

Congrès de l' A.D.L.F.
05 juin 2009, Tours

Analyse bactériologique du lait maternel :
ensemencement par méthode manuelle
versus méthode spirale automatisée

Dr. Stéphane PICARD, Lactarium de Marmande

Introduction

- **Qualification biologique des dons de lait**
 - **Sous-Lots**
 - numération Flore totale aérobie : G.S. + incubation 24h à 37°C
⇒ seuil de non-conformité : $\geq 10^6$ bact./ml
 - lait non-conforme : détruit + reprise de contact avec la donneuse
 - **Lots avant pasteurisation**
 - numération Staph. aureus : Chapman + incubation 48h à 37°C
⇒ seuil de non-conformité : $\geq 10^4$ bact./ml
 - numération Flore totale aérobie : G.S. + incubation 48h à 37°C
⇒ seuil de non-conformité : $\geq 10^6$ bact./ml
- **Contrôles biologiques après pasteurisation**
 - 0,5 ml de lait :ensemencé sur G.S. incubée 48h à 37°C
 - Tout résultat positif ⇒ destruction du lot de lait

Introduction

- **Méthode d'ensemencement : choix & variabilité**
 - **J.O. du 05 janvier 2008, Chap. VI – 2 – A**
Qualification biologique des dons de lait : Analyses bactériologiques
Analyses à effectuer sur les sous-lots et les lots
 - **Dilution du lait**
 - en fonction méthode d'ensemencement choisie par le biologiste
 - de manière à détecter les seuils de non-conformité définis
 - d'où :
 - ⇒ possible variabilité des méthodes d'ensemencement + lecture
 - ⇒ absence actuelle de standardisation & d'harmonisation
- **Objectif principal de l'étude**
 - Comparer ensemencement G.S. + lecture Flore totale
 - Méthodes manuelles **vs.** spirale automatisée (WASP)

Matériels et méthodes

- **Echantillons : sous-lots & lots (avril - mai 2009)**
- **Numération : flore totale aérobie**
- **Ensemencement Manuel : oese stérile calibrée 10 µl**
 - **sous-lot** : lait pur (non-dilué) $\Rightarrow$ 10 µl sur G.S. classique
lecture : abaques visuels de quantification des germes [$10^4 - 10^6$]
 - **lots** : lait dilué au 1/100° $\Rightarrow$ 10 µl sur G.S. classique
lecture : comptage visuel des UFC pour quantification [$10^4 - 10^6$]
- **Ensemencement Spiral Automatisé : WASP 2**
 - **sous-lot** : lait pur (non-dilué) $\Rightarrow$ 52,5 µl sur G.S. spéciale Φ 15 cm
 - **lots** : lait pur (non-dilué) $\Rightarrow$ 52,5 µl sur G.S. spéciale Φ 15 cm
 - lecture : standardisée avec disque + tables de comptage
(lecture automatisable...) [$1.9 \times 10^2 - 3.9 \times 10^6$]

Matériels et méthodes

- **Incubation des G.S. avant lecture des résultats**
 - 24h pour les sous-lots
 - 48h pour les lots
- **Analyse statistique (univariée)**
 - **Variables qualitatives**
 - conformité / non-conformité (du lait humain)
 - comparaison pourcentages : tendances selon la méthode
 - Excel® – Laboratoire Biologie Médicale, Lactarium de Marmande
 - **Variables quantitatives**
 - nombre de bactéries / ml (de lait humain)
 - comparaison moyennes (variances), médianes et dispersion
 - NCSS® – Le Cèdre, Réseau CIC pédiatrique, C.H.U. Bordeaux

Focus : Méthode Spirale Automatisée

(AES-Chemunex)

- **Ensemenceur Spiral WASP 2 + tables de comptage**
- **Présentation technique**
 - Automatisation ensemencement $\pm$ lecture
 - Méthode standardisée + normalisée
 - Réf. AFNOR : NF V 08-100 (2001) ; ISO 7218 (2007)
 - Cycle d'ensemencement contrôlé / microprocesseur
 - prélèvement (présentation automatique ou manuelle)
 - ensemencement spiral
 - désinfection
 - rinçages
 - Utilisable sous hotte à flux laminaire vertical

