

ESTIMATION DE LA FIDELITE DES METHODES DE NUMERATION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Les méthodes normalisées récentes de dénombrement de *Staphylococcus aureus* proposent deux techniques. L'une est un dénombrement par étalement sur milieu de Baird Parker suivi d'une confirmation des colonies par le test de la coagulase; l'autre regroupe ces deux étapes grâce à un ensemencement dans la masse du milieu Baird Parker, supplémenté de plasma de lapin et de fibrinogène (RPF). L'utilisation des résultats obtenus au cours de plusieurs campagnes d'essais interlaboratoires CECALAIT permet d'estimer les valeurs de fidélité des deux méthodes. Ces valeurs sont plus fortes pour la méthode avec confirmation que pour la méthode RPF. Ces conclusions apparaissent cependant moins liées aux caractéristiques intrinsèques de chaque méthode qu'à des « allègements » systématiques des protocoles expérimentaux décrits dans les normes, pour la méthode avec confirmation. Ses caractéristiques de fidélité en souffrent inévitablement. Dans le même temps, la méthode RPF, d'une pratique plus aisée, est suivie plus scrupuleusement. Ainsi, l'une des deux méthodes se retrouve systématiquement défavorisée par rapport à l'autre.

S*taphylococcus aureus* est un germe indicateur de défaut d'hygiène dont la teneur ne doit pas dépasser la valeur seuil de 500/ml dans le lait cru, destiné à des fabrications sans étape de thermisation. Les méthodes normalisées les plus récentes de comptage des colonies coagulase positives (FIL 145:1990 et AFNOR V 08-057, 1 & 2 de 1994) proposent deux techniques de dénombrement : l'une en une seule étape sans confirmation de colonies, l'autre fractionnée en deux étapes, avec confirmation. La méthode en une seule étape est d'utilisation relativement récente; mais les laboratoires sont de plus en plus nombreux à la pratiquer. Il semble donc opportun de comparer les caractéristiques de fidélité de ces deux méthodes. Or, depuis 1993, les essais interlaboratoires de CECALAIT comprennent la numération des staphylocoques. Nous disposons donc d'un ensemble de résultats suffisamment conséquent pour pouvoir estimer de façon fiable la répétabilité et la reproductibilité des deux méthodes.

RAPPEL DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les essais interlaboratoires de CECALAIT comportent une gamme de 5 échantillons de lait cru additionnés de conservateur, avec des teneurs en staphylocoques allant de 0 à 10000/ml. Les échantillons sont envoyés le jour de leur préparation en boîte isotherme à 4°C. Ils arrivent à destination le lendemain et doivent être analysés le jour même. Les résultats servent à estimer la répétabilité -quoique les doubles ne soient pas analysés en aveugle- et la justesse.

Pour pouvoir mener cette étude sur les caractéristiques de fidélité des deux techniques normalisées, il nous a fallu procéder à une sélection supplémentaire d'après les renseignements obtenus dans les feuilles de résultats. Seuls ont donc été retenus les résultats provenant de laboratoires :

- ★ ayant pratiqué l'analyse le lendemain de la préparation des échantillons,
- ★ ayant utilisé, même approximativement, l'une des deux techniques décrites dans la norme FIL 145:1990, à savoir schématiquement :

♦ un dénombrement après étalement sur milieu de Baird Parker, puis une confirmation des colonies présumées de *Staphylococcus aureus* par le test de la coagulase (elles doivent avoir une activité coagulase +);

♦ un dénombrement direct par ensemencement dans la masse de milieu Baird Parker, additionné de supplément RPF (plasma de lapin et fibrinogène). En effet, ce supplément RPF permet la détection visuelle directe des colonies ayant une activité coagulase +, il n'est plus nécessaire alors de pratiquer un test de confirmation.

Les tests de Cochran (1%) et de Grubbs (1%) ont permis d'éliminer les valeurs anormales (hors population).

