

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

juillet 1993

LA LETTRE

N° 7

DE

CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 84.73.63.20 / 84.73.63.19 TELECOPIE : 84.37.37.81

Rédaction achevée le 23 Juillet 1993

Equipe rédactionnelle :

O. LERAY, P. RINGLE, Ph. TROSSAT, A. BAPTISTE

SOMMAIRE

Le point sur la détection de *Listeria* : résumé de l'intervention de Mme BOHNERT (LCHA) lors de l'AG CECALAIT du 18.6.1993 p. 1 -

Chaîne *Listeria* p. 1 - 2

Evaluation : Somatic Cells Counter 300 p. 3 - 4

Les normes CEN : Résumé de l'intervention de M. GALIBERT (AFNOR) lors de l'AG CECALAIT du 18.6.1993 p. 5 - 6

Normes et projets de normes parus récemment

Petite annonce

LE POINT SUR LA DETECTION DE *LISTERIA*

En Avril 1993, CECALAIT a organisé la première chaîne interlaboratoires de recherche de *Listeria* dans les produits laitiers. Par ailleurs, lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT du 18 juin 1993, Mme BOHNERT du LCHA (Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire) a fait le point sur les méthodes de recherche de *Listeria*.

Il nous a semblé intéressant de rassembler dans un même numéro de La Lettre de CECALAIT, un premier bilan de cette chaîne et un résumé de l'intervention de Mme BOHNERT.

RESUME DE L'INTERVENTION DE Mme BOHNERT

Ce n'est que depuis le début des années 80, qu'il a été possible de faire le lien entre la listériose et les aliments. Cette maladie peu répandue en France (1,2 cas pour 100000 habitants) a cependant des conséquences graves (avortements, méningites...)

Certains sérotypes de *Listeria monocytogenes* sont plus particulièrement impliqués dans la listériose humaine : 4b, 1/2a, 1/2b; la dose infectieuse reste inconnue.

Une grande évolution dans les méthodes de détection

Les méthodes de recherche imposées par les Etats-Unis (FDA pour les produits laitiers, USDA pour les produits carnés) ont fortement évolué :

- d'une incubation de plusieurs semaines au froid, on est passé à une incubation d'un maximum de 7 jours à 30°C, et à 48 h actuellement;

- dans la méthode FDA initiale, le milieu d'isolement (Mac Bride modifié) était peu sélectif. Il est remplacé maintenant par des géloses plus performantes, Oxford et Palcam en particulier;

- une nouvelle méthode a été adoptée lors de la dernière réunion FIL. L'enrichissement se fait en deux étapes dans le milieu FRASER qui a l'avantage d'être fortement tamponné et de contenir du fer, facteur de croissance pour *Listeria*.

* ENRICHISSEMENT : FRASER 1/2 : 24 h à 30°C et isolement (peu sélectif)

* SUBCULTURE : FRASER : isolement après 24 et 48 h à 30°C (sélectif)

Les milieux d'isolement sont Oxford ou Palcam.

Cette méthode fera prochainement l'objet d'une note de service des Services Vétérinaires. La méthode AFNOR sera disponible en Novembre.

Grâce à son caractère hémolytique, il est possible de distinguer *Listeria monocytogenes* de l'espèce *L. innocua* sur des milieux sélectifs recouverts de gélose au sang. Des sondes froides sont maintenant parfaitement au point pour la recherche spécifique de

L. monocytogenes.

Aucune étude n'a pu mettre en évidence la croissance préférentielle d'une de ces deux espèces dans les bouillons d'enrichissement habituels.

CHAINE *LISTERIA*

Cette chaîne, consacrée aux "pathogènes", proposait outre la numération de *Listeria*, celle d'*Escherichia coli* et des staphylocoques dans le lait cru.

Selon la directive de la CEE du 14 Juin 1992, *Listeria* doit être recherchée :

- dans 25 g de produit pour les fromages autres que ceux à pâte dure

- dans 1 g pour tous les autres produits (en vigueur avant le 1er Janvier 1994).

Cette chaîne étant réalisée dans le lait, nous avons demandé de rechercher *Listeria* dans 1 ml de lait.

Sur les 5 échantillons envoyés à chacun des laboratoires participants, l'un était négatif, un autre contenait *L. innocua*; deux *L. monocytogenes* et un dernier, un mélange de ces deux espèces.

Un traitement original des résultats

L'interprétation des résultats a amené M. LERAY à développer un nouveau programme de traitement des résultats de type "+ ou -".

