



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

juillet 1998

N°26

LA LETTRE DE CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 03.84.73.63.20 TELECOPIE : 03.84.37.37.81
E-mail : bapt@poligny.inra.fr ou trossat@poligny.inra.fr

Rédaction achevée le 24 juillet 1998

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

Relecture par : R. GRAPPIN et les auteurs

SOMMAIRE

Evaluation d'une méthode microbiologique : ISO 7932, dénombrement de *Bacillus cereus*

Validations AFNOR

Normes et projets de normes parus récemment

Du côté de la biblio...

Evaluation du Bactoscan FC

Nouveautés dans la réglementation

Rendez-vous

EVALUATION D'UNE METHODE MICROBIOLOGIQUE :

ISO 7932 , dénombrement de *Bacillus cereus*

La méthode de dénombrement de *Bacillus cereus* dans les aliments, décrite par la norme ISO 7932 (édition 1993) est la première méthode microbiologique normalisée au niveau international, dont la répétabilité et la reproductibilité aient été établies par une étude collaborative de grande échelle. Celle-ci s'inscrit dans un projet destiné à faire adopter cette norme ISO en tant que norme CEN. Les résultats de l'étude donnent des valeurs de $r = 0,29$ et $R = 0,42$ (en échelle log). Pour en arriver à ces valeurs, l'exclusion des résultats obtenus après l'un des tests de confirmation décrit dans la norme (la réaction de Voges-Proskauer ou VP) a toutefois été nécessaire. D'où les recommandations faites au CEN pour un réexamen et une amélioration des tests de confirmation de la méthode, notamment le test sur gélose glucosée et le test VP.

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. Jusqu'à présent, il n'existait aucune méthode normalisée internationale de détection et / ou de dénombrement de microorganismes dans les aliments qui ait été évaluée ainsi. C'est pourquoi la Commission Européenne a lancé fin 1996 un projet sur quatre ans, destiné à évaluer six méthodes microbiologiques ISO, portant sur la détection et / ou le dénombrement des microorganismes pathogènes suivants : *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*. La première méthode ainsi validée est celle décrite dans la norme ISO 7932, 1993, portant sur le dénombrement de *Bacillus cereus* dans les aliments. C'est le fruit d'une étude collaborative de grande ampleur puisqu'elle a impliqué vingt laboratoires internationaux qui ont travaillé sur trois matrices différentes, représentatives de la diversité du domaine d'application de la méthode. Ses conclusions ont, en outre, vocation à être rapidement reprises dans la norme.

Trois types d'aliments à contamination artificielle

Le CNEVA assure la coordination du projet et a pour partenaires le RIVM-MGB aux Pays-Bas et le MAFF-CSL au Royaume-Uni. Ils ont débuté leurs travaux fin 1996. Après plusieurs réunions de mise au point des protocoles expérimentaux et un essai préliminaire à trois, ils ont abouti à une étude collaborative, organisée au début du mois d'Octobre 1997 par le RIVM-MGB.

Dans ce cadre, il a été décidé de n'utiliser que des échantillons contaminés artificiellement, en raison de difficultés certaines à obtenir des échantillons à contamination naturelle et de leur hétérogénéité. L'étude a porté sur trois types d'aliments différents :

- ♦ des échantillons de fromage, préparés et expédiés par CECALAIT,
- ♦ des échantillons de viande lyophilisée, préparés par MAFF-CSL,
- ♦ des échantillons de pomme de terre séchée, préparés par RIVM-MGB,

avec les échantillons de référence du BCR, à savoir des capsules de lait en poudre, contaminé artificiellement en *Bacillus cereus*, au niveau de 5000 UFC/capsule.

Tous les échantillons d'essai ont été contaminés à la fois par une flore typique de l'aliment concerné, et par *Bacillus cereus* à 4 niveaux d'inoculum différents : un blanc, ne comprenant que la flore de fond et des niveaux respectivement, bas, médian et élevé.

