de même pour $\frac{\frac{X}{A} - \mu}{\sqrt{\frac{\mu}{A}}}$

Finalement $\frac{\hat{u} - \mu}{\sqrt{\frac{\mu}{A}}}$ suit la loi $N(0,1)$

La précision de l'estimation s'exprime par le rapport : $\frac{\sqrt{\frac{\mu}{A}}}{\mu} = \frac{1}{\sqrt{\Delta \mu}}$

Un intervalle de confiance à 95 % est donné par les nombres réels u vérifiant la double inégalité :

$$-1,96 \sqrt{\frac{\mu}{A}} < \hat{u} - \mu < 1,96 \sqrt{\frac{\mu}{A}}$$

aux bornes de l'intervalle de confiance, on a :

$$\hat{\mu} - \mu = \pm 1,96 \sqrt{\frac{\mu}{A}}$$

Les limites de confiance à 95 % sont les solutions de l'équation du second degré en μ : $(\hat{\mu} - \mu)^2 = 1,96^2 \frac{\mu}{A}$

ce qui donne les valeurs : $\hat{\mu} + \frac{1,96^2}{2A} \pm \sqrt{\left(\frac{1,96^2}{2A}\right)^2 + \frac{1,96^2 \hat{\mu}}{A}}$

en remplaçant $\hat{\mu}$ par $\frac{X}{A}$ et après factorisation, on obtient :

$$\frac{X}{A} + \frac{1,96^2}{2A} \pm \frac{1,96}{A} \sqrt{\frac{1,96^2}{4} + X}$$

Comme X est grand devant $\frac{1,96^2}{4}$ ce dernier terme peut être négligé et finalement, les limites de confiance à 95 % sont données par :

$$\frac{X}{A} + \frac{1,92}{A} - \frac{1,96}{A} \sqrt{X} \quad \text{et} \quad \frac{X}{A} + \frac{1,92}{A} + \frac{1,96}{A} \sqrt{X}$$

Equation de FISHER

. notations

u :	densité d'un inoculum à la concentration la plus élevée
a :	rapport de dilution
n :	nombre de milieux inoculés à chaque dilution
k :	nombre de dilutions
X_i :	variable aléatoire associée au nombre d'essais négatifs à la i ^{ème} dilution.

X_i suit la loi binomiale de paramètres n et $e^{-\frac{\mu}{a^{i-1}}}$

Soit T la variable aléatoire associée au nombre total d'essais négatifs.

$$T = X_1 + X_2 + \dots + X_k$$

L'espérance mathématique de T, E(T), est égale à :

$$E\left(\sum_{i=1}^k X_i\right) = \sum_{i=1}^k E(X_i)$$

comme $E(X_i) = n \cdot e^{-\frac{\mu}{a^{i-1}}}$

$$E(T) = n \sum_{i=1}^k e^{-\frac{\mu}{a^{i-1}}} \quad \text{ou encore}$$

$$E\left(\frac{T}{n}\right) = \sum_{i=1}^k e^{-\frac{\mu}{a^{i-1}}} \quad (\text{équation de FISHER})$$

donc $\frac{T}{n}$ est un estimateur non biaisé de $e^{-\mu} + e^{-\frac{\mu}{a}} + \dots + e^{-\frac{\mu}{a^{k-1}}}$

Connaissant $\frac{T}{n}$, u est déterminé par la résolution de l'équation :

$$\frac{T}{n} = \sum_{i=1}^k e^{-\frac{\mu}{a^{i-1}}}$$

La fonction définie par $f(u) = \sum_{i=1}^k e^{-\frac{\mu}{a^{i-1}}}$ est continue et strictement décroissante sur l'intervalle $\left[0, +\infty\right[$;
 $f(0) = k$ et $\lim_{u \rightarrow +\infty} f(u) = 0$

Annexe VII (suite)

Par conséquent, il existe une solution unique à l'équation

$$f(u) = \frac{T}{m} \quad \text{pour toute valeur } \frac{T}{n} \text{ comprise entre 0 et } k.$$

σ_T désignant l'écart-type de T , d'après le théorème central limite (VAN DER WAERDEN), $\frac{T - E(T)}{\sigma_T}$ suit la loi $N(0,1)$.

Il en est de même pour $\frac{\frac{T}{m} - E(\frac{T}{m})}{\frac{\sigma_T}{m}}$,

$$\frac{\sigma_T}{m} \text{ valant } \sqrt{\frac{\log 2}{m \log a}}, \quad \text{d'après WYSHAK et DETRE (16).}$$

Ce dernier résultat permettra de compléter l'estimation de u par le calcul d'un intervalle de confiance.

Estimation de la dose 50 % par la méthode des surfaces selon BEHRENS et KÄRBI

Si la courbe dose-réponse est considérée comme la fonction de répartition F d'une distribution symétrique, la médiane, c'est-à-dire la dose 50 %, se confond avec la moyenne de la distribution.

Ainsi $\log D\ 50\ \% = \int_{-\infty}^{+\infty} l\ dF(l)$ où l désigne le logarithme de la dilution de l'inoculum.