Dans ce programme, les réponses de type "oui" ou "non" à certaines questions (par exemple, "présence de *Listeria* ?", "présence de *L. monocytogenes* ?") sont transformées en réponses vraies ou fausses par comparaison à la réponse type de référence. Les laboratoires sont ensuite classés selon leur fréquence de réponses justes (voir tableaux 1 et 2)

Tableau 1 : tableau des réponses des laboratoires (8 laboratoires; 5 échantillons, 3 critères)

```

*****
* No !! 1 2 3 ! 1 2 3 ! 1 2 3 ! 1 2 3 ! 1 2 3 *
* !! 1 2 3 ! 1 2 3 ! 1 2 3 ! 1 2 3 ! 1 2 3 *
*-----!-----!-----!-----!-----!-----*
* 1 !! O N O ! O O N ! N N N ! O O N ! O N O *
* 2 !! O N O ! O O N ! N N N ! O O N ! O O N *
* 3 !! O N O ! O O N ! N N N ! O O N ! O O O *
* 4 !! O N O ! O O O ! N N N ! O O N ! O N O *
* 5 !! O N N ! O N N ! N N N ! N N N ! O N N ! O N N *
* 6 !! O N O ! N N N ! N N N ! N N N ! O N N ! O N O *
* 7 !! O N O ! N N N ! N N N ! N N N ! N N N ! O N O *
* 8 !! O O N ! O O N ! N N N ! O O N ! O O N *
*-----!-----!-----!-----!-----!-----*
* REF. !! O N O ! O O N ! N N N ! O O N ! O O O *
*****

```

REPONSES : O = OUI , N = NON , AUX QUESTIONS :

- 1 : PRESENCE DE *LISTERIA*
- 2 : PRESENCE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
- 3 : PRESENCE DE *LISTERIA INNOCUA*

Tableau 2 : tableau de justesse (8 laboratoires; 5 échantillons, 3 critères)

No	1	2	3	4	5	NEV	NL	FLV
1	V	V	V	V	V	8	7	6
2	V	V	V	V	V	6	5	7
3	V	V	V	V	V	8	8	8
4	V	V	V	V	V	7	6	8
5	V	V	V	V	V	8	3	5
FEV %	100	88	75	75	63	88	100	100

NEV : NOMBRE de réponses JUSTES par ECHANTILLON et par CRITERE
 NE : NOMBRE de réponses TOTAL par ECHANTILLON et par CRITERE
 FEV % : FREQUENCE RELATIVE en réponses JUSTES par ECHANTILLON et par CRITERE
 NLV : NOMBRE de réponses JUSTES par LABORATOIRE
 NL : NOMBRE de réponses TOTAL par LABORATOIRE
 FLV % : FREQUENCE RELATIVE en réponses JUSTES par LABORATOIRE

Tableau 5 : classement des laboratoires selon les notes décroissantes

NUMERO	NUMERO	NOTES
1	3	20.0
2	2	19.2
3	1	18.4
4	4	17.6
5	8	16.8
6	6	15.2
7	5	13.6
8	7	12.0

Une autre façon de traiter les résultats est d'attribuer une note différente selon la question posée afin de prendre en compte l'importance législative ou analytique de certains critères :

- exemple (voir tableau 3)
- * "Présence du genre *Listeria* ?" : 2
- * "Présence *L. monocytogenes* ?" : 2
- * "Présence *L. innocua* ?" : 1

Tableau 3 : tableau des notations des laboratoires (8 laboratoires; 5 échantillons, 3 critères)

No	1	2	3	4	5	NOTE	BASE	NOTE
1	2	2	1	2	2	1	2	2
2	2	2	1	2	2	1	2	2
3	2	2	1	2	2	1	2	2
4	2	2	1	2	2	1	2	2
5	2	2	0	2	2	1	2	2
6	2	2	1	0	0	1	2	2
7	2	2	1	0	0	1	2	2
8	2	2	0	2	2	1	2	2
BASE	2	2	1	2	2	1	2	2

Il est possible de réaliser un triple traitement selon le degré d'identification : recherche du genre *Listeria*, recherche de *Listeria monocytogenes*, recherche et identification de *Listeria*. Lors de cette première chaîne, les résultats obtenus selon le type de traitement sont regroupés dans le tableau 6.

