



CENTRE D'ETUDES ET DE CONTROLE DES
ANALYSES EN INDUSTRIE LAITIERE

janvier 1993

N° 5

LA LETTRE DE CECALAIT

M
E
I
L
L
E
U
R
S

V
O
E
U
X

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 84.73.63.00 / 84.73.63.19 TELECOPIE : 84.37.37.81

Rédaction achevée le 26 Janvier 1993

Equipe rédactionnelle :

O. LERAY, A. BAPTISTE

SOMMAIRE

Lait homogénéisé et méthode Gerber

p. 1

Validations

p. 1 - 2

informations

test de détection de Clostridium tyrobutyricum

Les règles sanitaires dans le secteur laitier : quelques informations sur une récente Directive Européenne

p. 3 - 4

Normes parues récemment

p. 5

Rendez-vous

p. 5 - 6 -

LAIT HOMOGENEISE ET METHODE GERBER

L'extraction de la matière grasse est délicate

Dans les laits homogénéisés, le dosage de la matière grasse par une méthode butyrométrique est mis en défaut. En effet, ces laits ont subi un traitement destiné à rendre leurs globules gras plus petits pour empêcher la séparation de la crème par gravité. En conséquence, ce traitement complique aussi l'extraction de la matière grasse dans les butyromètres.

Au vu de ces difficultés, le cas des laits homogénéisés a été exclu du domaine d'application de la norme actuelle de dosage de la matière grasse par la méthode Gerber. (V 04-210, décembre 1990).

La méthode peut être adaptée... avec précaution !

On peut néanmoins, pour des besoins de contrôle rapide, souhaiter doser la matière grasse par butyrométrie dans ces laits. Cela est possible, mais demande un certain nombre d'adaptations de la méthode Gerber.

Celles-ci ont été décrites dans une version ancienne de la norme V 04-210 (modificatif de Septembre 1975), aujourd'hui abrogée.

Les différences principales avec la méthode Gerber "classique" portent sur :

- la lecture du résultat qui se fait après un séjour du butyromètre pendant 5 mn dans un bain d'eau à 40°C;

- le nombre de centrifugations :

★ une seule est généralement insuffisante pour obtenir une extraction satisfaisante de la matière grasse. Mais le nombre nécessaire ne peut être défini a priori car il dépend du degré d'homogénéisation du lait, lui-même lié à l'équipement industriel.

★ La règle est de procéder à plusieurs centrifugations successives entrecoupées de séjours de 5 mn dans le bain d'eau à 40°C, jusqu'à ce que la différence entre deux résultats successifs soit inférieure à la moitié d'un échelon;

- le résultat obtenu par le butyromètre est multiplié par 1,02 pour corriger la diminution du volume occupé par la matière grasse à 40°C au lieu de 65°C ("Gerber classique").

Cette méthode a un statut de méthode interne

Compte tenu des différents degrés d'homogénéisation possibles, le laboratoire utilisateur doit procéder à une validation préalable de la méthode, pour le type de lait auquel elle est destinée.

Il reste que cette méthode n'est plus considérée comme une méthode de routine normalisée, mais comme une méthode alternative **interne**, à vérifier régulièrement. L'utilisation de cette méthode d'analyse **impose** donc des comparaisons périodiques avec la méthode de référence.

VALIDATIONS AFNOR

Méthodes rapides : un démarrage lent!

Les méthodes rapides d'analyse connaissent un développement prudent dans l'agroalimentaire.

Mais depuis Janvier 1992, une circulaire de la DGAL autorise les Services Vétérinaires à utiliser, pour leurs analyses de routine, les méthodes validées par l'AFNOR. Ceci va sans doute encourager leur utilisation.

Pour l'heure, l'AFNOR a validé :

- 7 méthodes microbiologiques;
- 2 méthodes physico-chimiques.

Elle en étudie actuellement 5 autres et travaille aussi sur 4 demandes d'extension du domaine d'application.

Méthodes actuellement validées

MICROBIOLOGIE

- Petrifilm flore totale et coliformes (3M) pour le lait cru, depuis fin 1989 (cf Lettre de CECALAIT N° 0 et 2)
- Salmonella Rapid Test (UNIPATH) pour tous produits, depuis mai 1991 (cf Lettre de CECALAIT N° 0)
- Test de détection des entérotoxines de staphylocoques (TRANSIA DIFFCHAMB) pour tous produits, depuis mai 1991 (cf Lettre de CECALAIT N° 0)
- Test de détection de *Clostridium tyrobutyricum* (TRANSIA DIFFCHAMB) pour le lait cru, depuis janvier 1992 (cf Lettre de CECALAIT N° 1)
- Gélose Rambach (TECHNOGRAM/HUMÉAU) pour la détection des salmonelles dans tout type de produits, depuis

Avril 1992

- test TECRA salmonelles (3M) pour tous produits, depuis Juillet 1992

PHYSICO-CHIMIE

- Appareil FP 428 (LECO) pour le dosage de l'azote dans l'alimentation animale sèche, depuis Janvier 1992.

- digesteur microondes Maxidigest MX350 (PROLABO) pour la minéralisation Kjeldahl de tout type de produits, depuis Juin 1992.

Rappelons que l'AFNOR établit une attestation de validation décrivant le principe et les performances de la méthode: Celle-ci est fournie au fabricant ou au distributeur de la méthode ainsi qu'à toute entreprise souhaitant utiliser la méthode.

Quelques compléments d'information

Comme nous vous l'avions annoncé, il y a quelques temps, nous disposons d'éléments complémentaires d'information sur la détection de *Clostridium tyrobutyricum*, mais aussi sur la gélose Rambach. Ces derniers vous seront présentés dans un prochain numéro de notre Lettre.

TEST DE DETECTION DE CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM

Ce test est applicable au lait cru et donne un résultat en 3 j.

RAPPEL DU PRINCIPE

Il s'agit d'une réaction immuno-enzymatique de type sandwich.

L'échantillon de lait à tester est incubé en milieu nutritif liquide qui permet la germination des spores, ainsi que la croissance et l'enrichissement du milieu en cellules végétatives. Un choc thermique permet de mettre en évidence des antigènes spécifiques, qui sont ensuite révélés par la réaction immunoenzymatique.

La lecture se fait par une mesure de densité optique et l'interprétation par calcul du nombre le plus probable.

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES

★ spécificité

Résultats obtenus pour une contamination artificielle de 10^9 cellules végétatives /ml.

- 12 faux négatifs sur 136 souches de *Clostridium tyrobutyricum*.

- 1 faux positif sur 139 souches de *Clostridium* et bactéries hétérologues.

La méthode s'est révélée plus spécifique de *Clostridium*

tyrobutyricum que la méthode de référence utilisée ((cf ci-dessous).

★ justesse

Déterminée par rapport à la méthode BBB (Bryant Burkey modifiée par Bergère, CNERNA 1986), sur des laits artificiellement et naturellement contaminés.

équation de calibrage :

Pour des laits naturellement contaminés :

$$\log(\text{REF}) = b \times \log(\text{TEST}) + a$$

avec b (pente) compris entre 0,3 et 0,5
et a (ordonnée à l'origine) compris entre 0,4 et 2,5

Cette équation, partant d'une valeur obtenue par le test rapide, permet d'estimer la valeur de référence correspondante, avec l'incertitude PE.

précision d'estimation : $PE = \pm 1,89 \log$

soit, pour un échantillon i donné, en spores/l : de (estimation_i / 78)
à (estimation_i x 78)

avec estimation_i = $b \times \log(\text{TEST}_i) + a$

Ces deux méthodes ne sont pas corrélées, car la méthode BBB réagit avec plusieurs espèces de *Clostridium* présentes dans le lait cru, alors que la méthode rapide est spécifique de *Clostridium tyrobutyricum*.

La corrélation entre les deux méthodes n'est acceptable que quand *C. tyrobutyricum* est seul présent (contamination artificielle).

On a alors :

$$b \approx 1 \quad a \approx 0 \quad PE = \pm 1 \log$$

soit, pour un échantillon i donné, en spores/l : de (estimation_i / 10)
à (estimation_i x 10).

avec estimation_i = $b \times \log(\text{TEST}_i) + a$

FIDELITE

Données déterminées sur des laits naturellement contaminés.

★ répétabilité : $r = 1,60 \log$

La méthode rapide est plus répétable pour des laits peu contaminés; pour des laits fortement contaminés, c'est la méthode BBB qui donne de meilleurs résultats.

★ reproductibilité : $R = 2,20 \log$

source : attestation de validation de l'AFNOR : TRA 02/2 -01/92

LES REGLES SANITAIRES DANS LE SECTEUR LAITIER :

QUELQUES INFORMATIONS SUR UNE RECENTE DIRECTIVE EUROPEENNE

Le Conseil des Communautés Européennes a arrêté le 16 Juin 1992 une directive fixant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait (JO CEE N° L 268/1 du 14.9.1992, directive 92/46).

Vers des règles d'hygiène pour la production et la transformation du lait, adoptées par tous!

Cette directive vise à établir graduellement des règles d'hygiène, applicables à l'ensemble du marché de la Communauté Européenne, pour la production, le conditionnement, le stockage et le transport du lait et des produits laitiers.

Elle ne s'applique pas à la vente directe du producteur au consommateur, qui reste régie par des règles nationales.

Elle fixe :

- les prescriptions de santé pour les animaux producteurs : indemnes de tuberculose, brucellose ou autre maladie transmissible à l'homme, sans inflammation ou blessure du pis, non traités par des substances dangereuses pour la santé humaine;

- l'hygiène de l'exploitation : aménagement des locaux, facilité pour le nettoyage des locaux et accessoires;

- l'hygiène de la traite et du transport : facilité de nettoyage et de désinfection des instruments de traite, installations et tenues appropriées pour la propreté du personnel, refroidissement du lait s'il n'est pas collecté dans les deux heures, contrôle pour éviter l'addition d'eau dans le lait cru;

- les normes microbiologiques imposées au lait cru à son admission à l'établissement de traitement ou de transformation (cf tableau 1 ci-contre);

- les conditions d'agrément de ces établissements : disposition et facilité de nettoyage des locaux de manipulation, des citernes, des locaux d'entreposage réfrigérés... et les conditions d'hygiène qui sont applicables aux locaux, matériels et personnels;

- les conditions concernant les équipements et récipients pour le stockage au froid, la présence de centrifugeuses, l'équipement pour le remplissage automatique des récipients de conditionnement du lait, l'équipement pour le traitement thermique...;

- les exigences concernant les délais de fabrication (en règle générale, dans les 36h suivant l'admission du lait s'il est conservé à une température inférieure à 6°C) et la préparation des laits traités thermiquement ou des laits destinés à la fabrication de produits laitiers;

- les critères microbiologiques pour les produits laitiers et le lait de consommation à la sortie de l'établissement (cf

tableaux 2 et 3 ci-contre);

- les prescriptions concernant le conditionnement et l'emballage des produits : locaux appropriés, automatisation du remplissage et de la fermeture;

- le marquage de salubrité et l'étiquetage;

- les conditions d'entreposage et de transport : locaux à la température requise avec enregistrement des températures, récipients et véhicules de transport conçus et équipés pour le maintien des températures requises et pour un nettoyage facile;

- le contrôle des exigences précédentes par les autorités compétentes.

Des mesures de contrôle adaptées

Les différents Etats doivent veiller au respect de ces dispositions, en particulier en prenant, et en faisant prendre aux établissements, toutes les mesures de contrôle adaptées. Les traces écrites ou enregistrées de ces contrôles doivent être conservées (2 ans, ou 2 mois après la date de durabilité minimale pour les produits à conserver au frais) pour présentation aux autorités compétentes. Celles-ci doivent être immédiatement avisées de tout risque sanitaire grave.

Ces contrôles doivent, en outre, porter sur la recherche de résidus d'antibiotiques, sulfamides, substances médicales, pesticides, détergents ou autre substance nuisible. Avant le 30/06/1993, les Etats devront soumettre à la Commission les mesures nationales à mettre en oeuvre pour systématiser ces recherches dans le lait cru, traité thermiquement et dans les produits à base de lait.

Chaque état doit désigner un ou plusieurs laboratoires de référence. Ceux-ci sont chargés :

- de coordonner les activités des laboratoires d'analyse;

- d'organiser des essais comparatifs;

- d'assister les autorités compétentes pour organiser le système de contrôle du lait;

- de diffuser auprès des laboratoires et autorités les informations fournies par le Laboratoire Communautaire de Référence : le LCHA (43, rue de Dantzig à Paris). Celui-ci est également chargé des tâches énoncées ci-dessus, mais au niveau des différents laboratoires nationaux de référence.

Les Etats membres doivent également s'assurer que les importations en provenance de pays tiers respectent ces mêmes dispositions. Les pays et établissements reconnus capables de le faire sont répertoriés sur une liste, régulièrement remise à jour en fonction de contrôles effectués sur place par des experts de la Commission ou des Etats membres.

Le texte de cette directive (32 pages) peut être commandé aux Journaux Officiels (36 16 JOEL). Il est suivi d'une autre directive, plus courte, (92/47 du Conseil du 16/06/1992, JO CEE du 14/09/1992) qui précise les conditions d'octroi de dérogations temporaires et limitées aux règles sanitaires, énoncées dans la directive précédente.

LEGENDE DES 3 TABLEAUX

(a) : Moyenne géométrique constatée sur une période de 2 mois, avec au moins 2 prélèvements par mois.

(b) : Moyenne géométrique constatée, avec au moins 1 prélèvement par mois, sur une période de 3 mois (avec adaptation possible si le niveau de production est très saisonnier).

(c) : les 25 g seront obtenus par 5 prélèvements de 5 g pris en différents points d'un même échantillon.

(d) : cette recherche n'est pas obligatoire pour les laits stérilisés, les laits de conserve et les produits à base de lait traités thermiquement après leur conditionnement ou leur emballage.

(e) : après incubation à 6°C pendant 5 j (teneur en germes à 21°C).

(f) : teneur en germes à 30°C.

n : nombre d'unités d'échantillonnage de l'échantillon.

m : valeur seuil du nombre de bactéries; le résultat est considéré comme satisfaisant si toutes les unités d'échantillonnage ont un nombre de bactéries inférieur ou égal à m.

M : valeur limite du nombre de bactéries; le résultat est considéré comme insatisfaisant si une ou plusieurs unités d'échantillonnage ont un nombre de bactéries supérieur à M.

c : nombre d'unités d'échantillonnage dont le nombre de bactéries peut se situer entre m et M, l'échantillon étant considéré comme acceptable si les autres unités d'échantillonnage ont un nombre de bactéries inférieur ou égal à m.

Tableau 1 : Normes à respecter lors de l'admission du lait cru à l'établissement de traitement ou de transformation

Teneur en germes à 30°C (par ml)	Teneur en cellules somatiques (par ml)	Staphylococcus aureus (par ml)
LAIT CRU DE VACHE		
pour la production de lait de consommation traité thermiquement, de lait fermenté, emprésuré, gélifié ou aromatisé et de crèmes		
≤ 100 000 (a)	≤ 400 000 (b)	-----
pour la fabrication d'autres produits laitiers		
≤ 400 000 (a) à partir du 1.1.1994	≤ 500 000 (b) à partir du 1.1.1994	-----
≤ 100 000 (a) à partir du 1.1.1998	≤ 400 000 (b) à partir du 1.1.1998	-----
pour la fabrication de produits au lait cru		
≤ 100 000 (a)	≤ 400 000 (b)	n = 5 m = 500 M = 2000 c = 2
LAIT CRU DE BUFFLONNE (à partir du 1.1.1994)		
≤ 1 000 000 (a)	≤ 500 000 (b)	-----
LAIT CRU DE CHEVRE OU DE BREBIS		
pour la fabrication de laits de consommation ou de produits traités thermiquement		
≤ 1 000 000 (a) (à partir du 1.1.1994)	-----	-----
pour la fabrication de produits au lait cru		
≤ 500 000 (a)	-----	n = 5 m = 500 M = 2000 c = 2

Les normes applicables au 1.1.1998, pour la teneur en germes à 30°C et la teneur en cellules somatiques des laits de chèvre et de brebis, seront fixées ultérieurement par la Commission.

Tableau 2 : Critères microbiologiques relatifs aux produits à base de lait lors de leur sortie de l'établissement de transformation

Les produits à base de lait traité thermiquement doivent, en outre, après incubation à 30°C pendant 15j répondre aux normes suivantes :

- teneur en germes à 30°C (par 0,1 ml) ≤ 10
- contrôle organoleptique normal

Critères	applicable aux produits	normes (ml, g)
CRITERES OBLIGATOIRES : GERMES PATHOGENES		
<i>Listeria monocytogenes</i>	fromages autres que ceux à pâtes dures	absence dans 25 g (c) n = 5 c = 0
	autres produits (d)	absence dans 1 g
<i>Salmonella spp.</i>	tous produits sauf poudre de lait	absence dans 25 g (c) n = 5 c = 0
	poudre de lait	absence dans 25 g (c) n = 10 c = 0
CRITERES ANALYTIQUES : GERMES TEMOINS DE DEFAUTS D'HYGIENE		
<i>Staphylococcus aureus</i>	fromages au lait cru et au lait thermisé	m = 1000 M = 10 000 n = 5 c = 2
	fromages à pâte molle (au lait traité thermiquement)	m = 100 M = 1000 n = 5 c = 2
	fromages frais laits en poudre produits glacés à base de lait (y compris glaces et crèmes glacées)	m = 10 M = 100 n = 5 c = 2
<i>Escherichia coli</i>	fromages au lait cru et au lait thermisé	m = 10 000 M = 100 000 n = 5 c = 2
	fromages à pâte molle (au lait traité thermiquement)	m = 100 M = 1000 n = 5 c = 2
GERMES INDICATEURS : LIGNES DIRECTRICES		
coliformes 30°C	produits liquides à base de lait	m = 0 M = 5 n = 5 c = 2
	beurre à base de lait ou crème pasteurisés	m = 0 M = 10 n = 5 c = 2
	fromages à pâte molle (au lait traité thermiquement)	m = 10 000 M = 100 000 n = 5 c = 2
	produits en poudre à base de lait	m = 0 M = 10 n = 5 c = 2
	produits glacés à base de lait (y compris glaces et crèmes glacées)	m = 10 M = 100 n = 5 c = 2
teneur en germes	produits liquides à base de lait traités thermiquement et non fermentés (e)	m = 50 000 M = 100 000 n = 5 c = 2
	produits glacés à base de lait (y compris glaces et crèmes glacées) (f)	m = 100 000 c = 2 n = 5 M = 500 000

Tableau 3 : Critères microbiologiques relatifs aux lait de consommation

critères	normes
LAIT CRU DE VACHE	
teneur en germes à 30°C (par ml)	≤ 50 000 (a)
<i>Staphylococcus aureus</i>	m = 100 M = 500 n = 5 c = 2
<i>Salmonella</i>	absence dans 25 g n = 5 c = 0
LAIT PASTEURISE	
germes pathogènes	absence dans 25 g n = 5 c = 0 m = 0 M = 0
coliformes (par ml)	n = 5 c = 1 m = 0 M = 5
teneur en germes à 21°C après incubation à 6°C, 5 j	n = 5 c = 1 m = 5x10 ⁴ M = 5x10 ⁵
LAIT STERILISE, LAIT UHT	
teneur en germes à 30°C	≤ 10 (pour 0,1 ml)
contrôle organoleptique	normal
substances pharmacologiquement actives	dans les limites du règlement CEE n° 2377/80

NORMES PARUES RECEMMENT

Liste des révisions ou des nouvelles normes FIL reçues entre Octobre 1992 et Janvier 1993.