Ainsi, les échantillons de fromage, du même type que ceux envoyés lors des chaînes d'analyse CECALAIT ont été préparés en inoculant, à un même niveau de contamination, du fromage liquide par des cultures diluées :

- ♦ d'une souche psychrotrophe laitière de *Bacillus cereus*,
- ♦ de souches de *Bacillus* sp. telles que *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. polymyxa*, *B. circulans*,
- ♦ d'une flore laitière typique comprenant diverses espèces de bactéries lactiques : *Lactococcus lactis lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum* et *Enterococcus faecalis*.

Le tout a été ensuite additionné d'un agent bactériostatique dont l'effet disparaît à la dilution, puis de présure et réparti en flacons juste avant coagulation. Les niveaux de contamination finals sont alors de 0 (blanc); 2.10^3 (niveau bas); 10^4 (niveau médian) et 10^6 (niveau élevé) UFC/g.

Avant l'étude collaborative proprement dite, l'homogénéité et la stabilité de tous les échantillons ont été testées. La viande et la pomme de terre séchée se sont montrés stables sur plusieurs semaines, alors que le fromage ne l'a été que 4 à 5 jours, d'où l'obligation de procéder à l'analyse deux jours après envoi de ces échantillons (soit trois jours après leur préparation).

Etude collaborative

L'étude collaborative a finalement rassemblé 20 laboratoires, répartis dans 17 pays européens et aux Etats-Unis. Chaque participant a reçu un jeu de 8 échantillons de chaque aliment, comprenant des doubles en aveugle à chaque niveau de contamination, et 2 échantillons de référence à examiner parallèlement aux échantillons alimentaires.

Dans son principe, la méthode normalisée demande :

- ♦ l'ensemencement de boîtes de milieu sélectif par différentes dilution de l'échantillon pour essai,

- ♦ l'incubation des boîtes pendant 18 à 48h
- ♦ puis des tests de confirmation sur gélose glucosée, milieu pour la réaction VP et milieu au nitrate pour 5 colonies présumées choisies au hasard sur les boîtes contenant moins de 150 colonies.

Le protocole expérimental adressé à chaque participant comportait cependant quelques modifications par rapport au texte normalisé, en particulier :

- ♦ tester chaque échantillon à la fois sur le milieu MEYP (communément appelé milieu de Mossel), avec incubation à 30°C (selon la norme) et sur le milieu PEMBA, avec incubation à 37°C, utilisé couramment dans certains laboratoires à la place du premier milieu.
- ♦ porter la durée d'incubation du test de confirmation sur gélose glucosée de 24h à 48h, au cas où la coloration jaune ne serait pas uniformément répartie dans le tube. Il était également possible de prolonger de même le test VP en cas de résultat négatif.

Comme dans toutes les études collaboratives, chaque participant était invité à fournir le maximum de détails sur les délais et conditions de réception des échantillons, les milieux utilisés, les difficultés rencontrées...

Les résultats obtenus ont été analysés au moyen du logiciel statistique SAS après exclusion préalable des données provenant :

- ♦ d'échantillons analysés trop tard (pour le fromage),
- ♦ d'échantillons à l'identification incertaine sans doute, à cause d'erreurs de codage,
- ♦ de boîtes aux colonies agglomérées ou trop étalées,
- ♦ d'échantillons aux résultats absents pour une dilution (d'où calcul du nombre de colonies impossible),
- ♦ d'échantillons ayant subi des protocoles expérimentaux non conformes : température d'incubation fautive, absence de tests de confirmation...etc..
- ♦ des blancs, à cause de problèmes de faux positifs dans les échantillons de viande, dus sans doute à une contamination par l'air ambiant, et d'une faible contamination naturelle dans les échantillons de pomme de terre
- ♦ de tous les comptages de colonies supérieurs à 200 par boîte,
- ♦ de toutes les moyennes de comptages de colonies supérieures à 150.

