

Résultats du programme européen sur les staphylocoques

(Résumé de l'intervention de Mme DE BUYSER -AFSSA-
lors de l'Assemblée générale 2000 de CECALAIT)

Les méthodes NF EN ISO 6888-1 & -2 de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les aliments ont été évaluées, dans le cadre d'un programme européen destiné à établir, au moyen d'études collaboratives, les performances de fidélité des méthodes ISO de détection et/ou dénombrement de microorganismes pathogènes dans les aliments. Ces méthodes utilisent respectivement, le milieu gélosé de Baird-Parker (BP) et le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène (RPFA). Elles sont apparues globalement satisfaisantes et il est recommandé dorénavant de leur accorder le même statut. Les valeurs moyennes de fidélité obtenues pour le fromage sont :

- $r(\log) = 0,33$ et $R(\log) = 0,55$ pour le milieu BP
- $r(\log) = 0,18$ et $R(\log) = 0,31$ pour le milieu RPFA,

et seront prochainement incluses dans la norme par le biais d'un amendement.

Pour adopter une méthode normalisée en tant que norme Européenne, le CEN (Comité Européen de Normalisation) exige des données sur sa fidélité (répétabilité et reproductibilité) qui doivent avoir été établies par une étude collaborative, conformément à la norme ISO 5725. Fin 1996, la Commission Européenne a lancé un projet sur quatre ans, destiné à évaluer six méthodes microbiologiques horizontales ISO, portant sur la détection et / ou le dénombrement dans les aliments des microorganismes pathogènes suivants : *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* à coagulase positive, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*.

Par le passé, nous avons rendu compte des résultats obtenus à l'issue des études sur :

- le dénombrement de *Bacillus cereus* dans les aliments par la norme ISO 7932, 1993 (cf Lettre de CECALAIT n° 26),
- la détection et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* par les méthodes ISO 11290-1 et ISO 11290-2 (cf Lettre de CECALAIT n° 30).

Depuis, d'autres études sont arrivées à leur terme, notamment celle concernant le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive.

Dans ce projet de grande ampleur, impliquant une vingtaine de laboratoires internationaux, les coordinateur et partenaires du programme restent :

- coordinateur de l'ensemble du projet : AFSSA (Mme LAHELLEC)
- partenaires : le RIVM aux Pays-Bas et le MAFF-CSL au Royaume Uni

Parmi les sous-contractants de ce programme, CECALAIT a assuré la préparation, la mise au point, la définition des paramètres de conservation et l'expédition des échantillons de fromage.

Rappelons que les staphylocoques à coagulase positive, c'est à dire principalement *Staphylococcus aureus*, mais aussi quelques autres espèces, sont des germes pathogènes, capables de

produire des entérotoxines, responsables de toxi-infections alimentaires. D'après la réglementation (Arrêté du 30/3/1994), leur teneur, lors de la mise sur le marché, ne doit pas dépasser la valeur « m » de 100/ml, dans les laits crus de vache destinés à la consommation en l'état ; dans les autres produits laitiers, elle doit être inférieure à 10, 100 ou 1000/ml ou /g selon le type de produit concerné.

La méthode horizontale de référence pour les dénombrer est la méthode NF EN ISO 6888 de 1999, qui se décompose, en fait en deux parties. La partie 1 utilise le milieu de Baird-Parker, puis un test de confirmation par la recherche d'une coagulase ; la partie 2 utilise le même milieu de base que la partie 1, supplémenté par une solution au plasma de lapin et au fibrinogène (RPFA).

L'objectif de l'étude était donc de valider chacune de ces méthodes et de déterminer leurs valeurs de fidélité en termes de répétabilité, r , et de reproductibilité, R , au moyen d'une analyse collaborative.