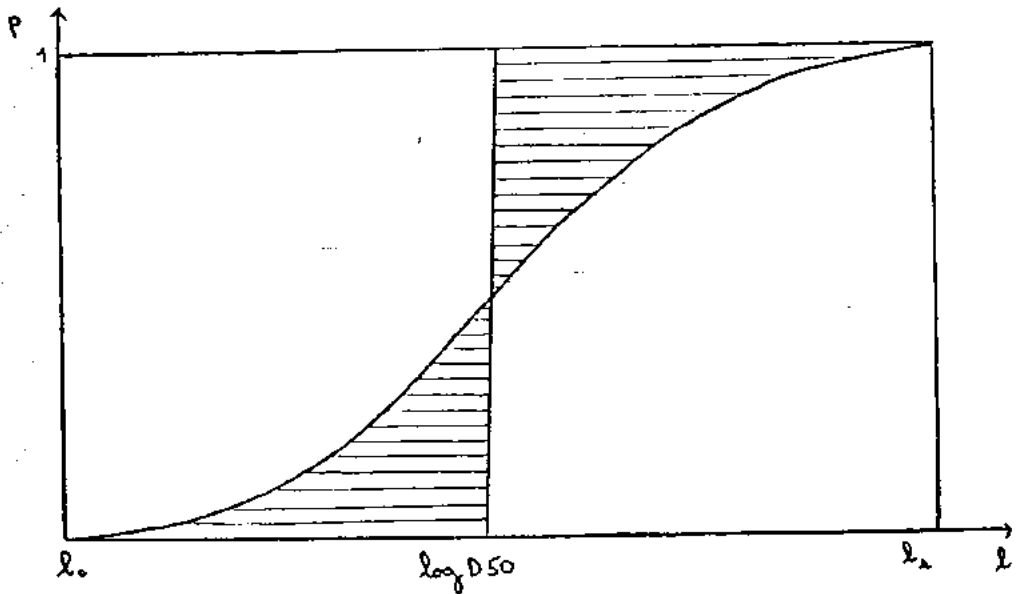


Figure 17

Courbe dose-réponse dans le cas où la distribution est symétrique.

l_0 est une dose correspondant à une probabilité de réponse pratiquement nul et l_x est une dose pour laquelle la probabilité de réponse peut être considérée comme égale à 1.

L'intégrale précédente est égale à l'aire de la portion de plan située sous la courbe. En faisant le changement de variable $p = F(l)$ on obtient :

$\log D 50 \% = \int_0^{l_r} l \, dp$ ce qui représente l'aire de la surface située au-dessus de la courbe (voir figure 17) ; c'est aussi la moyenne de la distribution.

$\log D 50 \%$ est la valeur telle que les deux surfaces hachurées soient égales ; de ce fait, la surface du rectangle délimité par $\log D 50 \%$ et l_r est approximativement égale à la surface se trouvant au-dessous de la courbe :

$$l_r - \log D 50 \% = \int_{l_0}^{l_r} p \, dl$$

$$\text{d'où } \log D 50 \% = l_r - \int_{l_0}^{l_r} p \, dl$$

Une valeur approchée de cette dernière intégrale est donnée par la méthode des trapèzes comme le montre la figure 18.

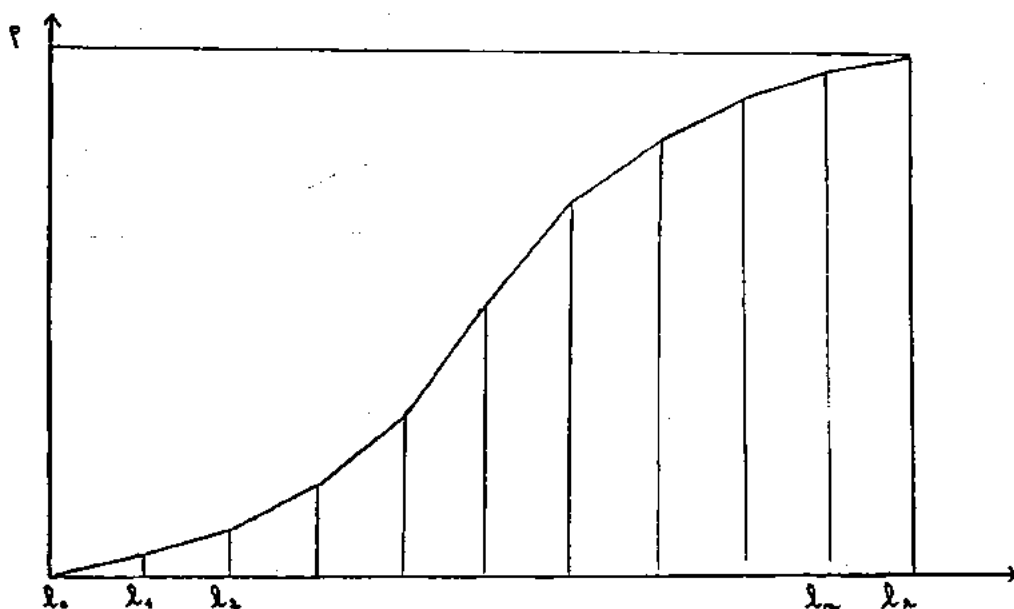


Figure 18

La méthode des trapèzes.