Les résultats ont été transformés en \log_{10} . Un test de Duncan, appliqué aux données obtenues à partir des doubles, permet d'éliminer les résultats aberrants avant la suite de l'analyse statistique, qui permettra de déterminer les valeurs de répétabilité -r- et de reproductibilité -R-

Résultats

↳ COMPARAISON ENTRE LES MILIEUX MEYP ET PEMBA

Un test-F a permis de comparer les deux milieux. Les performances obtenues avec tous les types d'aliments ont été identiques. La seule exception a été un résultat légèrement plus élevé au seuil de 5%, avec la pomme de terre sur le milieu MEYP. Au seuil de 1%, les résultats obtenus sur l'un et l'autre milieu ont été équivalents.

↳ REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

Dans l'ensemble, les tests de confirmation ont été problématiques.

Ainsi, pour le test sur gélose glucosée, la plupart des laboratoires ont eu besoin de 48h d'incubation pour obtenir une coloration jaune uniforme. Certains ont obtenu de meilleurs résultats en diminuant le volume de gélose inoculée. D'autres ont suggéré qu'en prenant soin d'inoculer les tubes avant le total refroidissement de la gélose réchauffée au préalable, les bactéries restaient plus mobiles, d'où une meilleure diffusion de la coloration jaune à travers le tube.

La test VP a donné lieu à de très nombreux résultats faux négatifs. Les résultats s'améliorent après 48h d'incubation mais de nombreux faux négatifs subsistent malgré tout. Certains participants ont suggéré des explications liées au pH du milieu, mais des études complémentaires semblent nécessaires par rapport à ce test. Quoi qu'il en soit, intégrer les résultats obtenus après le VP a abouti à des valeurs beaucoup trop élevées pour r et R, à savoir, en échelle log (*), une valeur maximale de r = 2,2 ; une valeur maximale de R = 4,7.

C'est pourquoi, les organisateurs de l'étude ont décidé de recalculer les valeurs de r et de R, en éliminant les résultats obtenus après le test VP.

Les valeurs ainsi obtenues sont présentées dans le tableau 1.

tableau 1 : répétabilité et reproductibilité de la norme ISO 7932

type d'échantillon	r (log) *	R (log) *
fromage	0,23	0,42
viande	0,29	0,35
pomme de terre	0,24	0,31
valeurs maximales tous aliments confondus	0,29	0,42
matériel de référence	0,11	0,22

* on rappelle que :

r 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 en échelle log signifie que la différence logarithmique obtenue entre deux répétitions dans des laboratoires différents a une probabilité de 95% d'être inférieure à R

Conclusions

Les conclusions de cette étude ont été transmises au CEN en tant que recommandations pour l'évolution de la norme. On y lit notamment que :

- ♦ des études complémentaires sont nécessaires pour améliorer la fiabilité du test de confirmation sur gélose glucosée et du test de confirmation VP ou pour remplacer ce dernier.
- ♦ Le milieu PEMBA pourrait constituer une alternative au milieu MEYP, en soulignant néanmoins qu'une incubation à 37°C ne permet pas de mettre en évidence toutes les souches psychrotrophes de *Bacillus cereus*.
- ♦ les valeurs de répétabilité et de reproductibilité obtenues selon la méthode ISO 7932 sont -en échelle log-: **r=0,29** et **R = 0,42**.

Il faut donc s'attendre avec la prise en compte de ces recommandations à une prochaine révision de la norme EN ISO 7932.

En outre, le projet de la Commission Européenne vise à évaluer en priorité les méthodes de détection et de dénombrement de *Listeria monocytogenes*, de dénombrement de *Staphylococcus aureus* et de *Clostridium perfringens*, de détection de *Salmonella*. Ces études sont en cours également sur une grande échelle. Elles aboutiront à la validation des méthodes normalisées correspondantes, accompagnée sans doute de changements substantiels de leur contenu.