RESULTATS

TABLEAU 1	BAIRD PARKER + COAGULASE (7 essais interlaboratoires)				BAIRD PARKER + RPF (6 essais interlaboratoires)			
	REPETABILITE		REPRODUCTIBILITE		REPETABILITE		REPRODUCTIBILITE	
	S _r en log	nbre de doubles	S _R en log	nbre de valeurs	S _r en log	nbre de doubles	S _R en log	nbre de valeurs
100 à 1000/ml	0,221	89	0,458	135	0,065	123	0,155	171
1000 à 10 000/ml	0,158	154	0,36	240	0,066	122	0,149	159
100 à 10 000/ml	0,183	243	0,398	375	0,066	245	0,152	330

Le tableau 1 ci-dessus regroupe l'ensemble des résultats obtenus selon les deux techniques

Les résultats de répétabilité et de reproductibilité apparaissent beaucoup plus élevés dans la méthode avec confirmation que dans la méthode RPF. Ce constat doit cependant être nuancé. En effet, les protocoles expérimentaux généralement utilisés dans les laboratoires peuvent parfois s'éloigner notablement des prescriptions de la norme.

Ainsi dans la méthode avec confirmation, la norme préconise :

- ★ d'étaler 1 ml de chaque dilution sur deux boîtes de 140 mm de diamètre, contenant du milieu Baird Parker,
- ★ de sélectionner ensuite sur chaque boîte, 5 colonies de chaque type observé, c'est à dire 5 colonies typiques et/ou atypiques, pour confirmation par le test de la coagulase.

Ce protocole se révèle lourd et long dans la pratique. C'est pourquoi, les déviations observées sont nombreuses. On constate ainsi que souvent 0,1 ml de chaque dilution est étalé et que le nombre de confirmations peut-être inférieur à 5 par type de colonies. Ces habitudes permettent certes de rendre la méthode plus rapide, mais aboutissent inévitablement à en diminuer la fidélité. Elle est donc défavorisée d'office par rapport à la méthode RPF.

C'est d'autant plus vrai qu'on constate, dans le même temps, que pour la méthode RPF, les laboratoires utilisent souvent deux boîtes par dilution, alors que la norme FIL se contente d'une seule.

Les résultats concernant la justesse des deux méthodes n'apparaissent pas ici. En fait, le calcul des moyennes des différences sur 3 essais interlaboratoires n'a pas permis d'observer de différence significative entre les deux méthodes.

BILAN ET PERSPECTIVES

Il est certain que les valeurs de répétabilité et de reproductibilité qui seraient obtenues en appliquant strictement la norme seraient différentes.

Une petite étude menée de cette façon au laboratoire CECALAIT sur 5 doubles va d'ailleurs en ce sens. Elle montre que les répétabilités des deux méthodes se rapprochent nettement, avec cependant toujours un léger avantage pour la méthode RPF. A vrai dire seule une étude de plus grande envergure, avec plus de résultats et plus de laboratoires impliqués, mais toujours en suivant scrupuleusement la norme, permettrait d'aboutir à une meilleure estimation des répétabilités des deux méthodes.

Cependant les valeurs présentées ici peuvent d'ores et déjà être utilement comparées aux limites définies jusqu'alors dans nos essais interlaboratoires. Le tableau 2 rappelle l'ensemble de ces valeurs :

TABLEAU 2

METHODE	S _r	S _r	S _R	limite \bar{d}	limite \bar{d}
---------	----------------	----------------	----------------	------------------	------------------

		chaîne		calculée	chaîne
BP + COAGULASE	0,183	0,25	0,398	± 0,71	± 0,4
RPF	0,066		0,152	± 0,27	

La limite S_r proposée jusqu'alors apparaît donc très favorable aux laboratoires, en particulier avec la méthode RPF. En revanche, si la limite de \bar{d} , adoptée dans les chaînes, apparaît bien ajustée pour les laboratoires pratiquant la méthode RPF, elle peut sembler un peu sévère pour ceux qui utilisent la méthode avec confirmation, dans l'état de leur pratique actuelle. Néanmoins la limite de \bar{d} (± 0,4 log) reste un objectif raisonnable pour une méthode avec confirmation menée en bonne conformité à la norme.

(par P. Rollier)