ANALYSE COLLABORATIVE

Comme pour chacune des méthodes microbiologiques évaluées au cours de ce programme européen, les échantillons utilisés se divisent en :

- matériaux de référence, à savoir des capsules de gélatine, préparées par le RIVM, contenant de la poudre de lait, contaminée par *Staphylococcus aureus*.
- trois types d'aliments, représentatifs de la diversité du domaine d'application de la méthode, à savoir :
 - ♦ un produit laitier : fromage au lait cru,
 - ♦ un produit carné : viande de bœuf hachée lyophilisée, préparée par le MAFF-CSL,
 - ♦ un produit sec : poudre d'œufs entiers, préparée par le RIVM.

Ils ont tous été contaminés artificiellement, à plusieurs niveaux d'inoculum, à la fois par une ou plusieurs souche(s) appropriée(s)* de *Staphylococcus aureus* et par des souches de staphylocoques à coagulase négative, ainsi que par une flore autochtone simulée pour le fromage et la viande (cf tableau 1).

* Le fromage a ainsi été contaminé par plusieurs souches, typiques et atypiques, d'origine laitière, de *Staphylococcus aureus*.

Quel que soit leur niveau de contamination, leur homogénéité et leur stabilité ont été vérifiées avant le début de l'étude collaborative.

Les niveaux de contamination s'établissent finalement selon le tableau 1.

tableau 1 : niveaux de contamination des échantillons d'aliments

table 1 : contamination levels of the samples

niveau level	<i>S. aureus</i>	Staphylocoques à coagulase négative coagulase negative staphylococci
témoin (negative)	0	même niveau que <i>S. aureus</i> same level as <i>S. aureus</i>
bas low	≈ 10 ³ ufc/g ≈ 10 ³ cfu/g	
moyen medium	≈ 10 ⁴ à 10 ⁵ ufc/g ≈ 10 ⁴ to 10 ⁵ cfu/g	
haut high	≈ 10 ⁵ à 10 ⁶ ufc/g ≈ 10 ⁵ to 10 ⁶ cfu/g	
référence (reference)	≈ 5000 ufc / capsule ≈ 5000 cfu / capsule	

Après un pré-essai entre les trois laboratoires partenaires pour bien cerner les difficultés de la méthode et fixer le mode opératoire, l'étude collaborative a eu lieu en juin 1999 et a finalement rassemblé 24 laboratoires de 16 pays européens.

Les analyses ont été effectuées en double aveugle et la plupart des laboratoires ont testé les deux parties de la norme sur tous les échantillons.

Les principes des méthodes ISO 6888-1 et -2 se décomposent en plusieurs phases successives à partir de la préparation de la suspension mère

♦ Pour ISO 6888-1 :

- ensemencement en surface de deux séries de boîtes de milieu gélosé sélectif de Baird-Parker, à partir de la suspension mère ou de ses dilutions décimales,
- incubation en aérobiose à 37°C et comptage des colonies typiques et/ou atypiques à 24 et 48h,
- test de confirmation par recherche de la coagulase, pratiqué sur un certain nombre de colonies typiques et/ou atypiques.

♦ Pour ISO 6888-2 :

- ensemencement en profondeur de deux séries de boîtes de milieu gélosé sélectif RPFA, à partir de la suspension mère ou de ses dilutions décimales,
- incubation en aérobiose à 37°C et comptage des colonies typiques à 24 et 48h.

RESULTATS

Les résultats des organismes préparant les échantillons ont montré que leur stabilité et leur homogénéité étaient satisfaisantes.

Puis, le dépouillement des rapports d'essais a permis de constater que leur transport et leur réception avaient été globalement satisfaisants.

En ce qui concerne les résultats, ils ont mis en évidence des discordances entre laboratoires quant à la classification en colonies typiques et atypiques sur milieu de Baird Parker.

Pour ce qui est des comptages, les résultats ont ensuite été transformés en log. Puis les valeurs aberrantes ont été éliminées avant le calcul des valeurs de répétabilité et de reproductibilité.

Ces calculs ont été effectués selon les indications de la norme ISO 5725, comme à l'accoutumée, mais aussi selon le projet de norme EN ISO 16140 qui, s'appuyant sur la détermination de la médiane, semble plus adapté aux méthodes microbiologiques.