BIBLIOGRAPHIE

- ♦ ISO 7932 édition 1993 (NF ISO 7932 - V 08-023, janvier 1994) : Directives générales pour le dénombrement de *Bacillus cereus*

- ♦ Evaluation of microbiological methods for detection and for enumeration of microbiological contaminants in foods. Contract n° SM T4 / CT 96 / 2098. Coordination : CNEVA France. Partners : RIVM-MGB, Netherlands ; MAFF-CSL, United Kingdom. Report : january 1998
- ♦ P.H. IN'T VELD, S. SCHULTEN, S. SCOTTER, P. ROLLIER, C. LAHELLEC. Evaluation of the ISO 7932 method for the enumeration of *Bacillus cereus*. Poster presentation at ISO-FIL/IDF-AOAC International Symposium on food-borne pathogens : detection and typing, The Hague, The Netherlands, April 1998. De Ware(n) Chemicus, 1998, V. 28, p. 77
- ♦ S.M. SCHULTEN, B.E.B. V.D. LUSTGRAF, N. NAGELKERKE, P.H. IN'T VELD. Validation of microbiological methods. Enumeration of *Bacillus cereus* according to ISO 7932 (second edition 1993). National Institute of Public Health and the Environment. Bilthoven, The Netherlands. Report n° 286555001, march 1998

Cette étude fera également l'objet d'une publication dans une revue internationale.

Liste des abréviations

CEN : Comité Européen de Normalisation

ISO : International Standard Organization

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

MEYP : gélose Mannitol/ jaune d'oeuf/ Polymyxine

PEMBA : gélose Polymyxine/ jaune d'oeuf/ Mannitol / Bleu de Bromothymol

r : répétabilité

R : reproductibilité

RIVM-MGB : Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu - Microbiological Laboratory for Health Protection

UFC : unité formant colonie (dans les articles cités ci-dessus, on parle plutôt de cfp : colony forming particle, particule formant colonie pour éviter des confusions sur le sens du mot "unité". L'appellation UFC est néanmoins beaucoup plus courante, c'est pourquoi nous l'avons utilisée ici)

VP : test par la réaction de Voges Proskauer

VALIDATIONS AFNOR

Me DIGONNET de l'AFNOR nous informe des nouveautés dans le domaine des méthodes alternatives d'analyse. Une nouvelle méthode a été validée, deux ont vu leur validation reconduite pour 4 ans, une autre a eu une prolongation de date de fin de validation, une autre enfin a été abandonnée.

VALIDATION NOUVELLE

Il s'agit du test **MASTAZYME *Salmonella***, distribué par la société MAST Diagnostic, applicable à tous les produits d'alimentation humaine. (n° attestation MAS 17/1-03/98)

Nous ne disposons pas encore du texte de cette validation. Nous vous fournissons donc des informations plus détaillées dans un prochain numéro de La Lettre de CECALAIT.

RECONDUCTIONS DE VALIDATIONS

Les méthodes rapides d'analyses suivantes ont vu leur validation reconduite pour 4 ans.

☛ **Systèmes d'immuno-analyse Mini Vidas** de la société Biomérieux :

- ♦ avec le kit VIDAS *Salmonella*, n° d'attestation BIO-12/1-04/94,
- ♦ avec le kit VIDAS *Listeria*, n° d'attestation BIO-12/2-04/94,

toutes deux validées jusqu'au 9/6/2002

☛ **Petrifilm coliformes**, validée jusqu'au 6/9/2002, mais désormais scindée en trois applications,

- ◆ pour la numération des coliformes totaux, avec
 - lecture des colonies gazogènes et non gazogènes, n° d'attestation 3M-01/2-09/89A
 - lecture des colonies gazogènes, n° d'attestation 3M-01/2-09/89B

au domaine d'application étendu à tous les produits alimentaires, sauf les coquillages

- ◆ pour la numération des coliformes thermotolérants avec lecture des colonies gazogènes et non gazogènes, n° d'attestation 3M-01/2-09/89C, au domaine d'application étendu à tous les produits alimentaires

PROLONGATIONS ET EXTENSIONS DE VALIDATIONS

La méthode *Salmonella* 1 - 2 test, distribué par AES Laboratoire voit sa validité prolongée jusqu'au 30/9/1998.