TYPE DE TRAITEMENT	NOTE / 20	FREQUENCE DE LABOS SUR 34	SIGNIFICATION ANALYTIQUE
GENRE <i>LISTERIA</i> (aucun faux positif)	20/20	82%	bonnes réponses
	16/20	9%	1 faux négatif
	12/20	9%	2 faux négatifs
<i>L. MONOCYTOGENES</i>	20/20	44%	bonnes réponses
	16/20	29%	1 réponse fausse
	12/20	9%	2 réponses fausses
<i>LISTERIA IDENTIFIEES</i>	20/20	30%	bonnes réponses
	< 20/20 > 16/20	44%	1 à 2 fautes d'identification d'espèces
	< 16/20 > 12/20	26%	+ de 2 fautes dans l'identification d'espèce ou de genre ou <i>Listeria</i> non retrouvé

tableau 6 : résultats obtenus selon le type de traitement

* dont 9% n'ont pas effectué l'identification complète de l'espèce.

Ce type de traitement pourra également être utilisé en dehors des analyses microbiologiques, pour la détection des antibiotiques, par exemple. De même, dans un proche avenir, il sera applicable aux chaînes d'analyse "pathogènes" que nous pensons mettre au point dans les fromages.

Ces notes ne sont attribuées qu'en cas de réponse juste; en cas de réponse fausse, la note est 0. Une note finale sur 20 permet de classer les laboratoires (voir tableau 5). S'il existe plusieurs critères, ce classement peut être différent de celui obtenu par les fréquences de réponses justes (voir tableau 4).

Tableau 4 : classement des laboratoires selon les fréquences de réponses justes

NUMERO	NUMERO	FLV %
1	3	100.0
2	2	93.3
3	1	93.3
4	4	86.7
5	6	80.0
6	8	80.0
7	7	66.7
8	5	66.7

EVALUATION

LE SOMATIC CELLS COUNTER 300

Le Somatic Cells Counter 300 (SCC 300) est un appareil automatique de dénombrement des cellules somatiques du lait. Il est fabriqué par la compagnie américaine BENTLEY INSTRUMENTS INCORPORATED et commercialisé en France par la société ANADIS INSTRUMENT.

PRINCIPE

L'appareil utilise le principe de la cytométrie de flux qui consiste en un comptage microscopique automatisé des cellules isolées et déplacées devant l'objectif du microscope par un liquide en écoulement laminaire.

DESCRIPTION

L'appareil en mode de fonctionnement automatique assure une cadence de 300 analyses par heure. Un autre appareil Bentley (SCC 500), basé exactement sur le même principe et utilisant les mêmes organes internes existe également pour des cadences plus élevées de l'ordre de 600 analyses par heure.

On y distingue quatre parties :

- le système de prélèvement du lait
- le système de mélange du lait à une solution tamponnée de bromure d'éthidium et de transfert de la suspension colorée dans la cellule à circulation.
- le système de comptage microscopique par fluorescence à 640 nm, après excitation par un faisceau laser à 543 nm.
- le système de pilotage de l'instrument et de traitement du signal (micro-ordinateur).

LES ESSAIS

Ils ont été menés au laboratoire de physico-chimie de CECALAIT pendant trois semaines en Novembre 1992.

Ils ont porté sur les points suivants :

- évaluation de la contamination entre échantillons,
- mesure de l'influence du type de conservateur,
- évaluation de la linéarité,
- évaluation de la répétabilité,
- évaluation de la justesse.

Ces points ont été étudiés selon des procédures en accord avec les normes FIL 128:1985 et FIL 141:1991.

① EVALUATION DE LA CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS

Ce critère analytique a été évalué en mode d'analyse automatique et en mode manuel, c'est à dire sans l'agitateur de l'appareil.

Chaque essai a donné lieu à l'analyse d'un même lait et d'eau distillée selon la séquence lait-lait-eau-eau répétée vingt fois. Le taux de contamination (tc) a été estimé à différents niveaux de taux cellulaires (600, 1300 et 1800.10³ cellules/ml) par la formule suivante :

$$tc = ((S(\text{eau } 1) - S(\text{eau } 2)) / S(\text{lait } 2)) \times 100$$

Les essais en mode manuel ont montré une absence totale d'effet de rémanence entre deux échantillons successifs (tc = 0%), ce qui témoigne d'un rinçage efficace du circuit de liquide.

Le mode automatique présente par contre un taux de contamination significatif résultant du transfert de lait d'un échantillon à l'autre par l'agitateur automatique. Avec des flacons de 30 ml, le taux de contamination est toujours apparu inférieur à 1%, qui est le taux limite toléré par le paiement du lait et le contrôle laitier pour la détermination de la composition TB-TP avec des appareils infra-rouge.