Les tableaux 2 et 3 présentent les valeurs obtenues, en appliquant ce dernier mode de calcul. Mais, en fait, l'une ou l'autre façon de calculer aboutissent quasiment aux mêmes résultats.

Tableau 2 : répétabilité et reproductibilité de la méthode ISO 6888-1 : milieu de Baird-Parker et test de la coagulase

Table 2 : repeatability and reproducibility of ISO 6888-1 : Baird-Parker medium and coagulase test

Echantillons samples	Nombre labos number labs	moyenne (log) mean	r (log)	R (log)
Fromage <i>cheese</i>	19	3.33	0.50	0.52
	19	5.12	0.17	0.47
	19	6.06	0.33	0.66
Viande <i>meat</i>	18	3.27	0.33	0.48
	18	4.20	0.19	0.47
	18	6.19	0.19	0.39
Œuf <i>egg</i>	20	3.17	0.25	0.32
	20	4.10	0.25	0.29
	20	5.23	0.21	0.30
Référence	20	3.69	0.19	0.39

avec / with

r : répétabilité. En échelle log signifie que la différence logarithmique obtenue entre deux répétitions dans le même laboratoire a une probabilité de 95% d'être inférieure à r.

r : repeatability. In a log scale, it means that the log difference between two replicates performed in the same laboratory has a 95% probability of being lower than r

R : reproductibilité. En échelle log signifie que la différence logarithmique obtenue entre deux analyses dans des laboratoires différents a une probabilité de 95% d'être inférieure à R.

R : reproducibility. In a log scale, it means that the log difference between the same analyses performed in different laboratories has a 95% probability of being lower than R

Tableau 3 : répétabilité et reproductibilité de la méthode ISO 6888-2 : milieu RPFA

Table 3 : repeatability and reproducibility of ISO 6888-2 : RPFA medium

Echantillons samples	Nombre labos number labs	moyenne (log) mean	r (log)	R (log)
Fromage <i>cheese</i>	18	3.25	0.25	0.27
	18	5.03	0.13	0.33
	18	6.00	0.17	0.32
Viande <i>meat</i>	17	3.16	0.25	0.32
	17	4.13	0.21	0.28
	17	6.08	0.21	0.33
Œuf <i>egg</i>	19	3.25	0.33	0.38
	19	4.20	0.17	0.32
	19	5.32	0.25	0.39
Référence	19	3.85	0.17	0.31

Les tableaux 2 et 3 montrent, qu'à l'exception du fromage analysé avec le milieu de Baird-Parker, les valeurs de répétabilité et de reproductibilité varient peu en fonction du niveau de contamination. Elles sont, en outre, globalement meilleures avec le milieu RPFA. Le tableau 4 résume les valeurs moyennes de fidélité obtenues selon les deux méthodes.

tableau 4 : valeurs moyennes de fidélité des méthodes ISO 6888-1 & -2

table 4 : mean precision of ISO 6888-1 & -2 methods

aliments food	6888-1 Baird-Parker		6888-2 RPFA	
	r (log)	R (log)	r (log)	R (log)
fromage cheese	0.33	0.55	0.18	0.31
viande meat	0.27	0.45	0.22	0.31
œuf egg	0.24	0.3	0.25	0.36

Pour mémoire, rappelons ici les valeurs obtenues sur le lait en regroupant les résultats de plusieurs essais interlaboratoires organisés par CECALAIT (cf Lettre de CECALAIT, n°20) :

- r(log) = 0.52 et R (log) = 1.13 pour le milieu Baird-Parker;
- r(log) = 0.19 et R(log) = 0.43 pour le milieu RPFA.

Ces valeurs sont globalement plus élevées que ci-dessus. Il faut cependant considérer que :

- d'une part, elles proviennent de laboratoires beaucoup plus divers que les participants au programme européen;
- d'autre part, comme nous l'avons souligné en son temps (cf Lettre de CECALAIT, n°20), elles sont liées à des pratiques de certains laboratoires s'éloignant sensiblement des protocoles expérimentaux normalisés, notamment dans le cas du milieu Baird-Parker.