Enfin, le test de détection *Probelia Listeria monocytogenes* de la société SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR, d'abord uniquement applicable aux produits laitiers a son domaine d'application élargi à l'ensemble des produits d'alimentation humaine, depuis le 23/3/1998.

ABANDON DE DE VALIDATION

La méthode Gene-Trak Systems de détection du genre .

Listeria DNA GT608, n° d'attestation DNA 14/1-06/94 n'a pas fait l'objet d'une procédure de reconduction. En conséquence, elle ne bénéficie plus de la validation AFNOR depuis le 17/6/1998

NORMES ET PROJETS DE NORMES PARUS RECEMMENT (reçus entre Avril et Juillet 1998)

NORMES EUROPEENNES

Nous disposons à présent des textes

NF EN 12824, février 1998, AFNOR V 08-013
et
NF EN ISO 7932, mars 1998, AFNOR V 08-023,

signalés dans La Lettre de CECALAIT, n° 25. Nous pouvons donc donner quelques détails sur les modifications des méthodes, par rapport aux versions antérieures.

➤ Dans la norme NF EN 12824, méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella*, le nouveau texte offre la possibilité d'incuber le milieu de Rappaport-Vassiliadis 24h supplémentaires. Il introduit, en outre des préparations spécifiques de la suspension-mère pour préenrichissement pour quelques aliments particuliers.

➤ Dans la norme NF EN ISO 7932, dénombrement de *Bacillus cereus*, la seule modification de ce nouveau texte est l'introduction dans le corps de la norme d'un rectificatif technique, concernant l'exemple de calcul du nombre de colonies. Ce rectificatif avait été publié séparément par l'ISO en 1997, mais pas par l'AFNOR. Ce texte **n'inclut donc pas encore** les conclusions de l'étude collaborative décrite plus haut.

NF EN 12128 Juin 1998, -AFNOR X 42-206- (ICS 07.080). BIOTECHNOLOGIE. Laboratoires de recherche, de développement et d'analyse. Niveaux de confinement des laboratoires de microbiologie, zones à risque, situations et exigences physiques de sécurité.

Cette norme remplace le projet de même intitulé et décrit les exigences physiques nécessaires à la sécurité biologique en laboratoire. Elle décrit en particulier quatre niveaux de

confinement selon les risques présentés par les microorganismes manipulés ; le confinement approprié devant être choisi à l'issue d'une étude d'évaluation des risques.

NF EN 12347 Juin 1998, -AFNOR X 42-124- (ICS 07.080, 11080). BIOTECHNOLOGIE. Critères de performance pour les stériliseurs à la vapeur d'eau et les autoclaves.

Les critères de performance sont l'étanchéité, la capacité au nettoyage et la capacité à la stérilisation. Ce texte en donne les différentes classes, détaille les classes minimales selon les types de stériliseurs ou d'autoclaves et indique comment vérifier les performances.

NORMES ISO

NF ISO 1738 Mai 1998, -AFNOR V 04-314- (ICS 67.100.20). BEURRE. Détermination de la teneur en sel

Cette norme remplace le projet du même intitulé. La méthode consiste à titrer les chlorures par une solution de nitrate d'argent (méthode de Mohr) et le texte reprend l'intégralité de la norme ISO 1738 de 1997.

NF ISO 11868 Juin 1998, -AFNOR V 04-356- (ICS 67.100.10). LAIT TRAITE THERMIQUEMENT. Détermination de la teneur en lactulose.

Cette norme remplace le projet du même intitulé. Il s'agit d'une méthode par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) qui permet de distinguer le lait stérilisé UHT du lait stérilisé en bouteilles.