WASP : enseigneur spiral



WASP : enseigneur spiral



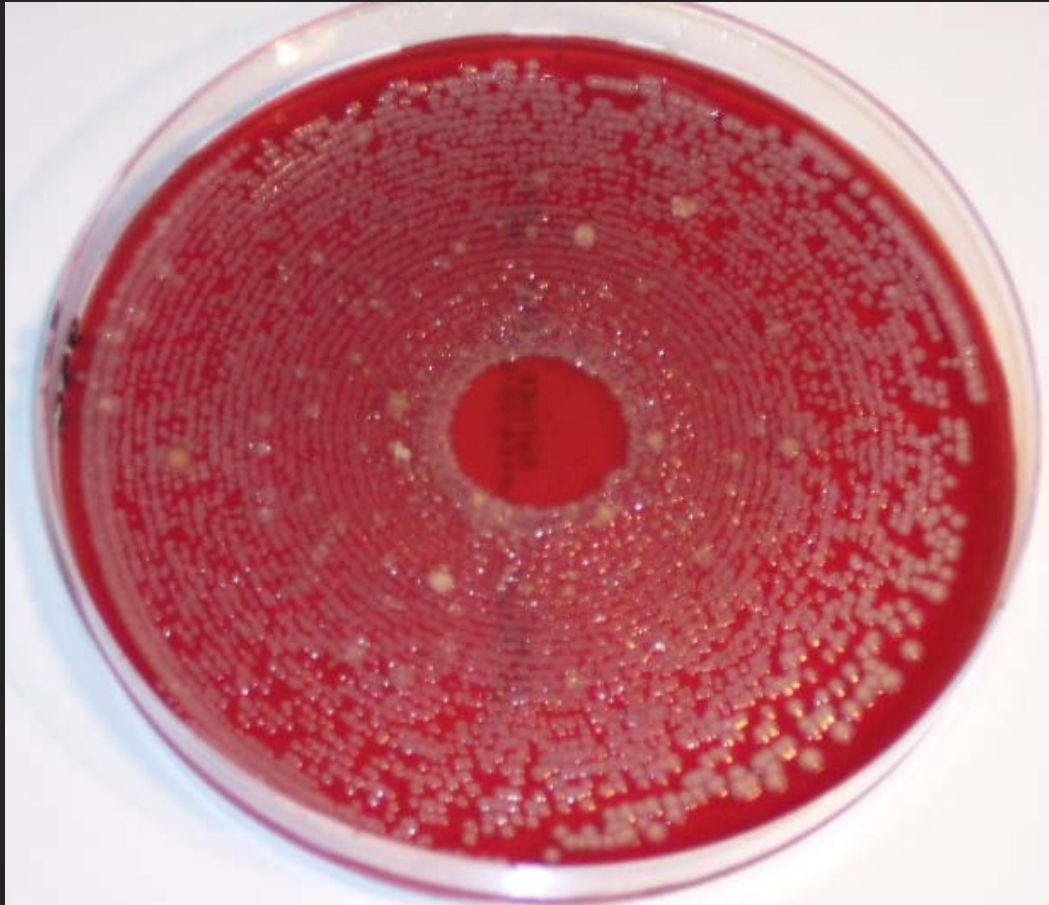
WASP : enseigneur spiral



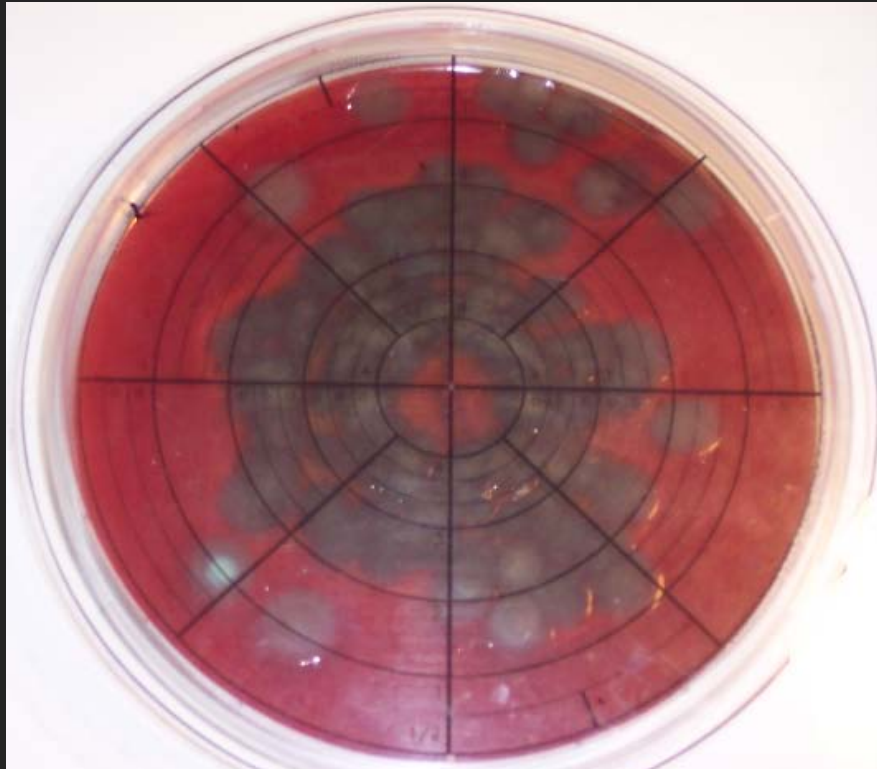
Culture après ensemencement spiral



Culture après ensemencement spiral



Culture après ensemencement spiral



Résultats

- **Effectifs de l'étude**

- Sous-lots : 151 échantillons de lait
- Lots : 98 échantillons de lait (non liés au sous-lots de l'étude)

- **Comparaison : aspect qualitatif**

- Comparaison du niveau de non-conformité (N.C.) en fonction de la méthode utilisée :
ensemencement manuel **vs.** automatisé
- Tendance observée :
les mesures obtenues après ensemencement manuel majorent les non-conformités par rapport à celles obtenues après ensemencement spiral automatisé

Aspect qualitatif de la comparaison

**Analyse
bactério.**

(Lait)

**Sous – Lots
(N=151)**

conformes

N.C.

**Lots
(N=98)**

conformes

N.C.

Manuel

143

**8
(5%)**

85

**13
(13%)**

Spiral (WASP)