② INFLUENCE DU CONSERVATEUR

Quatre modes de conservation ont été comparés :

- absence de conservateur et conservation à 4°C
- dichromate de potassium à 0,1% à 4°C
- bronopol à 0,02% à 4°C.
- bronopol à 0,02% à 20°C.

On observe un effet significatif et marqué entre lait cru et lait additionné de conservateur (dichromate ou bronopol). Les résultats sont décalés proportionnellement aux taux cellulaires, de l'ordre de -7 à -10% pour les laits crus par rapport aux laits avec conservateur.

Ce constat imposera d'effectuer les calibrages avec des laits usant du même mode de conservation que les échantillons de routine.

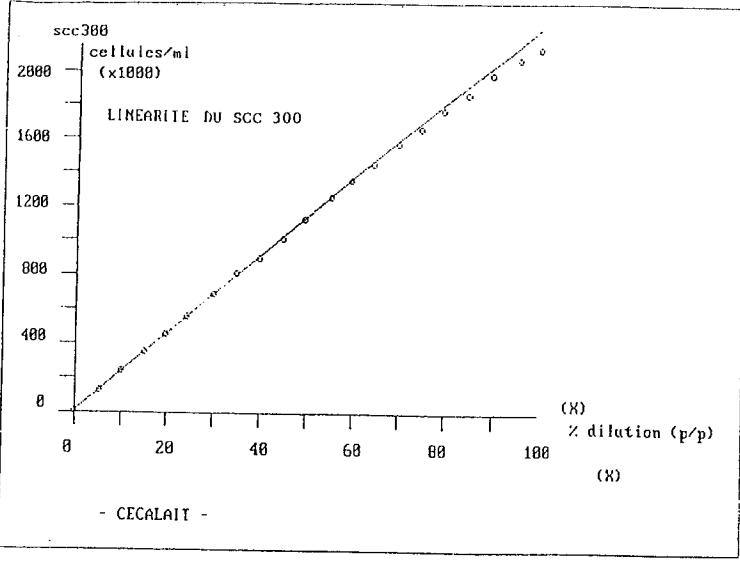
Les laboratoires interprofessionnels analysant des laits de "paiement", sans conservateur, et des laits du contrôle laitier, avec conservateur, devront tenir compte de ce phénomène.

③ LINEARITE

Le SCC 300 peut être considéré comme linéaire sur la plage de 0 à 1 000 000 de cellules/ml. Il présente une légère courbure de la réponse qui, compte tenu de l'étalonnage entre 200 000 et 800 000 cellules/ml, ne devient apparente qu'au-delà de 1 000 000 de cellules/ml (cf Fig. 1).

Les biais à la linéarité constatés de -25 000 à 1 500 000 cellules/ml, de -50 000 à 2 000 000 de cellules/ml et de -100 000 à 2 200 000 cellules/ml restent masqués dans la pratique par l'erreur de répétabilité de la méthode.

Fig. 1 : linéarité du SCC 300 : évaluation sur les moyennes de 4 répétitions



⑥ JUSTESSE

Elle a été testée sur 83 laits individuels de vache, issus de 5 élevages du Jura sur une plage de taux allant de 0 à 2 600 000 cellules/ml. La justesse a pu être appréciée dans sa globalité et par tranche de taux au moyen des moyennes et des écarts-type des écarts (appareil-référence). L'appareil a été calibré à l'aide d'échantillons à teneurs garanties en cellules, préparés par CECALAIT. Les laits ont été analysés en double sur l'appareil et en simple par la méthode de référence (FIL 148:1991).

Le tableau 2 présente les écarts-type résiduels et les précisions d'estimation (intervalles de confiance) par tranche de taux de 500 000.

Tableau 2 : tableau de la justesse (unités : milliers de cellules/ml)

Etendue x1000	n	moyenne	d	Sd	+/- I
0 à 500	32	285	+4,6 NS	25,4	+/-52
500 à 1000	22 * 21	672 682	+18,6 * +13,1 NS	39,4 30,3	+/-63
1000 à 1500	13 * 10	1207 1196	+55,5 * +18,2 NS	74,8 47,6	+/-107
1500 à 2200	9	1880	+13,8 NS	41,1	+/-95
2200 à 2600	7	2464	-64,8 NS	198,4	+/-485
0 à 2200	76 * 72	744 727	+18,5 ** +10,1 **	49,0 32,1	

① REPETABILITE

L'appareil montre une bonne répétabilité. Testée en mode manuel (absence d'effet de contamination) ou en mode automatique (voir tableau 1), la valeur de répétabilité (r) augmente en valeur absolue avec les taux cellulaires. Mais l'écart-type de répétabilité relatif reste toujours inférieur aux 5% spécifiés par la FIL, avec une valeur moyenne proche de 2,5 %.