PROJETS DE NORME AFNOR SOUMIS A ENQUETE

Cinq projets concernent la détermination de la matière grasse par une méthode gravimétrique de référence. Il s'agit des :

- ◆ **Projet V 04-050**, dans les aliments à base de lait pour les enfants en bas âge
- ◆ **Projet V 04-293**, dans le fromage de sérum.
- ◆ **Projet V 04-346**, dans le lait sec et les produits à base de lait sec.
- ◆ **Projet V 04-365**, dans le lait écrémé, le sérum et le babeurre.
- ◆ **Projet V 04-373**, dans les glaces de consommation, les préparations pour glaces à base de lait

Projet V 04-0576. PRODUITS A BASE DE MATIERE GRASSE LAITIERE. Détermination de la teneur en eau. Méthode de Karl Fischer

Projet V 08-050. MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Dénombrement des coliformes par comptage des colonies obtenues à 30°C - Méthode de routine

Projet V 08-051. MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Dénombrement des microorganismes par comptage des colonies obtenues à 30°C - Méthode de routine

Projet V 08-054. MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Dénombrement des *enterobacteriaceae* par comptage des colonies obtenues à 30°C - Méthode de routine

➤ Signalons également la parution du recueil de normes AFNOR "Maîtriser l'hygiène alimentaire" qui reprend les principes généraux, la réglementation, la normalisation, le Codex...et quelques éléments de prévention.

NORMES FIL

60C:1997. LAIT ET PRODUITS A BASE DE LAIT. Dénombrement des Staphylococoques coagulase-positifs. Technique du nombre le plus probable

Cette norme remplace la norme FIL 60B:1990. Par rapport à celle-ci, le domaine d'application concerne maintenant l'ensemble du lait et des produits à base de lait et plus seulement les produits laitiers secs. De plus, elle précise que parmi les microorganismes dénombrés, certains peuvent être des souches coagulase-positifs autres que *Staphylococcus aureus*, certes majoritaire.

145A:1997. LAIT ET PRODUITS A BASE DE LAIT. Dénombrement des Staphylococoques coagulase-positifs. Technique de comptage des colonies

Cette norme remplace la norme 145:1990. Comme ci-dessus, ce nouveau texte prévoit le dénombrement de microorganismes autres que *Staphylococcus aureus*. Par rapport à la version précédente de la norme, il impose principalement d'utiliser deux boîtes de Petri aussi bien pour le milieu de Baird Parker que pour le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène, ce qui n'était pas le cas auparavant. Il recommande également l'utilisation du deuxième milieu au cas où le premier n'est pas assez sélectif. Enfin, il ajoute quelques données supplémentaires sur la précision de la méthode.

117B:1997. YAOURT Dénombrement des microorganismes caractéristiques. Technique de comptage des colonies à 37°C.

Ce document remplace la norme 117A:1988. Les modifications portent principalement sur l'intégration au nouveau texte des apports normatifs de :

- ◆ 122C:1996 sur la préparation des échantillons et dilutions,
- ◆ 146:1991 sur l'identification des microorganismes caractéristiques des yaourts.

157A:1997. CHYMOSES ET PEPSINES BOVINES : Détermination de l'activité coagulante totale du lait.

Ce texte donne des détails supplémentaires, notamment de calcul et de précision par rapport à la norme provisoire 157:1992 qu'il remplace. On y signale, en outre, que la méthode est également applicable à la chymosine obtenue par fermentation.

DU COTE DE LA BIBLIO

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

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 !

EVALUATION DU BACTOSCAN F.C

Le Bactoscan FC de la société Foss Electric est un appareil automatique de numération des bactéries du lait cru. Il fonctionne sur le principe de la cytométrie de flux, avec détection des bactéries par microscopie épifluorescente. Ses caractéristiques analytiques et instrumentales ont été évaluées par CECALAIT. La stabilité sur une ou plusieurs journées ainsi que la linéarité de l'appareil apparaissent satisfaisantes. Son traçage est conforme aux exigences réglementaires. Enfin, ses performances de précision : répétabilité et justesse le rendent aptes à être utilisé en laboratoire interprofessionnel ou de contrôle laitier.

Le Bactoscan FC est un appareil automatique de numération des bactéries dans le lait cru fabriqué par la société Foss Electric (DK). Il fonctionne sur le principe de la cytométrie de flux avec une détection par microscopie épifluorescente, après un traitement chimique des échantillons. Les essais d'évaluation ont été menés à CECALAIT de février à mai 1998.