$\int_{l_0}^{l_r} p \, dl$ est remplacée par la somme des aires des trapèzes délimités par les valeurs l_0, l_1, \dots, l_r

$$(1) \log D 50 \% \approx l_r - \frac{1}{2} \left[(p_0 + p_1)(l_1 - l_0) + (p_1 + p_2)(l_2 - l_1) + \dots + (p_{n-1} + p_n)(l_r - l_{n-1}) \right]$$

Ce qui donne, en remplaçant p_0 par 0, p_r par 1 et en notant d la différence entre les logarithmes de deux doses consécutives (le rapport de dilution est supposé constant)

$$\log D 50 \% = l_r + \frac{1}{2} d - d \sum_{i=0}^r p_i$$

Une estimation de $\log D 50 \%$ est obtenue en remplaçant les probabilités par les fréquences observées h_0, h_1, \dots, h_r d'où finalement :

$$\log D 50 \% = l_r + \frac{1}{2} d - d \sum_{i=0}^r h_i$$

Estimation de l'écart-type de la distribution de $\log D 50 \%$

En ordonnant les termes p_0, p_1, \dots, p_r dans la relation (1) il vient :

$$\log D 50 \% = \frac{1}{2} (l_n + l_r) - \frac{1}{2} \left[p_1(l_2 - l_0) + p_2(l_3 - l_1) + \dots + p_n(l_r - l_{n-1}) \right]$$

et en remplaçant les probabilités par les fréquences observées :

$$\log D 50 \% = \frac{1}{2} (l_n + l_r) - \frac{1}{2} \left[h_1(l_2 - l_0) + h_2(l_3 - l_1) + \dots + h_n(l_r - l_{n-1}) \right]$$

Cette variable aléatoire, dont la moyenne est la dose 50 %, est la somme d'un terme constant et de n autres termes indépendants.

Sa variance σ^2 est égale à la somme $\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots + \sigma_n^2$ où σ_i est l'écart-type de $-\frac{1}{2} h_i (l_{i+1} - l_{i-1})$

$$\sigma_i^2 = \frac{p_i(1-p_i)}{4 N_i} (l_{i+1} - l_{i-1})^2, \quad N_i \text{ est le nombre d'essais à la dilution } l_i$$

Les probabilités p_i étant estimées par les fréquences observées h_i , N_i étant remplacé par $N_i - 1$ (ceci afin d'obtenir un estimateur non biaisé) et en tenant compte du fait que $l_{i+1} - l_{i-1} = 2d$,

on a une estimation de la variance par :

$$d^2 \sum_{i=1}^m \frac{h_i(1-h_i)}{N_i-1}$$

BIBLIOGRAPHIE

=====

- 1) COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE, 1978.- "Statistique appliquée à l'exploitation des mesures". Paris, Masson édit., Tome 1, pp. 79-82
- 2) DOUGHERTY R.M., 1964.- "Animal virus titration techniques" in "Techniques in experimental virology". Londres, RC Harris éditeur, Academic Press Publishers, pp. 169-223
- 3) FISHER R.A., 1922.- Cité par WYSHAK G. and DETRE K. (16)
- 4) HALDANE J.B.S., 1939.- "Sampling errors in the determination of bacterial or virus density by the dilution method". Cambridge, J. Hyg., 39, pp. 289-290
- 5) LURIA H., 1953.- Cité par DOUGHERTY R.M. (2)
- 6) (de) MAN J.C., 1977.- "MPN tables for more than one test". Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 4, pp. 307-316
- 7) MAUGRAS M., 1980.- "Les techniques de dosage en virologie". Cours de formation continue. Université de Nancy I
- 8) MEYNELL G.G. and MEYNELL E., 1970.- "Theory and practice in experimental bacteriology". 2nd Edition. Cambridge, University Press Publishers
- 9) PARNOW J., 1952.- "Computer program estimates bacterial densities by means of the MPN". Food Technology, 7, pp. 56-62
- 10) PIZZI M., 1950.- Cité par DOUGHERTY R.M. (2)
- 11) SPIEGEL M.R., 1978.- "Théorie et applications de la statistique". Paris, Mc Graw Hill

- 12) THOMAS H.A. Jr., 1955.- "Stream pollution : statistical analysis of coliform data". *Serv. Ind. Wastes*, 27, pp. 212-222
- 13) THOMAS H.A. Jr. and WOODWARD R.L., 1955.- "Estimation of coliform density by the membrane filter and the fermentation tube methods". *J. Publ. Health*, 45, pp. 1 431- 1 437
- 14) VAN DER WAERDEN B.L., 1967.- "Statistique mathématique". Paris, éditeurs DUNOD
- 15) VELZ J.C., 1970.- "Applied stream sanitation". New York, Wiley Interscience Publishers
- 16) WYSHAK G. and DETRE K., 1972.- "Estimating the number of organisms in quantitative assays." *Appl. Microbiol.*, 4, pp. 784-790