145

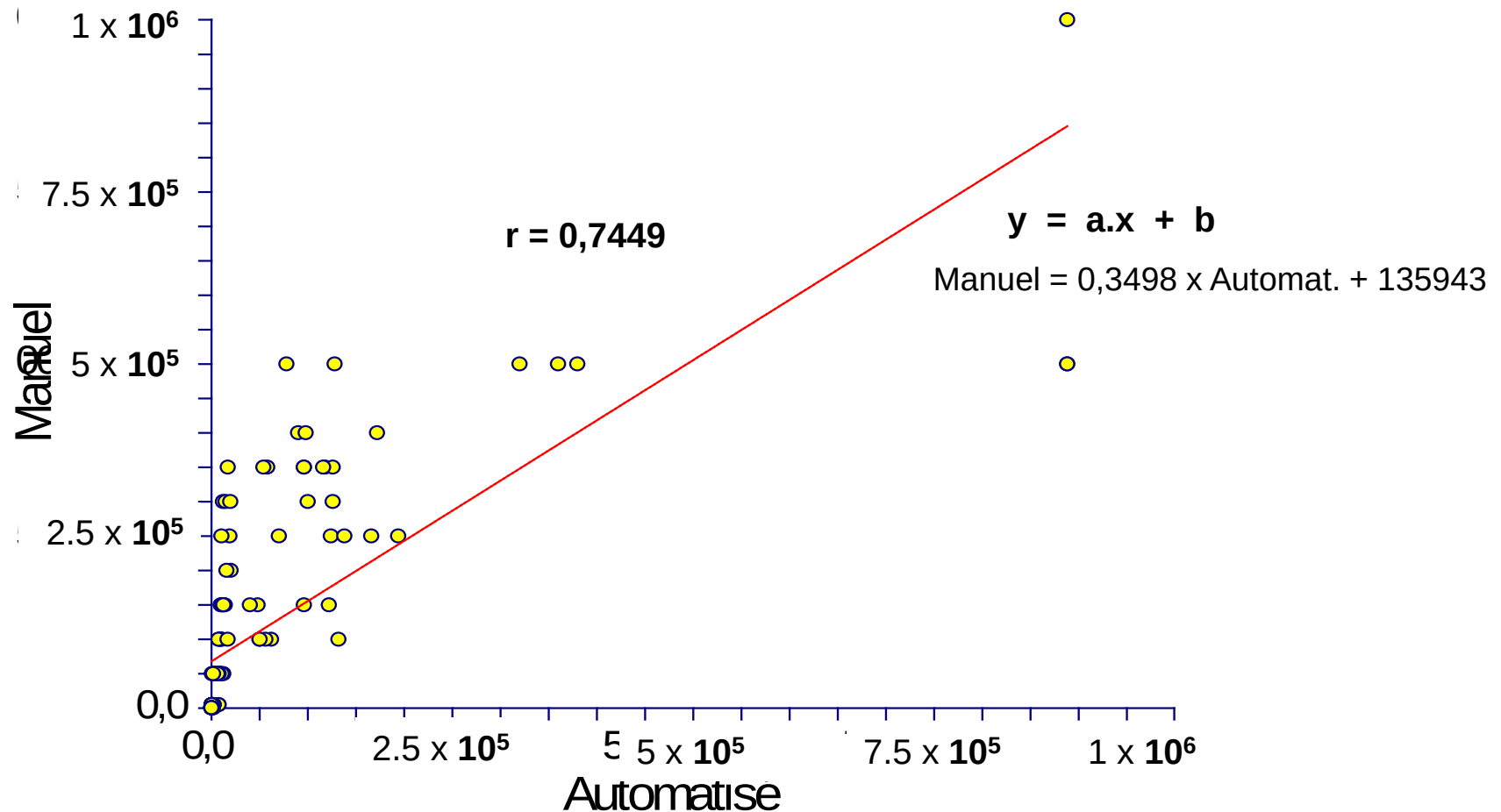
**6
(4%)**

86

**12
(12%)**

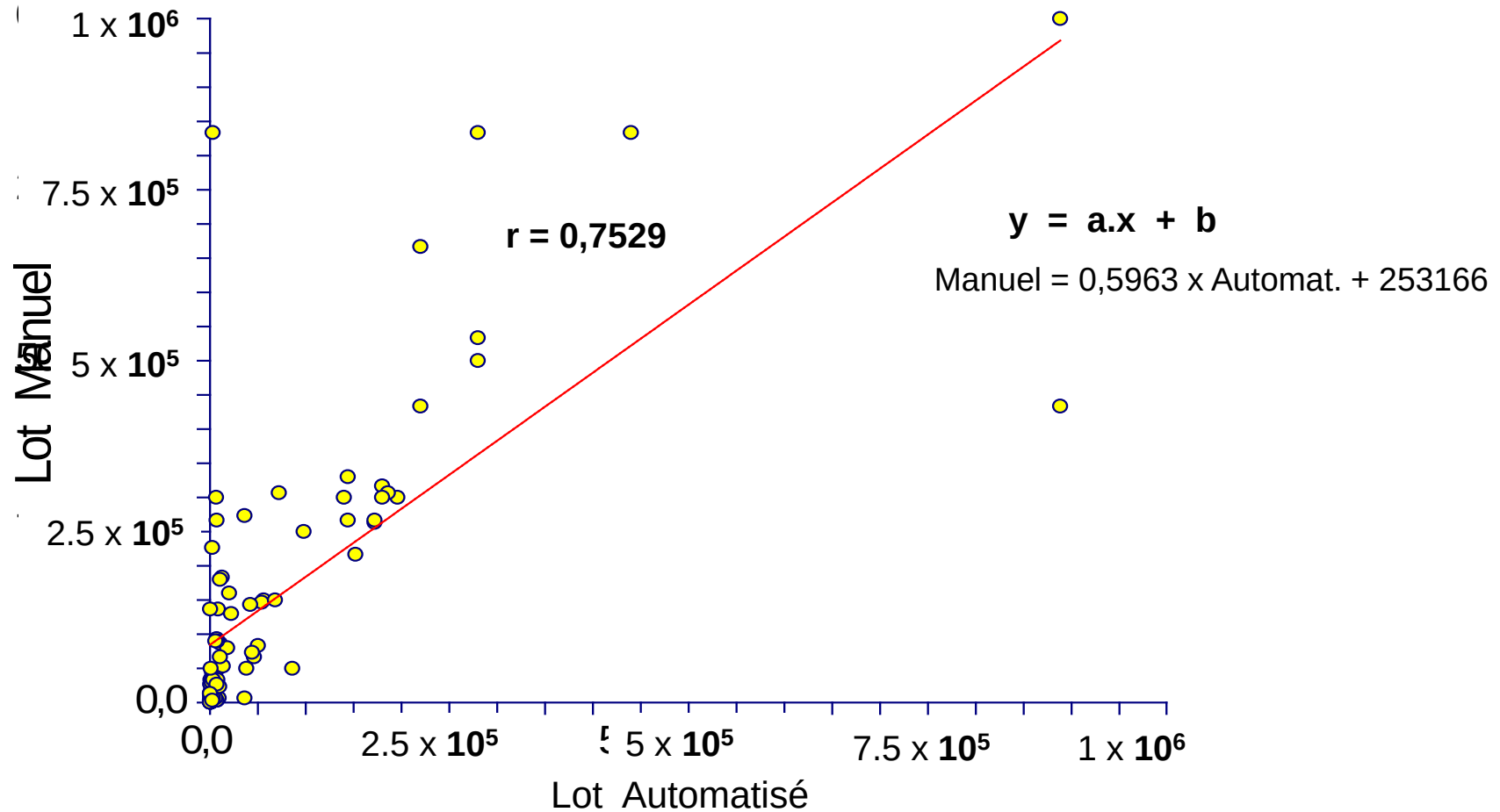
Régression linéaire : sous-lots

Manuel vs Automatisé



Régression linéaire : lots

Lo Manuel vs Automatisé



Résultats

- **Comparaison : aspect quantitatif**

- **Médianes**

- Sous-Lots : 10^5 bact / ml (manuel) vs. 2×10^4 bact / ml (WASP)
 - Lots : 2×10^5 bact / ml (manuel) vs. 4×10^4 bact / ml (WASP)