Tableau 1 : résultats de répétabilité - mode automatique - en milliers

Etendue x1000	n	moyenne	Sr	Sr %	r
0 à 350	17	196	4,15	2,1	12
350 à 800	33	532	12,51	2,4	35
800 à 1500	17	1186	21,98	1,9	62
1500 à 2000	5	1674	41,31	2,5	116
0 à 2000	72	680	17,56	2,6	49

n : nombre d'échantillons pris en compte en quadruples ou en doubles

Sr : écart-type de répétabilité

Sr % : écart-type de répétabilité relatif

r : estimation de la répétabilité

NS : non significatif

* : significatif au seuil de 5%

** : significatif au seuil de 1%

n : nombre d'échantillons

d et Sd : moyenne et écart-type des écarts (appareil-référence)

+/- I : intervalle de confiance pour 95% des résultats

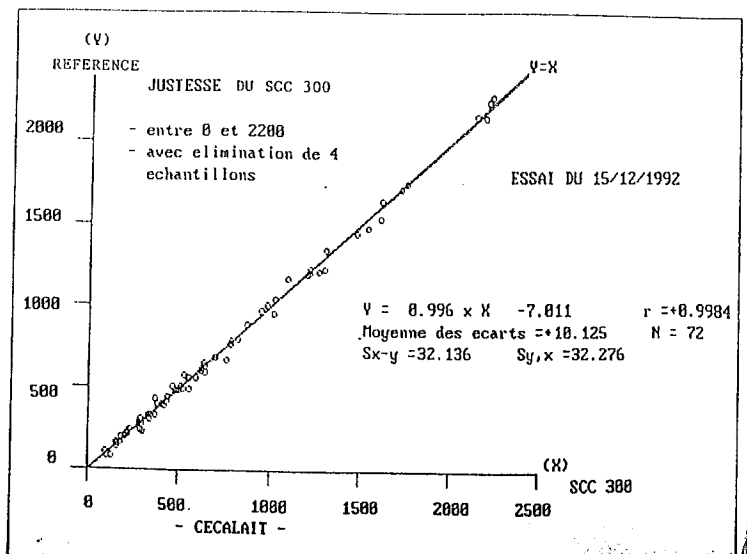
* : calculs avec élimination des points anormaux

La précision d'estimation reste du même ordre de grandeur de 0 jusqu'à 2 200 000, avec des écarts-type des écarts :

- d'environ 30 000 entre 0 et 1 000 000 de cellules/ml

- de 40 à 50 000 entre 1 000 000 et 2 200 000 (cf Fig. 3).

Fig. 3 : justesse jusqu'à 2 200 000 cellules/ml



Au delà, l'estimation de la justesse devient plus délicate en raison des difficultés de comptage visuel des laits fortement chargés (méthode de référence).

La droite de régression linéaire, calculée entre 0 et 2 000 000 montre un bon ajustement de l'étalonnage.

$$(REF.) = 0,9958 \times (SCC300) - 7$$

avec $d = + 10125$; $Sd = 32136$; $Sy,x = 32276$

ou en log base 10

$$\log(REF.) = 1,062 \times \log(SCC300) - 0,1025$$

avec $dlog = + 0,010$; $Sdlog = 0,036$

Le SCC300 fournit une précision d'estimation comparable aux appareils déjà utilisés dans le cadre du paiement du lait et du contrôle laitier. L'étalonnage au moyen des échantillons étalons CECALAIT déjà utilisés au niveau national ne pose pas de problème.

CONCLUSION GENERALE

Testé sur la plage de taux allant de 0 à 2 200 000 cellules/ml, le Somatic Cells Counter 300 donne satisfaction sur les différents critères de précision testés. Au-delà, les résultats perdent beaucoup en précision. Son utilisation aux fins de paiement du lait ne doit, en principe pas poser de problème particulier entre 0 et 2 000 000 de cellules/ml.

LES NORMES CEN

(Résumé de l'intervention de M. GALIBERT (AFNOR) lors de l'assemblée générale de CECALAIT)

Les travaux européens de normalisation en matière de lait relèvent de la compétence du CEN/TC 302 "lait et produits laitiers. Méthodes d'analyse et d'échantillonnage" placé sous la responsabilité du CEN/PC4 "Food".

NB :

CEN : Comité Européen de normalisation

ISO : International Standard Organization

TC : comité technique

PC : comité de programmation

① ELABORATION DES NORMES

Plusieurs cheminements sont possibles dans l'élaboration d'une norme CEN, suivant qu'il existe ou non un document de référence.

➤ **1er cas** : il existe un document de référence (norme ISO, FIL...)

S'il est dans l'une des 3 versions officielles du CEN, à savoir française, anglaise ou allemande, il est soumis :

- soit, à un vote préliminaire (PQ : primary questionnaire) portant sur l'intérêt de travailler sur le sujet (durée : 3 mois), puis au vote formel (durée : 2 mois, cf ci-dessous);

- soit, à une procédure d'acceptation unique (UAP) comportant à la fois les votes PQ et formel, si ce document est déjà largement reconnu.

➤ **2eme cas** : il n'existe pas de document de référence

Le projet de norme est confié à un organe technique (Comité Technique) chargé de son élaboration. Il est ensuite soumis à une enquête publique du CEN puis au vote formel.

② VOTE FORMEL

Contrairement à l'ISO où chaque pays dispose d'une seule voix, quelle que soit son importance économique, le CEN a instauré un système de vote pondéré en fonction de ce critère. Le poids attribué à chaque pays est le suivant :

10 : Allemagne, France, Italie, Royaume-Uni

8 : Espagne

5 : Autriche, Belgique, Grèce, Pays-Bas, Portugal, Suède, Suisse

3 : Danemark, Finlande, Irlande, Norvège

2 : Luxembourg

1 : Islande.

4 conditions sont requises pour l'adoption d'une norme européenne :

- majorité simple (50 voix sur 98),

- un minimum de 25 voix pour,

- un maximum de 3 pays contre,

- un maximum de 22 voix contre.

Si le résultat du vote (CEE + AELE) est positif, tous les pays doivent entériner le résultat et donner à la norme un statut national, quel qu'ait été leur vote (positif ou négatif).

Si le résultat du vote (CEE + AELE) est négatif, il est procédé à un second décompte réservé aux seuls membres de la CEE. Si ce décompte est positif, les 12 pays de la CEE doivent donner à ce projet un statut de norme nationale, ainsi que les pays de l'AELE ayant émis un vote positif.

⊕ ACCORDS DE VIENNE

Un accord de coopération, dit accord de Vienne, a été signé par le CEN et l'ISO afin d'éviter les problèmes de redondance et de compétition. Il prévoit :

- la reprise des normes ISO par le CEN (vote parallèle)

- délégation des travaux CEN à l'ISO ou l'inverse

⊕ APPLICATION

Toutes les normes publiées par le CEN doivent être obligatoirement reprises intégralement par les instituts de normalisation membres du CEN. Les normes nationales qui seraient en contradiction doivent être retirées.

Ce caractère de reprise obligatoire distingue les normes CEN des normes ISO, où il y a une reprise facultative, un contenu modifiable et pas de retrait des normes nationales. Ceci explique la nécessaire implication des industriels et laboratoires tant privés que publics dans les travaux de normalisation entrepris au niveau du CEN et contribuant à solidifier l'édifice européen.

NORMES ET PROJETS DE NORMES PARUS RECEMMENT

Liste des révisions ou des nouvelles normes FIL reçues entre Avril et Juillet 1993.

LAIT : 20B:1993 (équivalente à ISO/DP 8968) Détermination de la teneur en azote

LAIT ET CREME EN POWDRE : 26A:1993 (équivalente à ISO/CD 5537) Détermination de la teneur en eau

LAIT ET PRODUITS LAITIERS : 156:1992 (équivalente à ISO/CD

11813) Détermination de la teneur en zinc (*méthode spectrométrique d'absorption avec flamme*)

166:1993 Directives pour les pâtes à tartiner

Du côté de L'AFNOR

LAIT ET BOISSONS LACTEES : **PROJET DE NORME NF ISO 11816 (V 04-054)** Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline (*méthode fluorimétrique*)

PETITE ANNONCE

Laboratoire de l'INRA de Theix cède à titre gracieux

Un compteur de particules COULTER COUNTER en état de fonctionnement, moyennant de légères réparations

Pour tout renseignement, téléphonez au 73/62/41/91