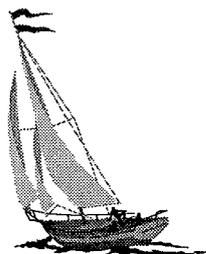


CENTRE D'ÉTUDE ET DE CONTRÔLE
DES ANALYSES EN INDUSTRIE LAITIÈRE

juillet 1999

N°30



LA LETTRE DE CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 03.84.73.63.20 TELECOPIE : 03.84.73.63.29
E-mail : bapt@poligny.inra.fr

Rédaction achevée le 23 juillet 1999

Equipe rédactionnelle : A. BAPTISTE; O. LERAY; P. ROLLIER, Ph. TROSSAT

Relecture par : B. LOMBARD et les auteurs

SOMMAIRE

Méthodes d'analyse de *Listeria monocytogenes*

Normes et projets de normes parus récemment

Nouveautés dans la réglementation

Rendez-vous

Dosage des protéines laitières :
2e partie : évaluation du spectrophotomètre CECIL 2000

Du côté de la biblio...

BONNES VACANCES

METHODES D'ANALYSE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

(résumé de l'intervention de Mme ROLLIER de CECALAIT lors de l'Assemblée générale de CECALAIT)

L *isteria monocytogenes* est une préoccupation constante en hygiène alimentaire en général, et dans le secteur laitier, en particulier, du fait de sa fréquence dans l'environnement et de son extrême résistance à de sévères conditions physico-chimiques. Des critères réglementaires clairement établis depuis 1992 ont conduit à l'accroissement du nombre de contrôles officiels et d'autocontrôles de la production à la distribution. D'où une forte augmentation du nombre de méthodes de recherche disponibles, de leur facilité de mise en œuvre, de leur spécificité et de leur rapidité. La méthode de référence ISO 11290-1/2 a, en outre, été l'objet d'un programme européen de grande ampleur, destiné à établir ses performances de fidélité.

D epuis le début de l'année 1999, une succession d'alertes à *Listeria monocytogenes* dans les aliments et deux cas mortels de listériose ont focalisé l'attention du public et des professionnels sur ce problème d'hygiène alimentaire.

La listériose est une maladie plutôt rare – 225 cas en France en 1997- dont l'origine est essentiellement alimentaire. Se traduisant par des symptômes similaires à ceux d'une grippe et sans conséquence chez la plupart des sujets, elle a en revanche des conséquences graves, méningite ou septicémie très souvent mortelles, chez des sujets à risque : les personnes âgées, les nouveaux-nés, les personnes immunodéprimées à la suite de traitements ou de maladies. Chez les femmes enceintes, elle aboutit le plus souvent à un avortement au cours des 2^e et 3^e trimestres ou à la mort du nouveau-né. Elle est due au germe *Listeria monocytogenes*, dont la dose infectante est mal connue et vraisemblablement dépendante de la personne et des conditions de contamination. Or ce germe est, à la fois, très fréquent dans l'environnement et exceptionnellement résistant.

En tout état de cause, la réglementation laitière, à savoir la directive CEE 92/46 et l'arrêté du 30/3/ 1994 spécifie son absence dans 25 g (lait, fromages...) ou plus rarement dans 1 g. Cependant en France, la note de service de la DGAL du 13/7/1994 autorise une dérogation pour les produits à base de lait présentant des caractéristiques traditionnelles en y tolérant 100 germes / g à la DLC / DLUO.

La détection de *L. monocytogenes* dans les aliments est donc un enjeu majeur en hygiène alimentaire. D'où une demande forte pour d'une part, l'amélioration de la rapidité, de la facilité et de la spécificité des méthodes ; d'autre part, la détermination des performances analytiques des méthodes de référence.

Un germe résistant et ubiquiste

Listeria monocytogenes est un bacille Gram +, mobile à 22°C et non à 37°C, aéro-anaérobie, c'est à dire préférant les tensions réduites en oxygène – par exemple celles observées dans les conditionnements sous vide ou sous atmosphère modifiée -. C'est un germe remarquablement résistant aux agents chimiques, ainsi qu'à des conditions sévères de température, pH ou salinité, comme le montre le tableau 1 ci-contre.

	température	pH	NaCl
optimum de croissance <i>optimal growth</i>	30 – 37°C	7,2 – 7,6	0,5 – 5%
croissance possible <i>possible growth</i>	1 – 45°C	4,7 – 9,6	maxi 12%
survie possible <i>possible survival</i>	30 mn, 55°C	4,2 (> 24h, 37°C)	maxi 30% (5 jours à 37°C) (5 days at 37°C)

tableau 1 : croissance et résistance de *Listeria monocytogenes*
(table 1 : growth and resistance of *Listeria monocytogenes*)

Dès lors, on le rencontre dans tous les milieux : l'air, le sol, l'eau, les poussières, les sédiments, les végétaux, les aliments, les porteurs sains... En ce qui concerne les aliments, la DGCCRF conduit, tous les ans, des plans de surveillance de leur taux et de leur fréquence de contamination. Les plans de 1993 à 1995 montrent ainsi que celle-ci, relativement importante pour les produits carnés (avec environ 15% d'échantillons positifs) va ensuite en décroissant pour les produits de la mer, les produits végétaux, les pâtisseries et les produits laitiers. Cependant, la contamination des produits laitiers est souvent spécifique aux fromages à pâte molle et présente alors des taux généralement plus élevés que les autres aliments.

L'observation des principales épidémies d'origine alimentaire recensées depuis le début des années 80, montre de même, une grande diversité des aliments responsables, depuis les choux jusqu'à la charcuterie (rillettes, hot dog...), en passant par les produits laitiers (fromages à pâte molle, lait pasteurisé...) et sans oublier les produits de la mer ! Elle souligne, en revanche, une large prédominance du sérotype 4b, en tant qu'agent responsable. Enfin, elle dessine une tendance récente à la diminution de la durée et du nombre de cas des épidémies. Ce résultat positif est sans aucun doute à mettre au crédit de l'amélioration du réseau épidémiologique, avec notamment des contrôles officiels et des

autocontrôles plus fréquents à tous les stades, de la fabrication à la distribution et de l'amélioration des méthodes d'analyse.

Une nécessaire évolution des méthodes

Cette augmentation du nombre des contrôles, à relier au respect des critères fixés par la réglementation, exigeait une amélioration des méthodes disponibles pour la recherche de *Listeria*

monocytogenes. En effet, les méthodes classiques, antérieures à 1988, sont de mise en oeuvre particulièrement longue et délicate.