A l'inverse, le fait d'observer en milieu RPFA, avec le lait, des valeurs de répétabilité voisines de celles obtenues avec le fromage, semble indiquer que les valeurs issues de ce programme européen ne constituent pas un objectif hors de portée de laboratoires d'envergure nationale ou locale, moins expérimentés.

Par ailleurs, l'ensemble de l'étude n'a, mis en évidence aucune association particulière entre certains milieux commerciaux et certaines anomalies, ni aucun effet lié à la flore autochtone annexe. Celle-ci peut cependant se révéler gênante si le milieu RPFA n'est pas ensemencé en profondeur selon les prescriptions de la norme, mais en surface, comme c'est parfois le cas dans la pratique.

CONCLUSIONS

A l'issue de cette étude, les méthodes ISO 6888-1 & -2 apparaissent satisfaisantes. Des recommandations pour l'évolution des normes ont néanmoins été transmises au CEN et à l'ISO et ont toutes été acceptées. Il s'agit de :

- ♦ reprendre dans un amendement aux normes ISO 6888-1 & -2, les données de fidélité déterminés dans cette étude,
- ♦ exprimer ces données selon le projet EN ISO 16140,
- ♦ accorder un statut équivalent aux deux parties de la norme,
- ♦ réexaminer la description des colonies typiques, atypiques et de genre autre que *Staphylococcus*, donnée dans le texte de la norme ISO 6888-1.

DES REFLEXIONS SUR L'EVOLUTION DES CRITERES EN FRANCE

Par ailleurs, il se dessine une évolution des critères microbiologiques concernant les staphylocoques dans les produits laitiers.

Une note de la DGAL, datée du 19/7/1999 :

- suggère qu'il serait préférable de procéder à la recherche d'entérotoxines staphylococciques 24 à 48 h après emprésurage, quel que soit le type de technologie fromagère et quel que soit le résultat du dénombrement au moment de la mise sur le marché (cf Lettre de Cecalait n° 31).
- recommande que, dans la démarche d'autocontrôle propre à leur technologie, les producteurs dénombrent les staphylocoques à l'étape la plus à risque des produits, c'est à

dire, en général, 24 à 48h après emprésurage et recherchent la présence de toxines pour tout dépassement du critère M.

Une réflexion sur ce dernier point a eu lieu au sein du groupe de travail « Microbiologie et analyse des risques » du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF). La proposition, adoptée par ce groupe le 10/2/2000, est d'effectuer le dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans les fromages à l'étape la plus à risques, c'est à dire 24 à 48h après le début de la coagulation du lait, mais d'élever la valeur seuil du critère M de deux puissances de 10.

Pour l'heure, le processus de validation de cette proposition par les instances de régulation suit son cours.

Conclusion générale

La méthode de référence de dénombrement des staphylocoques a été trouvée globalement satisfaisante à l'issue de cette étude collaborative de grande ampleur. Parmi les recommandations formulées dans les conclusions, celles qui concernent l'intégration des données de fidélité vont être prises en compte très rapidement puisqu'elles ne nécessitent qu'une rédaction d'amendement et non pas une révision d'ensemble de la norme. Le statut équivalent accordé aux deux méthodes décrites dans la

norme constitue également une évolution notable de ce texte. Par ailleurs, une modification des critères concernant ces germes dans les fromages a été proposée.

Abréviations

CEN : Comité Européen de Normalisation

cfu : colonie formant unité = ufc : unity forming colony

CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

ISO : International Standardization Organization

MAFF-CSL : Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Central Science Laboratory

RIVM : Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu

RPFA : Rabbit Plasma Fibrinogen Agar : milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène bovin

Bibliographie

- ♦ Arrêté ministériel du 30/3/1994 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché. JO du 21/4/1994, p. 5883-5886.
- ♦ Note de service de la DGAL du 19/7/1999 (DGAL/ SDHA/ N 99-8113), concernant les techniques de détection et d'identification des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers