

ESTIMATION DE LA FIDELITE DES METHODES DE REFERENCE POUR LA NUMERATION DES GERMES ET DES COLIFORMES A 30°C DANS LE LAIT CRU

Le regroupement des résultats de deux années d'essais interlaboratoires trimestriels organisés par CECALAIT et portant sur les méthodes de référence des numérations des germes totaux et des coliformes à 30°C a permis d'estimer des valeurs de répétabilité et de reproductibilité pour ces deux méthodes. Elles ont été comparées aux indications, relativement peu nombreuses, de la littérature. En ce qui concerne les germes à 30°C, les valeurs obtenues pour S_r et S_R apparaissent assez voisines. Elles diffèrent, en revanche pour les coliformes. Ces nouveaux résultats pourraient fournir des éléments d'information propres à compléter les textes actuels en ce qui concerne la précision des méthodes.

Les circuits d'intercomparaison de laboratoires portant sur la numération des germes à 30°C et des coliformes à 30°C dans le lait cru sont encore en nombre limité (moins d'une dizaine en Europe), et concernent généralement des laits en poudre. Aussi dispose-t-on de peu d'indications sur la fidélité des méthodes mises en oeuvre, dans les conditions d'analyse réelle du lait liquide, y compris dans les normes. Depuis 1992, CECALAIT organise de manière régulière des essais interlaboratoires dans ce domaine, avec une participation importante de laboratoires qui utilisent les méthodes de référence. Il est apparu intéressant d'extraire de cette importante masse de résultats les données spécifiques à ces méthodes et d'en déduire leurs caractéristiques de fidélité.

Des données manquantes sur la précision

Les méthodes de référence pour la numération des germes et des coliformes à 30°C sont respectivement les normes FIL 100B:1991 et 73A:1985. Elles consistent à ensemercer en profondeur un milieu de culture défini, respectivement PCA, avec addition de lait écrémé, et VRBL, coulé dans des boîtes de Petri. Après incubation à 30°C pendant, respectivement 72 et 24h, puis comptage des colonies, le nombre initial de germes ou de coliformes est calculé grâce aux formules de calcul données dans les normes.

Aucun de ces textes ne fournit cependant de données sur la répétabilité et la reproductibilité, faute d'études suffisantes faites sur la question. Or les essais interlaboratoires organisés trimestriellement depuis 1992 par CECALAIT permettent maintenant de grouper un grand nombre de résultats et d'estimer ces caractéristiques.

LES CHAINES INTERLABORATOIRES DE CECALAIT

Huit essais, organisés entre 1993 et 1995, ont été repris ici pour estimer les valeurs de répétabilité et de reproductibilité. Chaque essai comprend une gamme de 10 échantillons de lait cru, additionnés de conservateur, qui empêche tout développement de la flore initiale, mais perd son effet à la dilution. La flore initiale est répartie sur une plage allant de 10 à 100 000 coliformes/ml et de 10 000 à 500 000 germes/ml. Le jour où ils sont préparés, les échantillons sont envoyés par Chronopost en boîtes isothermes à 4°C. Ils arrivent dans les laboratoires participants le lendemain et subissent une ou deux analyses par échantillon, le même jour.

Lorsqu'une analyse est faite en double, les prises d'essai proviennent d'un même flacon. Il ne s'agit donc **pas d'analyses en double aveugle**, ce qui est réputé conduire à une certaine sous-estimation de la répétabilité, d'où peut découler une surestimation de la variance entre laboratoires.

A partir des résultats renvoyés par les participants, CECALAIT procède alors à des traitements statistiques pour déterminer la répétabilité, ainsi que la justesse à partir de la moyenne des doubles.

SELECTION DES LABORATOIRES ET DES RESULTATS

Dans les essais interlaboratoires organisés par CECALAIT, la méthode d'analyse utilisée est laissée au libre choix des laboratoires participants. Le cadre particulier de cette étude imposait de ne retenir que ceux qui avaient utilisé les méthodes normalisées. Les laboratoires qui avaient travaillé avec une méthode alternative ou qui avaient utilisé un milieu autre n'ont donc pas été sélectionnés ici, à l'exception, toutefois, des laboratoires ayant utilisé le milieu PCA sans adjonction de lait écrémé.

En outre, pour limiter les causes de variation, seuls ont été retenus les laboratoires ayant procédé aux analyses le lendemain de la préparation, dès réception des échantillons.

Comme dans tout traitement de chaîne d'analyses, il est nécessaire d'identifier et d'exclure des calculs les valeurs jugées aberrantes, au moyen des tests de Cochran, sur les écarts entre doubles, et de Grubbs sur les moyennes des doubles. Ces tests sont généralement pratiqués au seuil de 5% pour des essais où cohabitent différentes méthodes. Le but est alors d'identifier des taux susceptibles de nuire à la bonne estimation des valeurs de référence, non d'aboutir à une juste estimation des dispersions des résultats. En revanche, dans le cadre de l'évaluation d'une méthode, ces tests sont réalisés au seuil de 1%, avec pour but d'éliminer uniquement les résultats vraiment aberrants, non liés à la méthode, et d'en estimer les valeurs de fidélité le plus justement possible.

RESULTATS

Les résultats sont détaillés dans les deux tableaux ci-dessous. Ils ont été déterminés en fonction du niveau de contamination des échantillons, puis tous niveaux confondus.

GERMES A 30°C

TAUX MOYENS	REPETABILITE			REPRODUCTIBILITE		
	Sr en log	r en log	Nb de doubles	SR en log	R en log	Nb de valeurs
1000 à 50000 / ml	0,0673	0,190	483	0,206	0,582	759
50000 à 100000 / ml	0,0597	0,169	283	0,165	0,468	448
100000 à 500000 / ml	0,0664	0,188	494	0,164	0,463	783
Tous niveaux confondus	0,0653	0,185	1260	0,181	0,513	1990

COLIFORMES A 30°C

TAUX MOYENS	REPETABILITE			REPRODUCTIBILITE		
	Sr en log	r en log	Nb de doubles	SR en log	R en log	Nb de valeurs
10 à 1000 / ml	0,0599	0,169	445	0,162	0,457	677
1000 à 10000 / ml	0,0585	0,165	288	0,120	0,340	424
10000 à 100000 / ml	0,0732	0,207	307	0,188	0,532	459
Tous niveaux confondus	0,0637	0,180	1040	0,160	0,453	1560

Des résultats assez surprenants pour les coliformes !

Pour les germes et les coliformes à 30°C, les valeurs Sr et SR les plus satisfaisantes sont obtenues pour des taux de contamination moyens (de 50 000 à 100 000 germes/ml).

Pour les germes à 30°C, comme pour les coliformes, ces valeurs sont en légère augmentation aux taux de contamination élevés. Cette observation, plutôt classique en microbiologie est généralement attribuée aux incertitudes des dilutions successives.

Ces valeurs paraissent, de même plus élevées aux taux de contamination faibles. Il s'agit là également d'une constatation habituelle en microbiologie, liée aux incertitudes de répartition d'un faible nombre de colonies.

La comparaison des résultats obtenus pour les coliformes et pour les germes à 30°C est, en revanche, plus surprenante. En effet, sauf aux taux de contamination élevés, les valeurs Sr et SR semblent légèrement plus faibles pour les coliformes que pour les germes à 30°C. En règle générale, c'est le contraire qui est observé dans la littérature.

En conséquence, pour les coliformes les valeurs Sr et SR observées ici : $Sr = 0,0637$ et $SR = 0,160$, tous niveaux confondus, sont beaucoup plus faibles que les valeurs trouvées dans les diverses sources bibliographiques et travaux antérieurs sur le sujet :

$Sr = 0,20$ et $SR = 0,35$

En revanche, les résultats obtenus pour la numération des germes à 30°C correspondent assez bien aux études

antérieures notamment pour la répétabilité, avec la valeur « synthèse de la littérature » :

$Sr = 0,08$.

La reproductibilité observée dans nos résultats est, en revanche, plus forte ($SR = 0,181$, tous niveaux confondus) si l'on considère la valeur « synthèse » extraite de la littérature : $SR = 0,12$.

Rappelons que pour les chaînes d'analyse de CECALAIT, les valeurs limites de répétabilité, puis de justesse, ont été déterminées en fonction des indications de la littérature ou par reprise des valeurs admises, par exemple dans les chaînes d'analyses des laboratoires interprofessionnels pour la numération des germes à 30°C (cf fascicule ci-joint).

Pour le traitement des chaînes d'analyses, les limites de répétabilité fixées apparaissent donc correctement choisies par rapport aux possibilités de la méthode, pour les germes à 30°C. Elles apparaissent, en revanche, élevées pour les coliformes et pouvant limiter l'efficacité dans la détection des problèmes analytiques. Pour la justesse - où interviennent les valeurs de Sr et de SR - les limites sont correctes pour les coliformes mais pourraient apparaître un peu sévères pour les germes à 30°C.

Dans ce dernier cas, toutefois, les limites fixées relèvent d'un objectif de qualité interprofessionnel, de nature technico-économique. Cet objectif est atteint dans la plupart des chaînes d'analyse interprofessionnelle pour les niveaux requis et peut être également un objectif pour les autres laboratoires.

Un complément d'information sur la précision !

Les valeurs de fidélité obtenues à partir des essais interlaboratoires de CECALAIT sur la numération des germes à 30°C et des coliformes dans le lait cru sont globalement conformes à la littérature pour les germes à 30°C, mais s'en distinguent pour les coliformes.

Ces résultats qui seraient à compléter au fil des mois à venir peuvent contribuer à définir des objectifs de qualité adaptés et raisonnables pour les laboratoires de microbiologie laitière. Ils devraient permettre de combler les lacunes des textes normatifs actuels, en matière de précision et de proposer des valeurs de fidélité représentatives de la pratique effective des méthodes dans le secteur laitier.