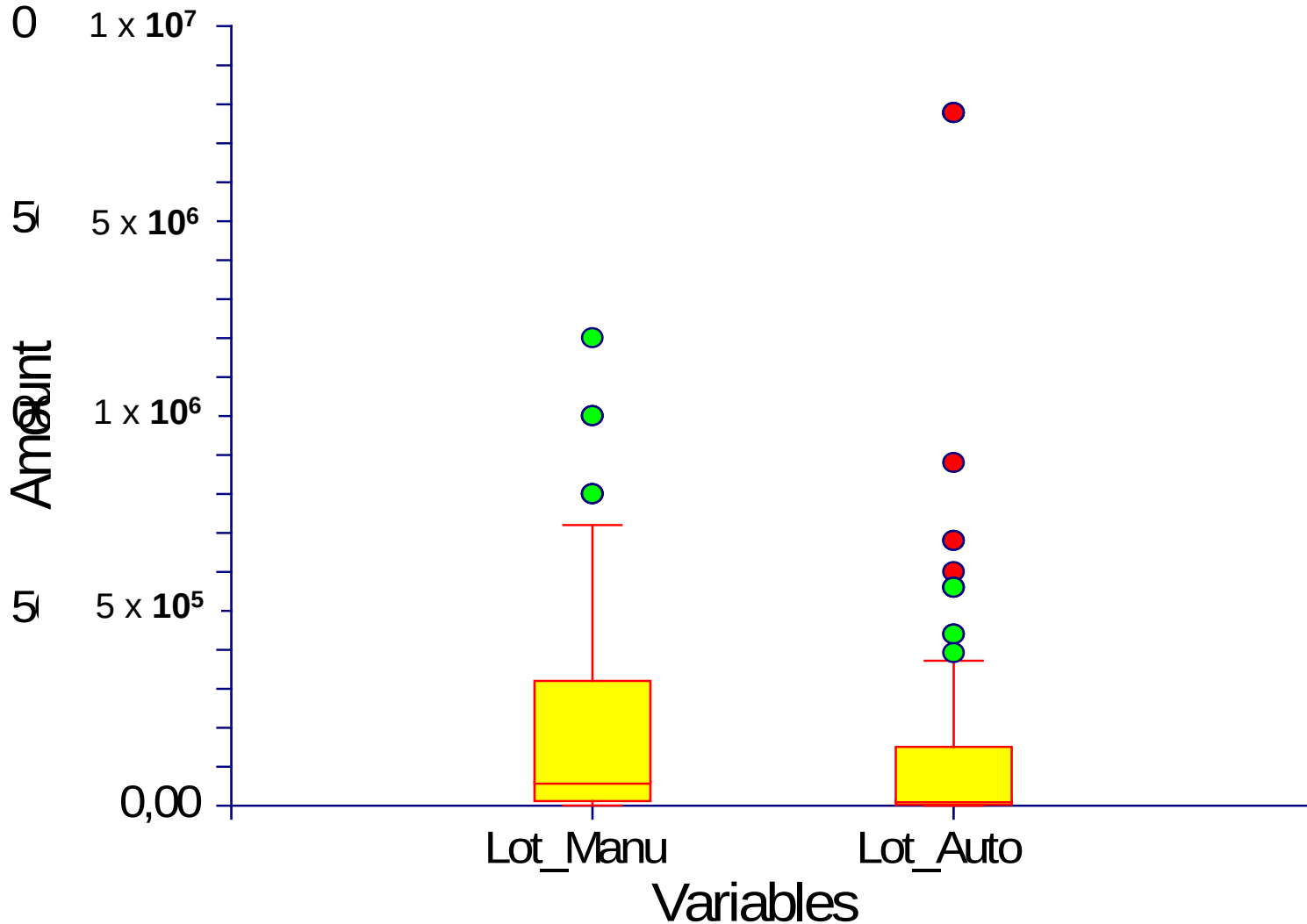
- **Moyennes**

- variances étudiées pour les 2 méthodes : mesures répétées
 - effectifs > 30 , mais distribution ne suit pas une loi normale
 - Test de Wilcoxon = équivalent non paramétrique du t-Test Student
 - **$P < 0,05$** $\Rightarrow$ rejet H_0 (pas de $\neq$ stat signif.)
 - $\Rightarrow$ les mesures – numération bactéries – obtenues avec le système manuel sont majorées de façon statistiquement significative par rapport à celles obtenues avec le système spiral automatisé