Le tableau 2, ci-dessous retrace brièvement l'évolution des méthodes

tableau 2 : évolution des méthodes de recherche et de dénombrement de *Listeria monocytogenes*

table 2 : evolution of the methods of detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*

Étapes importantes important steps	Enrichissement enrichment	Géloses d'isolement sélectif agar for selective isolation	Identification	Numération enumeration
Méthodes classiques classical methods 1985 – 88	LEB LEB modifié	MMA + transillumination oblique + Henry illumination + identification	Galerie Classique classic test strip + hémolyse + hemolysis ou Camp test	NPP : LEB MPN : LEB + MMA + Identification
Amélioration des méthodes improvement of the methods 1988	Fraser ½ + Fraser (1993)	PALCAM (1988) OXFORD (1989) +identification	Mini galeries micro strips (API <i>Listeria</i>) (1990)	Gélose PALCAM agar + Identification
Méthodes rapides rapid methods <i>Listeria spp</i> 1988	milieu d'enrichissement propre à la méthode		Immuno (1988) immunoassays (1988) Sondes ADN DNA probes (1989)	
Méthodes rapides rapid methods <i>L. monocyt.</i> 1992	enrichment medium corresponding to each method	ALOA (1998) Rapid L mono (1998)	Immuno (1995) immunoassays (1995) Sondes ADN, PCR DNA probes, PCR (1992)	ALOA Rapid L mono

LEB : *Listeria* enrichment broth

MMA : modified Mac Bride Agar

NPP : nombre le plus probable = MPN: most probable number

Les méthodes de référence, c'est à dire, aujourd'hui, NF EN ISO 11290-1 et 2 de février 1997 et août 1998 (V 08-028-1 et -2), d'une part et FIL 143A:1995, d'autre part, ont profité de l'amélioration des milieux d'enrichissement et des géloses, signalée dans le tableau 2. Les performances analytiques de la méthode ISO viennent, en outre, d'être validées dans le cadre d'un vaste programme européen (cf ci-dessous). Leur durée de réalisation reste cependant trop longue pour les besoins routiniers des laboratoires. D'où la floraison de méthodes rapides, pour le genre *Listeria* d'abord, puis pour

l'espèce *L. monocytogenes*. Elles sont pour la plupart validées par l'AFNOR et ont permis une réduction très nette de la durée des analyses, comme le montre le tableau 3 ci-dessous. Cependant, l'étape d'enrichissement restant nécessaire, il est difficile, pour le moment, de descendre sous 48 heures.

Tableau 3 : principales méthodes rapides de détection des *Listeria*
 table 3 : major rapid methods for the detection of *Listeria*

Principe	Méthode	Détection (detection)		Durée (h) (duration)		
		<i>Listeria</i>	<i>L. mono</i>	24	48	72
Sonde	Gene Trak					
nucléique	Gen Probe					
DNA probe	Probelia					
	Transia					
Immuno-enzym.	Tecra					
	Vidas					
	Eia Foss					
Immuno-magnét.	Lister-screen					
Immuno-chromato	Listeria Rapid Test					

(en partie d'après Revue Laitière Française n° 547, février 1995)

CECALAIT organisant des essais interlaboratoires d'aptitude pour la détection de *Listeria* dans le lait depuis 1993, a pu observer les changements dans les pratiques des laboratoires. Ceux-ci ont clairement suivi l'évolution et la diversification des méthodes proposées. En témoigne l'ensemble des graphiques présentés dans la figure 1, à la fin de cet article. Elle compare les milieux d'enrichissement, les milieux d'isolement et les techniques d'identification utilisés entre le premier essai interlaboratoire en mars 1993 et le dernier essai en date (avril 1999).

Il faut noter cependant que les utilisateurs de méthodes rapides continuent à utiliser souvent les méthodes classiques pour confirmation. C'est dire l'intérêt que vont présenter les conclusions du programme européen de validation des méthodes ISO 11290-1 & 2 de détection et de dénombrement de *Listeria monocytogenes*.

Le programme européen sur les méthodes microbiologiques.

Il s'agit d'un programme de validation, par essais inter-laboratoires, de six méthodes microbiologiques ISO, destiné à y introduire des paramètres de fidélité, qui seront repris dans les normes européennes et internationales par le CEN et l'ISO. Les méthodes concernées portent sur la détection et/ou le dénombrement des microorganismes pathogènes suivants : *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*.

Après l'étude concernant *Bacillus cereus*, dont nous avons rendu compte, en son temps, (cf La Lettre de CECALAIT, n°26), ce sont les validations des méthodes de détection et dénombrement de *Listeria monocytogenes* qui ont été menées à bien.

ETUDES COLLABORATIVES

Les coordinateur et partenaires du programme sont :

- ♦ coordinateur de l'ensemble du projet : AFSSA (et Mme LAHELLEC)
- ♦ partenaires : le RIVM aux Pays-Bas et le MAFF-CSL au Royaume Uni; ce dernier étant responsable des études sur *L. monocytogenes*
- ♦ sous-contractants :
 - l'Institut Pasteur de Lille, pour la vérification des protocoles expérimentaux,
 - l'ENILBIO de Poligny pour les traitements statistiques de détection,
 - CECALAIT pour la préparation, la mise au point, la définition des paramètres de conservation et l'expédition des échantillons de fromage.

Chacune des évaluations utilise des échantillons de référence (des capsules préparées par le RIVM), et trois types d'aliments à contamination artificielle :

- ♦ des échantillons de fromage,
- ♦ des échantillons de viande déshydratée, préparés par le MAFF-CSL,
- ♦ des échantillons d'un autre aliment en poudre, ici de l'œuf, préparés par le RIVM.

Ils ont tous été contaminés, à plusieurs niveaux d'inoculum, à la fois, par une flore typique de l'aliment concerné, ainsi que par des souches de *Listeria monocytogenes* et *L. innocua* d'origine alimentaire.

Les niveaux finals de contamination sont décrits dans le tableau 4, en 2 parties ci-dessous.

échantillon sample	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i>
ISO 11290-1 : détection (detection)		
N (négatif) (negative)	0	50 - 100 / 25 g
B (bas) (low)	5 - 10 / 25 g	50 - 100 / 25 g
H (haut) (high)	50 - 100 / 25 g	50 - 100 / 25 g
référence reference	≈ 20 <i>L. monocytogenes</i> par capsule ≈ 20 <i>L. monocytogenes</i> per capsule	

échantillon sample	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i>
ISO 11290-2 : dénombrement (enumeration)		
N (négatif) (negative)	0	0
B (bas) (low)	2.5 10 ²	2.5 10 ²
M (médian) (medium)	2.5 10 ³	2.5 10 ³
H (haut) (high)	2.5 10 ⁴	2.5 10 ⁴
référence reference	≈ 5000 <i>L. monocytogenes</i> par capsule ≈ 5000 <i>L. monocytogenes</i> per capsule	

Tableau 4 : niveaux de contamination des échantillons d'aliments utilisés pour les études de détection et de dénombrement de *L. monocytogenes*

Table 4 : range of *L. monocytogenes* in the samples used in the detection and enumeration studies.