CHYMOSINE ET PEPSINES BOVINES : **157:1992** (équivalente à ISO CD 11815) Détermination de l'activité coagulante totale du lait

FROMAGE ET CROUTE DE FROMAGE : **140A:1992** (équivalente à ISO 9233) Détermination de la teneur en natamycine (*spectrométrie d'absorption moléculaire et CLHP*)

LAIT : **36A:1992** (équivalente à ISO DIS 12081) Détermination de la teneur en calcium (*méthode titrimétrique*)

LAIT : **161:1992** (équivalente à ISO CD 12079) Détermination quantitative de la qualité bactériologique (*directives pour l'évaluation des méthodes de routine*)

LAIT CONCENTRE EN BOITE, CASEINE ET CASEINATES : **133A:1992** (équivalente à ISO 6733) Détermination de la teneur en plomb (*méthode spectrométrique de référence*)

LAIT CONCENTRE NON SUCRE EN BOITE : **160:1992** (équivalente à ISO CD 9941) Détermination de la teneur en étain (*méthode spectrométrique*)

LAIT EN POUDRE : **162:1992** (équivalente à ISO CD 11814) Evaluation de l'intensité du traitement thermique (*méthode par*

CLHP)

LAIT ET LAIT EN POUDRE : **154:1992** (équivalente à ISO CD 10125) Détermination de la teneur en calcium (*méthode spectrométrique d'absorption atomique de flamme*)

LAIT ET PRODUITS LAITIERS : **122B:1992** (équivalente à ISO 8261) Préparation des échantillons et des dilutions en vue de l'examen microbiologique

158:1992 Directives FIL pour la préparation et l'utilisation de certificats d'exportation pour le lait et les produits laitiers.

163:1992 Norme générale de composition pour les laits fermentés

164:1992 Norme générale de composition pour les produits dérivés des laits fermentés chauffés après la fermentation

Du côté de L'AFNOR

LAIT : **V 04-220 (NF ISO 9874) Septembre 1992** Détermination de la teneur en phosphore total du lait (*méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire*)

LAIT SEC ET PRODUITS LAITIERS EN POUDRE : **V 04-344 (NF ISO 8967) Septembre 1992** Détermination de la masse volumique

RENDEZ-VOUS

22-26 FEVRIER 1993 : SEMAINE ANALYTIQUE DE LA FIL A CHICAGO (ETATS-UNIS)

programme

- techniques d'échantillonnage
- nitrate, nitrite, chlorure et phosphore
- métaux lourds et autres éléments
- teneur en eau
- détermination d'additifs alimentaires choisis
- vitamines A et D dans le lait sec
- mycotoxines
- visite de Kraft General Foods Technology Center
- acides gras libres
- méthodes chimiques automatisées

Contacts et renseignements auprès de :

FIL

41, Square Vergote
B 1040 BRUXELLES
BELGIQUE
TEL : +32.2.733.98.88 ou +32.2.733.16.90
FAX : +32.2.733.04.13

29 MARS - 2 AVRIL 1993 : SEMAINE MICROBIOLOGIQUE DE LA FIL A READING (ROYAUME-UNI)

programme

- préparation des échantillons en vue de l'analyse microbiologique
- pathogènes Gram - et Gram +
- statistiques
- antibiotiques
- qualité bactérienne du lait cru
- spores dans le lait cru
- contaminants non-pathogènes dans les techniques classiques
- bactéries lactiques et levains

Contacts et renseignements auprès de la FIL ou de :

United Kingdom Dairy Association

Giggs Hill Green
THAMES DITTON
SURREY KT7 OEL
UK
TEL : +44.81.398.41.01
FAX : +44.81.398.84.85

12-15 SEPTEMBRE 1993 :

RAMI 93 A LONDRES (ROYAUME-UNI)

7e Congrès International sur **LES METHODES RAPIDES ET
L'AUTOMATISATION EN MICROBIOLOGIE ET EN
IMMUNOLOGIE**

Contacts et renseignements auprès de :

S.W.B. NEWSOM

Meeting Chair

Papworth Hospital

CAMBRIDGE CB3 8RE

UK

ou

P. DUDGEON

Congress Manager

Sleights, Inc.

14 Dalling Road

LONDON W60JB

UK