- **Fidélité (intra & inter) LOG10 [val] : C.V. $< 7\%$**

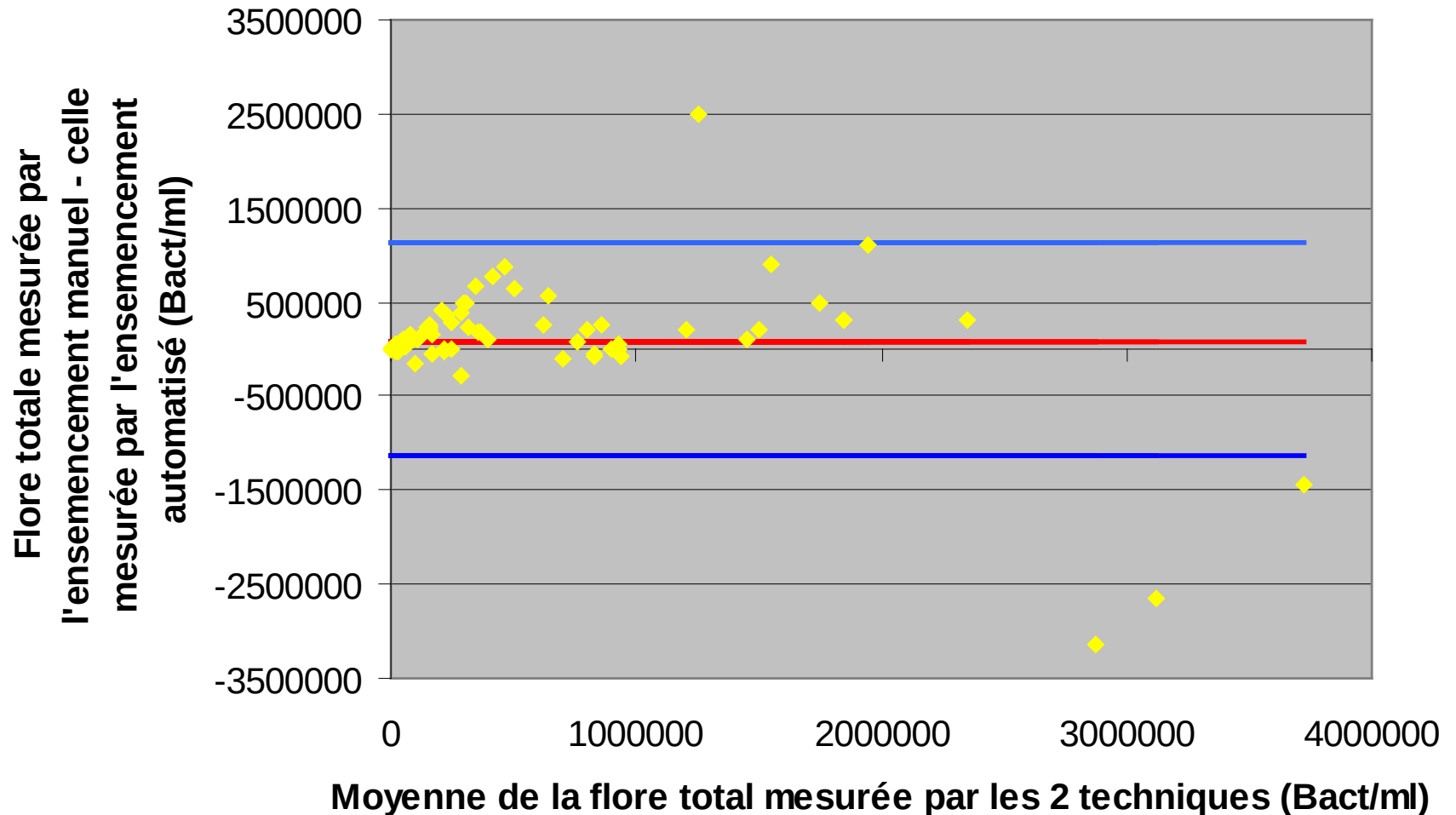
Dispersion des valeurs autour de la médiane

Box Plot



Comparaison / valeurs vraies estimées (moy.)

Représentation graphique de Bland et Altman - Lots



Discussion

- **Le WASP en pratique : avantages & limites**

- **utilisation technique**

- réglage volume de prélèvement & aspiration : simple, précis
- présentation manuelle échantillon : un peu lourd
- ensemencement spiral : reproductible, standardisé, robuste
- temps de séchage des géloses : un peu long

- **impact sur lecture/numération des cultures**

- lecture standardisée : optimisation de l'objectivité des mesures
- système de lecture simple, mais un peu long en visuel
- pas de lecteur automatique à 10^6
- limites de quantification : répartition colonies {
 - parfois hétérogène
 - colonies confluentes

- **Intérêt technique global du WASP : ++**

Conclusion

- **Comparaison méthodes manuelle vs. automate**

- **numération de la flore totale aérobie**

- numérations bactéries obtenues avec système manuel sont majorées par rapport à celles obtenues avec le système spiral automatisé

- **conformité / non-conformité**

- mesures obtenues après ensemencement manuel ont tendance à majorer les N.C. par rapport à l'ensemencement spiral automatisé

- **Impact au laboratoire du lactarium**

- **sécurité confirmée / méthodes manuelles actuelles**

- rejets pour N.C. légèrement majorés $\Rightarrow$ productivité $\ominus$

- $\Rightarrow$ mais assure qualité & sécurité du produit délivré

- **WASP : % lait rejeté ? coût moyen ? productivité $\oplus$?**