Les études collaboratives ont finalement rassemblé :

♦ Pour l'étude de la détection :

19 laboratoires de 14 pays européens qui ont chacun analysé un jeu de 15 échantillons de chaque aliment, à savoir 5N, 5B, 5H ; ainsi que les 5 échantillons de référence correspondants.

♦ Pour l'étude du dénombrement :

21 laboratoires de 16 pays européens qui ont chacun analysé en double aveugle un jeu de 8 échantillons de chaque aliment, à savoir 2N, 2B, 2M et 2H ; ainsi que les 2 échantillons de référence correspondants.

Les principes des méthodes ISO 11290-1 et ISO 11290-2 se décomposent en plusieurs phases successives à partir de la préparation de la suspension mère

♦ Pour la détection, ISO 11290-1 :

- enrichissement primaire en milieu Fraser 1/2,
- enrichissement secondaire en milieu Fraser,
- isolement sur géloses sélectives OXFORD et PALCAM, à partir des cultures obtenues à l'issue de chacune des deux étapes d'enrichissement,
- confirmation du genre, puis de l'espèce au moyen de tests biochimiques, physiologiques et morphologiques appropriés (catalase, coloration de Gram, mobilité, éventuellement illumination de Henry ; puis hémolyse, utilisation des glucides et test de CAMP). A noter que l'étude collaborative n'a imposé que

les tests de la catalase, de l'utilisation des glucides et de CAMP ; les autres étant facultatifs.

♦ Pour le dénombrement, ISO 11290-2 :

- revivification pendant 1h à 20°C,
- isolement sur gélose sélective PALCAM, à partir de l'échantillon, s'il est liquide, ou de la suspension mère (préparée en utilisant comme diluant, soit l'eau peptonnée tamponnée, soit le milieu de base du Fraser 1/2), puis de leurs dilutions décimales,
- confirmation du genre, puis de l'espèce comme ci-dessus,
- à partir du nombre de colonies confirmées, calcul du nombre de *L. monocytogenes* par g.

RESULTATS

DETECTION

Les résultats montrent une bonne sensibilité générale de la méthode, environ 86% des échantillons positifs, même faiblement contaminés, sont détectés. Ils ne font apparaître aucune différence entre l'utilisation de la gélose OXFORD et de la gélose PALCAM. Enfin, ils confirment la nécessité de maintenir deux étapes d'enrichissement.

DENOMBREMENT

Les résultats des comptages ont été transformés en log. Puis les résultats aberrants ont été éliminés pour permettre la détermination des valeurs de répétabilité et de reproductibilité.

Le tableau 5 présente les valeurs obtenues

Tableau 5 : répétabilité et reproductibilité de la méthode ISO 11290-2

Table 5 : repeatability and reproducibility of ISO 11290-2

Echantillons samples	Taux range	Nombre labos number of labs	r (log)	R (log)
Fromage cheese	B	16	0.29	0.44
	M	16	0.60	0.71
	H	16	0.35	0.50
Viande meat	B	17	0.31	0.55
	M	17	0.56	0.63
	H	17	2.29	2.38
Œuf egg	B	16	1.28	1.28
	M	16	0.47	0.61
	H	16	2.26	2.29
Référence		18	0.32	0.67

avec / with

r : répétabilité : *repeatability*.

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 : reproductibilité : *reproducibility*

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.

B : niveau bas : *low range*

M : niveau médian : *medium range*

H : niveau haut : *high range*

Le tableau montre de grandes différences selon les types d'aliments et illustre la difficulté de mise en œuvre de la méthode, étant donné la non-spécificité de la gélose vis à vis de *L. monocytogenes*

CONCLUSIONS

Les conclusions de cette étude ont été transmises au CEN et à l'ISO en tant que recommandations pour l'évolution des normes. Les propositions acceptées pour la normalisation sont :

POUR LA NORME ISO 12990-1(DETECTION)

- ◆ reprendre les critères de performance ; sensibilité, spécificité, accordance, concordance, odds ratio, obtenus et mis au point dans cette étude (*)

POUR LA NORME ISO 12990-2(DENOMBREMENT)

- ◆ reprendre dans sa totalité, le tableau des répétabilités et reproductibilités dans le corps de la norme 11290-2. En effet, vu la dispersion des résultats, aucune valeur moyenne ne peut s'en dégager.

- ◆ approfondir la recherche sur l'étape de revivification d'une heure

POUR LES DEUX TEXTES

- ◆ Corriger une valeur erronée dans l'essai d'hémolyse en micro-plaque (% d'hématie de mouton = 2%, valeur vraie)

- ◆ mener des études pour proposer un milieu permettant de mieux différencier *L. monocytogenes* des autres espèces, notamment *L. innocua*.

Conclusion générale

La prise en compte de ces recommandations va donc mener à une révision prochaine des normes EN ISO 11290-1 et -2.

En outre, la tendance au développement de méthodes plus rapides et plus spécifiques, observée dans les tableaux 2 et 3, devrait permettre de détecter plus facilement et plus vite *Listeria monocytogenes*. Prévenir et enrayer les listérioses devrait dès lors devenir plus aisé. Cependant l'ubiquité et la résistance de ce germe doivent faire penser « que le risque 0 n'existe pas » et inciter au développement de l'information des consommateurs, notamment les sujets à risque.

BIBLIOGRAPHIE

- ◆ arrêté 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. Journal Officiel de la République Française du 21/4/1994
- ◆ BIND J.L. ; DELAVAL J. Les listérioses. Bull. Soc. Vét. Prat. de France, 1994, V. 78, N. 6-7, p. 387-407
- ◆ Directive 92/46 CEE du Conseil arrêtant 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 CE L 268 du 14/9/1992
- ◆ FIL 143A:1995 : lait et produits laitiers : recherche de *Listeria monocytogenes*
- ◆ ISO 11290-1 (NF EN ISO 11290-1- V 08-028-1, février 1997) : microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 1 : méthode de recherche
- ◆ ISO 11290-2 (NF EN ISO 11290-2- V 08-028-2, août 1998) : microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 2 : méthode de dénombrement.
- ◆ note de service DGAL/SDHA/N94/N° 8121 du 13/7/1994. Conditions d'agrément des établissements de traitement et de transformation du lait et des produits à base de lait. In Hygiène alimentaire « Lait et produits laitiers. n° 148 VI. Direction des Journaux Officiels, Paris, 1996.
- ◆ Revue Laitière Française, 1995, n° 547, p. 22

& aussi pour en savoir plus

- ◆ CATTEAU M. *Listeria monocytogenes* : un problème de méthode d'analyse ? Bull. Soc. Fr. Microbiol, 1999, V. 14, N. 2, p. 99-101
- ◆ JICQUEL J.L. *Listeria* : nouveau tour de vis pour la sécurité alimentaire. RIA, 1999, n° 591, p. 34-36
- ◆ MOREL F. Des fromagers condamnés à l'excellence. Process, 1999, n° 1148, p. 6-7
- ◆ TJOMB P. *Listeria* : les efforts ne sont pas récompensés. RIA, 1999, n° 590, p. 46-48
- ◆ site d'hygiène alimentaire de Bruno Peiffer : <http://www.chez.com/guatemala/index.html>
- ◆ U.S. Food & Drug Administration : Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook : <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>

Liste des abréviations

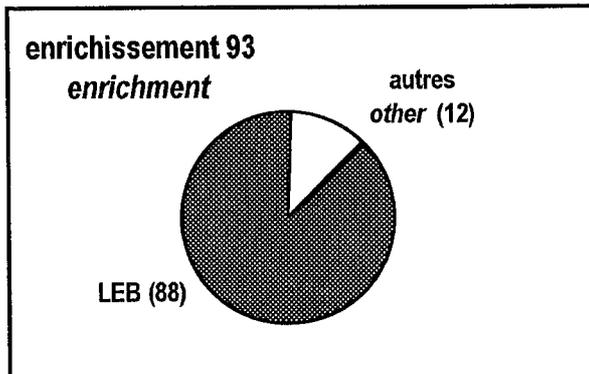
AFNOR : Association Française de Normalisation
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
CEN : Comité Européen de Normalisation
DGAL : Direction Générale de l'Alimentation
DGCCRF : Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes
DLC / DLUO : date limite de consommation / date limite d'utilisation optimale
ENILBIO : Ecole Nationale d'Industrie Laitière et des Biotechnologies
ISO : International Standard Organization
MAFF-CSL : Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Central Science Laboratory
RIVM : Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu

Figure 1 Essais interlaboratoires CECALAIT dans le lait
comparaison des méthodes entre 1993 et 1999

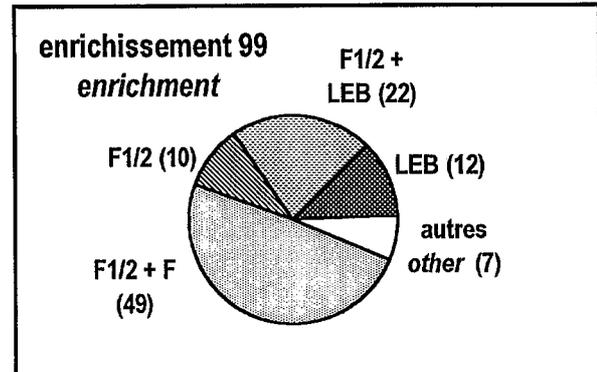
Figure 1 : CECALAIT ringtests : comparison of methods between
1993 and 1999

Mars 1993 (33 laboratoires)
March 1993 (33 labs)

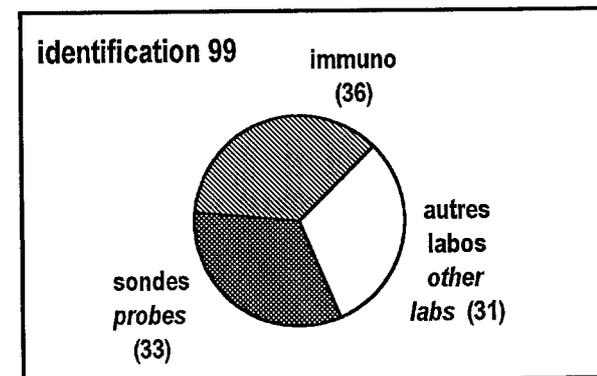
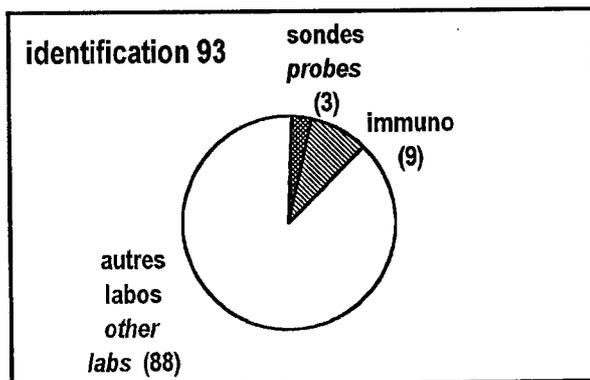
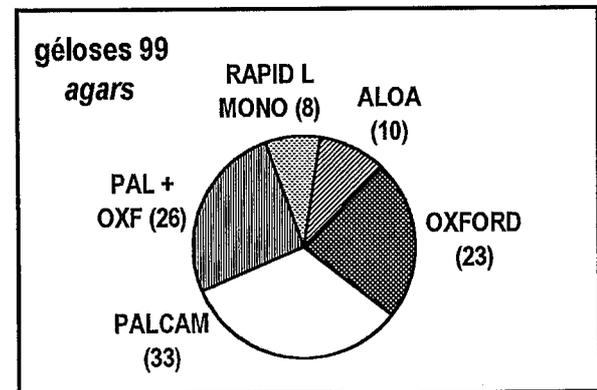
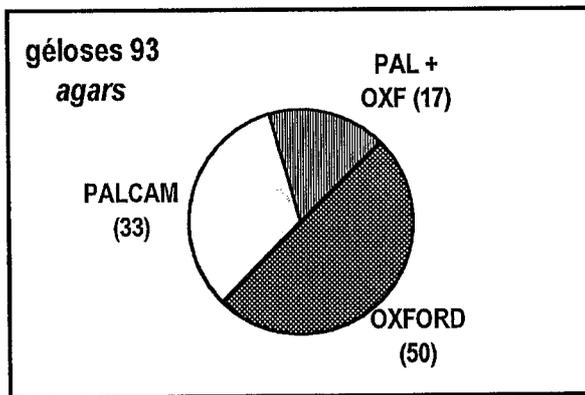
Avril 1999 (42 laboratoires)
April 1999 (42 labs)



LEB : *Listeria* enrichment broth



F : milieu de Fraser F1/2 : milieu de Fraser ½



(% des laboratoires) / (% of labs)

*

sensibilité : pourcentage d'échantillons positifs reconnus correctement

spécificité : pourcentage d'échantillons négatifs reconnus correctement

accordance : paramètre équivalent, en gros, à la répétabilité dans les études quantitatives

concordance : paramètre équivalent, en gros, à la reproductibilité dans les études quantitatives

odd ratio : paramètre permettant d'évaluer le degré des variations entre laboratoires, par comparaison entre les valeurs d'accordance et de concordance

Définitions plus précises auprès de Cecalait, sur demande.

NORMES ET PROJETS DE NORMES PARUS RECEMMENT

(reçus entre Avril et Juillet 1999)

NORMES AFNOR

XP V 01-002, décembre 1998 (ICS 01.040.67 : vocabulaires en technologie agro-alimentaire, ICS 67.020 : procédés dans l'industrie alimentaire)

HYGIENE ET SECURITE DES PRODUITS ALIMENTAIRES.

Glossaire hygiène des aliments.

Ce texte donne, en français et en anglais, une définition des principaux termes liés à l'hygiène des aliments. Basé sur les documents rédigés dans le cadre du Comité Hygiène du Codex Alimentarius, il s'intéresse au vocabulaire de l'hygiène, de l'analyse des risques et de l'HACCP.

PROJETS DE NORMES AFNOR, SOUMIS A ENQUETE

Projet NF ISO 7218 / Amendement 1 (V 08-002 / Amendement 1). Microbiologie des aliments – Règles générales pour les examens microbiologiques

Projets NF EN ISO 16649-1 et -2 (V 08-031-1 et -2) Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* présumés.

Partie 1 : technique de comptage des colonies à 44°C au moyen de membranes et d'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D glucuronique
Partie 2 : technique de comptage des colonies à 44°C au moyen d'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D glucuronique.

➤ Signalons également la parution de nouveaux recueils de normes françaises et internationales pour :

• « **Lait et produits laitiers** ». Cet ouvrage, divisé en 2 tomes regroupe l'ensemble des normes et de la réglementation relatives au lait (tome 1) et aux produits laitiers (tome 2). Cette cinquième édition remplace celle de 1993.

• « **contaminants physico-chimiques** ». Cet ouvrage regroupe l'ensemble des méthodes horizontales d'analyse de contaminants (nitrates, nitrites, pesticides) dans les produits alimentaires.

• « **méthodes statistiques** ». Cet ouvrage est divisé en 5 tomes, respectivement consacrés au vocabulaire, aux estimations et tests statistiques, au contrôle statistique d'acceptation, à la maîtrise statistique des processus, au traitement des résultats de mesure. Cette 8^e édition remplace l'édition de 1996.

➤ Du côté de l'AOAC International, signalons la parution de la mise à jour 1999 de l'Official Methods of Analysis, 16^e édition (OMA).

↳ Certains d'entre vous, nous ont demandé des précisions sur la méthode de détermination titrimétrique du calcium dans le lait, récemment publiée par l'ISO (**ISO 12081 de décembre 1998**), que nous avons signalée dans le n° 29 de La Lettre de CECALAIT. Il s'agit, en fait, de la reprise de la norme FIL 36A :1992, basée sur :

- la précipitation des matières protéiques de la prise d'essai par l'acide trichloracétique et une filtration ultérieure,
- la précipitation du calcium dans le filtrat sous forme d'oxalate de calcium, puis sa séparation par centrifugation,
- la titration du précipité lavé et dissous par le permanganate de potassium.

NOUVEAUTES DANS LA REGLEMENTATION

FRANCE

Arrêté du 18 mai 1999 modifiant l'arrêté du 1^{er} juillet 1976 relatif aux aliments destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge. Ce texte précise principalement la teneur minimale en protéines laitières dans les préparations comprenant du fromage ou un autre produit laitier : 2,2 g/ 100 kcal (JO France du 2/6/1999)

Avis du 26/5/1999 modifiant la liste du 8 février 1998 (et ses avis modificatifs), relatifs à la mise sur le marché communautaire de laits de consommation et de produits à base de lait

Ce texte complète la liste des établissements conformes aux dispositions de l'arrêté du 2 mars 1995 relatif à l'agrément des centres de collecte, de standardisation, de traitement, de transformation du lait et des produits à base de lait.

EUROPE COMMUNAUTAIRE

➤ Comme à l'accoutumée, le **règlement n° 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale** a vu paraître un grand nombre de textes modificatifs.

• Le corps du règlement a été modifié par le **règlement n° 1308/1999 du 15/6/1999 (JOCE L156 du 23/6/1999)** qui confie notamment la responsabilité de la procédure de fixation des LMRs à l'Agence Européenne pour l'Evaluation des Médicaments.

• L'annexe I a été modifiée par les **règlements 997/1999 et 998/1999 du 11/5/1999 (JOCE L 122 du 12/5/1999)**. Ces textes y rajoutent notamment une LMR pour le lait de 30 µg/kg de danofloxacin

• L'annexe II a été modifiée par les **règlements 953/1999 du 5/5/1999 (JOCE L 118 du 6/5/1999), 997 et 998/1999**. Se rajoutent aux substances non soumises à LMR des vitamines ou certaines substances utilisées dans les médicaments homéopathiques vétérinaires.

• L'annexe III a été modifiée par les **règlements 953/1999, 954/1999 du 5/5/1999 (JOCE L118 du 6/5/1999), 997/1999**. Ces textes y rajoutent notamment les LMRs provisoires suivantes pour le lait : bacitracine : 150 µg/kg, pirlimycine : 100 µg/kg, imidocarbe : 50 µg/kg, carazolol : 1 µg/kg, α-cyperméthrine et cyperméthrine : 20 µg/kg, oxyclonazide : 10 µg/kg, morantel : 100 µg/kg.

Décision 1999/309/CE de la Commission du 23/4/1999 concernant le programme de travail 1999 relatif au contenu en protéine des principaux produits laitiers. (JOCE L119 du 7/5/1999). Elle concerne principalement les données chiffrées à fournir au service des Statistiques de la Commission.

Règlement n° 881/1999 de la Commission du 28/4/1999, modifiant le règlement CE n° 1854/96 établissant une liste des méthodes de référence à appliquer à l'analyse et à l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers conformément à l'organisation commune des marchés. (JOCE L111 du 29/4/1999). Ce texte complète le règlement n°2721/95 de la Commission du 24/11/1995. Toute analyse physico-chimique ou microbiologique sur le lait ou sur un produit laitier, effectuée dans le cadre du marché communautaire doit utiliser une méthode figurant sur la liste donnée en annexe de ce texte. La version actuellement valide de cette liste est donc celle fournie par le règlement 881/1999.

Directive 1999/39/CE de la Commission du 6/5/1999 modifiant la directive 96/5 concernant les préparations à base de céréales et les aliments pour bébés destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge (JOCE L124 du 18/5/1999)

&
directive 1999/50/CE de la Commission du 25/5/1999 modifiant la directive 91/321 concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite (JOCE L139 du 2/6/1999)

Ces deux textes fixent notamment la teneur maximale en résidus de pesticides admissible dans ces préparations (0,01 mg/kg de produit)

RENDEZ-VOUS

➔ MANIFESTATIONS FIL : RAPPEL

15 – 18 SEPTEMBRE 1999 : ATHENES, GRECE, 83es SESSIONS ANNUELLES

Pour tout renseignement, prendre contact avec

FIL Secrétariat

41, square Vergote
B-1030 BRUXELLES
BELGIQUE

Tel : 32/2.733.1690

Fax : 32/2.733.04.13

mel : info@fil-idf.org

http://www.fil-idf.org

4 – 7 OCTOBRE 1999 : SAN FRANCISCO, USA, SEMAINE DE LA NUTRITION

Pour tout renseignement : **FIL** ou

Anne Divjak, secretary USNAC

1250 H Street NW, Suite 900

WASHINGTON DC 20005

USA

tel : 1/202.737.4332

télécopie : 1/202.331.7820

mel : adivjak@idfa.org

➔ RAPPELS

1 – 4 AOUT 1999 : IAMFES ANNUAL MEETING, A DEARBORN , MICHIGAN, ETATS-UNIS

International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians

Pour tout renseignement, prendre contact avec

IAMFES

6200 Aurora Ave Suite 200W

DES MOINES IA 50322-2863

ETATS-UNIS

Tel : +1/800.369.6337 ou +1/515.276.3344

Télécopie : +1/515.276.8655

mel : iamfes@iamfes.org

http://www.iamfes.org

26 – 30 SEPTEMBRE 1999 : HOUSTON, (TEXAS) USA, 113^e RENCONTRES ANNUELLES DE L'AOAC INTERNATIONAL

Renseignements auprès de la **FIL**

**3 – 10 OCTOBRE 1999 : SYDNEY, AUSTRALIE, 10^e
CONGRES MONDIAL DE SCIENCE ET
TECHNOLOGIE DES ALIMENTS**

Pour tout renseignement, prendre contact avec
IUFoST Congress 10, GPO Box 128,
Sydney NSW 2001 AUSTRALIE
Tel : +61 2 9262 2277
Fax : +61 2 9262 2323
mel : Tourhosts@tourhosts.com.au

**18 – 21 OCTOBRE 1999 : METROLOGIE 99, 9^e
CONGRES INTERNATIONAL, A BORDEAUX**

Pour tout renseignement, prendre contact avec
Secrétariat Général Métrologie 99
Sandrine GAZAL
Maison de l'entreprise
429, rue de l'Industrie
34966 MONTPELLIER CEDEX 2
Télécopie : +33/(0)4.67.91.33.43

➤ AUTRES MANIFESTATIONS FIL

17 - 19 AOUT 1999 : , MUTARE , ZIMBABWE,

Quality management for small and medium-sized dairy processors

renseignements : **FIL** ou
IDF Zimbabwe National Committee
Mrs P. BORLAND
National Secretary of IDfZ
Zimbabwe Dairy Services Association
PO Box CY 2026 Causeway, HARARE
ZIMBABWE
tel : 263/4.729177
fax : 263/4.704545
mel : cuthbert@primenet.co.zw

14 SEPTEMBRE 1999 : ATHENES, GRECE

Atelier sur le lait biologique

7 – 8 NOVEMBRE 1999 : FRANCFORT, ALLEMAGNE

Symposium sur la suppression des barrières au commerce
international des produits alimentaires et laitiers

renseignements auprès de la **FIL**

13 – 16 MARS 2000 : BANFF, CANADA

Cheese ripening and technology

renseignements : **FIL** ou
Dr P. Jelen
Dpt Agricultural, Food and Nutritional Science
University of Alberta 2-06 Agfor Centre
EDMONTON AB T6G 2P5
CANADA

tel : 1/403.492 2480
télécopie : 1/403.492 8914
mel : pjelen@afns.ualberta.ca

➤ AUTRES MANIFESTATIONS

5 – 6 OCTOBRE 1999 : JOUY EN JOSAS

Symposium international sur les méthodes PLS

Pour tout renseignement, prendre contact avec
CIRIA – CERESIA Symposium PLS
Concesa Olivier
1, avenue Herbillon,
94160 SAINT MANDE
tel : 01.43.74.95.20
télécopie : 01.43.74.17.29
mel : ciria@calva.net

**17 NOVEMBRE 1999 : PARIS JOURNEE SESIL –
IESIEL LIPIDES DU LAIT**

Pour tout renseignement, prendre contact avec
SESIL – IESIEL
tel : 01.49.70.72.77

17 – 19 NOVEMBRE 1999 : PARIS

Journées techniques de l'ASFILAB. Nouvelles techniques
analytiques : questions posées par leur transfert en routine
(*Espace Saint Martin, 194 bis, rue Saint Martin 75003 PARIS*)

Pour tout renseignement, prendre contact avec
ASFILAB
191, avenue Aristide Briand
94237 CACHAN CEDEX
tel : 01.41.24.88.09
télécopie : 01.41.24.87.99

22 – 24 NOVEMBRE 1999 : TAMPERE, FINLANDE

Conférence européenne sur la science et la technologie alimentaire
en développement

Pour tout renseignement, prendre contact avec
EFFoST Secretariat Conference Coordinator
c/o ATO-DLO PO Box 17
NL-6700 AA WAGENINGEN
PAYS-BAS
Tel : +31 317.475063
Fax : +31 317.475347

**6 – 15 MARS 2000 : LA ROCHE SUR FORON,
DECADE LAITIERE 2000**

Pour tout renseignement, prendre contact avec
Europel
BP 141
74805 LA ROCHE SUR FORON cedex
tel : 04.50.03.01.03
télécopie : 04.50.03.10.64

DOSAGE DES PROTEINES LAITIERES

2^e partie : évaluation du spectrophotomètre CECIL 2000

Le spectrophotomètre CECIL de la société Grosseron est un appareil utilisé pour le dosage des protéines du lait par la méthode colorimétrique au noir amido. Ses caractéristiques instrumentales et analytiques ont été évalués par CECALAIT pour vérifier leur conformité avec les exigences réglementaires du paiement du lait. Dans ce cadre, sa stabilité, son traçage, sa répétabilité et sa justesse apparaissent satisfaisantes. Dans sa configuration normale de fonctionnement, ses caractéristiques de linéarité le rendent apte à être utilisé dans la zone de calibrage, allant de 25 à 36 g MAP / kg. C'est justement la zone d'utilisation la plus courante pour ce type d'appareil.

Pour le paiement du lait, la méthode officielle de détermination de la teneur en protéines du lait est la méthode colorimétrique au Noir-Amido (cf arrêté du 2/5/1985) En outre, de nombreux laboratoires d'entreprise utilisent cette méthode, soit en usage direct, soit, comme les laboratoires de paiement du lait et de contrôle laitier, en tant que méthode de référence secondaire pour calibrer les appareils infra rouge. L'élément principal d'une méthode colorimétrique est le (spectro)photomètre. Les laboratoires français utilisent pour l'heure, principalement trois modèles d'appareils : Vital 33, Promilk et Astor 2000. Les deux premiers ayant cessé d'être fabriqués, de nouveaux modèles ont été développés et mis sur le marché. Compte tenu de l'importance de la méthode au noir amido en tant que méthode de référence secondaire pour le calibrage des appareils, la CST a décidé de soumettre cette nouvelle génération d'appareils à la procédure d'autorisation d'emploi dans le cadre du paiement du lait. Cette procédure exige des essais d'évaluation auprès de laboratoires experts (cf Lettre de CECALAIT, n° 0). C'est dans ce cadre que CECALAIT a évalué récemment les caractéristiques analytiques de deux nouveaux spectrophotomètres : l'ATL33, distribué par la société Humeau et le CECIL 2000, distribué par la société Grosseron.

Dans la première partie (cf n°29); nous avons présenté l'évaluation de l'ATL 33. Cette deuxième partie est, à présent, consacrée à l'évaluation du CECIL 2000

LES APPAREILS

Le CECIL comporte un réseau holographique 1200 L/mm à monochromateur couvrant une gamme spectrale de 325 à 1000 nm. C'est un appareil compact, équipé d'un écran et d'un clavier pour son pilotage, ainsi que d'une imprimante intégrée. Il peut être calibré sur 32 points selon deux modes : linéaire et non linéaire.

LES ESSAIS

Ils ont été menés en novembre 1998 au laboratoire de physico-chimie de CECALAIT, en utilisant la méthode au noir Amido, conformément à la norme FIL 98A 1985, selon le mode opératoire suivant :

- volume de lait de 0,8 ml
- addition de 16 ml de noir amido
- agitation par rotation pendant 10 mn

- séparation du surnageant par centrifugation (accélération 350g) pendant 5 mn
- détermination de la densité optique du surnageant à 620 nm par le spectrophotomètre.

Les essais ont porté sur les points suivants :

- Evaluation de la stabilité de l'appareil,
- Evaluation de la contamination entre échantillons,
- Evaluation de la linéarité,
- Evaluation de la répétabilité,
- Evaluation de la justesse.

Les critères d'appréciation de ces différents paramètres se réfèrent aux normes FIL 128 :1985 et 135B :1991.

● STABILITE

Ce point a été étudié grâce à une série de 4 solutions de noir amido, dilué à 4 niveaux distincts, analysée toutes les 15 mn au cours d'une demi-journée de travail.

La série comporte une solution 0 et trois solutions correspondant au surnageant obtenu avec un lait riche (≈ 36 g de protéines/kg), un lait moyen (≈ 30 g protéines/kg) et un lait pauvre (≈ 25 g protéines/kg).

Les calculs de reproductibilité en vue d'évaluer la stabilité des appareils ont été effectués selon la norme FIL 135 B.

Les résultats montrent que les écarts-types de reproductibilité, en valeur réelle et en valeur relative, SR et SR%, varient de :

0,00 à 0,02 g/kg, soit de 0,00 à 0,09%

Ces écarts très faibles démontrent la bonne stabilité de l'appareil.

● CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS

Elle a été évaluée par l'analyse d'une solution de noir amido diluée et d'eau selon la séquence: EAU – SOLUTION 1 – SOLUTION 2, répétée 10 fois. Le test a été effectué sur 3 niveaux différents, à l'aide de 3 concentrations différentes en noir amido.

Le taux de contamination (T_c %) a été estimé par la formule :

$$T_c \% = \frac{[\Sigma(\text{SOLUTION 2}) - \Sigma(\text{SOLUTION 1}) / \Sigma(\text{SOLUTION 2})] \times 100}{100}$$

Dans ces conditions, le spectrophotomètre CECIL laisse apparaître des contaminations de l'ordre de **0,0 à 0,4 % au maximum**

Ces valeurs satisfont la limite de 1 % autorisée pour les méthodes rapides de détermination de la richesse du lait, utilisées dans le cadre du paiement du lait et du contrôle laitier.

③ LINEARITE

Ce paramètre a été évalué par l'analyse dans l'ordre croissant et décroissant :

- d'une part, d'une gamme de solutions de noir amido diluées couvrant la plage de densité optique habituellement utilisée,
- d'autre part, d'une gamme de laits, régulièrement répartis sur la plage de 20 à 45 g MAT/kg.

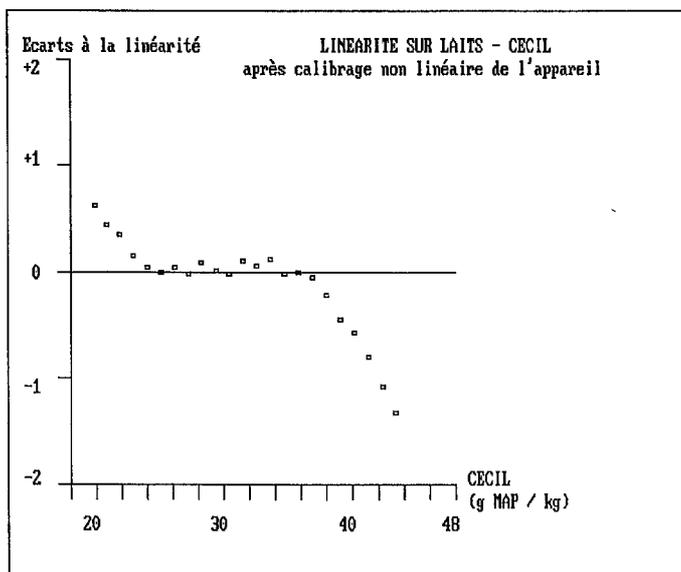
La linéarité a été étudiée par régression linéaire simple, en prenant :

- en variable expliquée Y, les taux théoriques linéaires (g MAP/kg)
- en variable explicative X, la moyenne des résultats obtenus sur chaque spectrophotomètre

L'examen graphique des résidus à la régression a permis de visualiser la distribution des écarts à la linéarité, en fonction des taux théoriques.

La figure 2 montre les plus intéressants des résultats obtenus, ceux provenant des gammes de lait.

Figure 2 : linéarité du CECIL 2000 sur une gamme de laits
linearity of CECIL tested on a set of milk samples, after curvilinear calibration



Y-axis : deviation from linearity / X-axis : MAP = NP protein nitrogen

Les résultats montrent que l'appareil est linéaire dans une plage, englobant la plage de calibrage 25 – 36 g MAP / kg

Cette réponse linéaire a été obtenue en utilisant le mode de calibrage non linéaire proposé dans la configuration de l'instrument.

④ REPETABILITE

La répétabilité a été évaluée par l'analyse en double de 100 échantillons de laits individuels de vache (conservés avec du bronopol à la concentration finale de 0,02%).

Les résultats sont consignés dans le tableau 6 ci-dessous qui présente les écarts types de répétabilité, Sr et les écarts maximum entre doubles, r.

tableau 6 : répétabilité du CECIL 2000

table 6 : repeatability of CECIL 2000

	n	moyenne mean g MAP/kg g NP/kg	Sr g MAP/kg g NP/kg	r g MAP/kg g NP/kg
Tous niveaux	100	33,25	0,0575	0,159
whole range		33.25	0.0575	0.159
25 à 36 g MAP/kg	76	31,78	0,0573	0,159
25 to 36 g NP/kg		31.78	0.0573	0.159

avec / with

n : nombre d'échantillons / number of samples

Sr : écart- type de répétabilité / standard deviation of repeatability

r : écart maximum entre doubles / maximum deviation between doubles.

Ces valeurs de répétabilité sont conformes aux prescriptions de la norme FIL 98A 1985 et sont très semblables à celles obtenues avec un appareil d'utilisation courante, tel le VITAL 33

⑤ JUSTESSE

↳ Procédure

Pour l'évaluation de la justesse, 100 échantillons individuels de lait de vache ont été analysés, en double, parallèlement sur un photomètre VITAL 33 et sur le CECIL 2000.

Il a été calibré à l'aide d'échantillons commerciaux de CECALAIT (ETG noir amido), à 3 niveaux protéiques : 25, 30 et 36 g de protéines/kg.

Les opérations se sont déroulées sur 3 jours non consécutifs, répartis sur une période d'une semaine. Chaque série analytique

était constituée de laits de contrôle laitier, provenant d'élevages distincts (conservés avec du bronopol à la concentration finale de 0,02%).

La justesse a été estimée au moyen de l'écart type résiduel de régression, en prenant l'appareil de CECALAIT en variable expliquée Y (g MAP/kg) et le spectrophotomètre CECIL 2000 en variable explicative X (g MAP/kg).

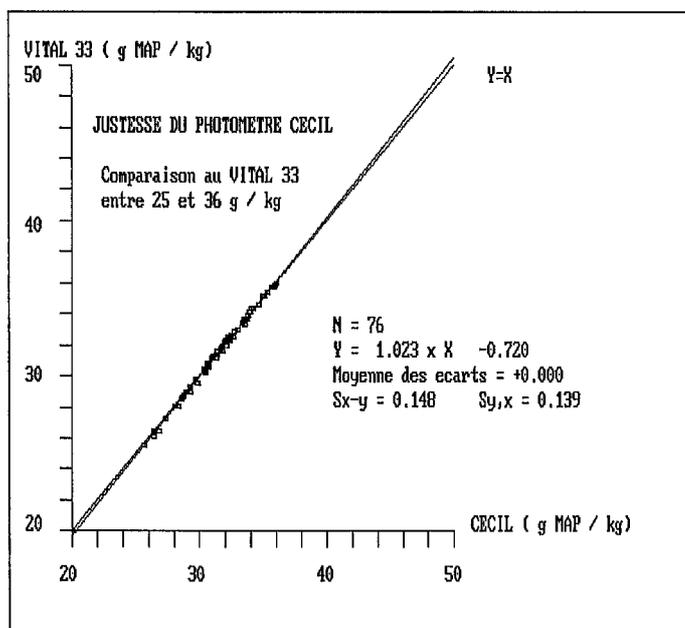
↳ Résultats

La figure 3 montre les résultats obtenus entre 25 et 36 g MAP/kg.

Figure 3 : justesse du CECIL 2000.

accuracy of CECIL 2000

Comparison between CECIL 2000 and VITAL 33, in the range 25 to 36 g NP/kg



- les biais moyens, non significatifs, sont respectivement de **0,00** sur cette plage (voir Fig. 3) et de **+ 0,085** pour tous niveaux confondus.
- Les pentes de régression apparaissent significativement distinctes de 1, au seuil de 1%, en raison d'une relation non totalement linéaire entre cet appareil et le VITAL 33. Les écarts sont surtout observés au niveau des extrêmes de la population des taux et restent toutefois de faible importance.
- les écarts-types résiduels de régression sont respectivement de **0,14** (voir fig. 3) et **0,24 g MAP/kg**

En conclusion, la comparaison des résultats entre ce nouvel appareil et un appareil très largement utilisé, comme le VITAL 33 montre une bonne concordance, notamment sur la plage 25 – 36 g MAP/kg.

CONCLUSION

Le spectrophotomètre CECIL 2000 a été évalué dans le but d'une autorisation d'emploi pour le paiement du lait. Il a donné satisfaction sur les différents points testés: stabilité, traçage, linéarité, répétabilité et justesse.

Ses caractéristiques de linéarité ne le rendent, cependant apte à l'utilisation, que dans la zone de calibrage de 25 à 36 g/kg. En dehors de cette plage, dans la limite de 20 à 45 g MAP/kg, les résultats obtenus seront entachés d'une erreur dont l'importance dépendra de l'éloignement de la valeur cible par rapport à la zone de calibrage. Enfin, en dessous de 20 g MAP/kg et au dessus de 45 g MAP/kg, ne pourront convenir que des modes opératoires spécifiques aux produits dosés.

Après examen des résultats de cette évaluation, la CST a décidé d'accorder à ce spectrophotomètre, son autorisation d'emploi dans le cadre du paiement du lait

BIBLIOGRAPHIE

- ♦ **TROSSAT Ph. ; LERAY O.** Rapport d'évaluation du spectrophotomètre CECIL. CECALAIT, 1998, 9 pages.
- ♦ **FIL 98A:1985** : Lait. Détermination de la teneur en protéines. Méthode au noir amido (méthode pratique)
- ♦ **FIL 128:1985** : Lait. Définition et évaluation de la précision globale des méthodes indirectes d'analyse du lait - Application au calibrage et au contrôle de qualité
- ♦ **FIL 135B:1991** : Lait et produits laitiers. Caractéristiques de fidélité des méthodes analytiques - schéma de conduite d'une étude collaborative
- ♦ **arrêté du 2/5/1985** définissant les modalités techniques selon lesquelles sont prélevés et analysés les échantillons de lait livrés par les producteurs aux fins de la détermination de leur composition et de leur qualité. Journal Officiel de la République Française du 12/6/1985.

Liste des abréviations

CST : Commission Scientifique et Technique du Ministère de l'Agriculture
MAP : Matière azotée protéique
ETG : Echantillon à teneur garantie

DU COTE DE LA BIBLIO

Vous trouverez ci-joint la liste complète des références repérées pour notre base de données sur les techniques analytiques laitières au cours du dernier trimestre.

Si vous souhaitez obtenir des précisions sur ces références, ou la

copie d'un document signalé, n'hésitez pas à prendre contact avec nous.

Attention, nous vous rappelons que nous ne pouvons photocopier ni les ouvrages, ni les normes !

La Lettre de CECALAIT est éditée par CECALAIT, BP 89, 39801 POLIGNY CEDEX
CECALAIT : association. Président : Joachim TROLARD ; Vice-Président : Ewald VAN BAAR ;
Trésorier : Pierre PARGUEL ; Directeur : Olivier LERAY
Directeur de la publication : Joachim TROLARD
Responsable de la rédaction : Annette BAPTISTE
Impression : CECALAIT, BP 89, 39801 POLIGNY CEDEX
Juillet 1999
Dépôt légal : à parution
ISSN : en cours