PRINCIPE ET DESCRIPTION

L'appareil est asservi à un micro-ordinateur qui assure le pilotage complet de l'instrument et le traitement du signal.

L'échantillon prélevé automatiquement est dilué dans un réactif d'incubation, solution tamponnée de bromure d'éthidium et d'enzyme protéolytique, de manière à disperser les protéines, la matière grasse et les cellules somatiques et à colorer les noyaux bactériens.

Ce mélange est incubé ensuite pendant 8 minutes à 42 °C et une partie aliquote est injectée dans un fluide vecteur en écoulement laminaire dans un capillaire. Les bactéries séparées par le flux sont exposées au faisceau d'un laser au niveau d'un objectif microscopique. Les impulsions lumineuses émises par fluorescence par le colorant fixé par les bactéries sont amplifiées au niveau d'un photomultiplicateur, comptabilisées et converties en Individual Bacteria Cell (IBC) par ml. Un calibrage réalisé par le laboratoire permet de transformer les IBC / ml en UFC / ml

LES ESSAIS

Ils ont été réalisés avec des échantillons sans réchauffage préalable et ont porté sur les points suivants .

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

Les critères d'appréciation de ces différents paramètres se réfèrent aux normes FIL 100B 1991, FIL 128 1985 , FIL 135B 1991, FIL 161A 1995 et AFNOR NF V03-110 juillet 1993.

① STABILITE

☞ sur la journée

Ce point a été étudié grâce à une série de 6 laits en double, à savoir un lait pauvre, un lait moyen et un lait riche additionnés ou non d'azidiol. Ils ont été analysés en mode automatique, toutes les 15 minutes au cours d'une demi-journée de travail dans les conditions réelles d'un laboratoire interprofessionnel, le tout représentant 20 cycles de mesure.

Les calculs de répétabilité et de reproductibilité en vue d'évaluer la stabilité de l'instrument ont été effectués sur le modèle de la norme FIL 135 B.

Avec des valeurs allant de 6,41% à 8,90 % pour les résultats obtenus avec les laits sans azidiol et de 4,23 à 8,14 % pour les résultats obtenus avec les laits additionnés d'azidiol, l'écart type géométrique relatif de reproductibilité (GRSD_R) est nettement inférieur à 10 % quel que soit le niveau de contamination et le mode de conservation des échantillons.

De plus, on constate que les valeurs obtenues en présence d'azidiol sont significativement inférieures aux témoins sans azidiol. Le pouvoir de stabilisation de l'azidiol associé à un stockage entre 2 et 4 °C est significativement supérieur à celui d'une conservation uniquement entre 0 et 2 °C.

La stabilité sur une journée apparaît sensiblement supérieure à celle des Bactoscan des générations précédentes notamment celle du Bactoscan 8000 (valeurs de 1,6 à 21,9 % selon DASEN et al , Lait, 1991).

☞ sur plusieurs journées

Selon les échantillons témoin utilisés, les valeurs de GRSD_R obtenues pour des mesures sur plusieurs journées varient de 1,86% à 5,20 % pour le témoin FC. Elles sont du même ordre de grandeur que celles obtenues en étudiant la stabilité sur une journée

L'ensemble des observations permet de conclure à une bonne stabilité de l'instrument, que ce soit à court ou à moyen terme.

② CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS

Elle a été évaluée en mode automatique par l'analyse de deux laits (riche et pauvre) selon la séquence: LAIT RICHE - LAIT RICHE - LAIT PAUVRE - LAIT PAUVRE, répétée 10 fois.

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

$$Tc \% = \frac{\Sigma(\text{PAUVRE 1}) - \Sigma(\text{PAUVRE 2})}{\Sigma(\text{RICHE 2}) - \Sigma(\text{PAUVRE 2})} \times 100$$

Dans ces conditions, le système Bactoscan FC laisse apparaître des contaminations de l'ordre de 0,0 à 0,4 % maximum quel que soit le niveau moyen de l'échantillon. Ce taux reste dans la limite de 1 % autorisée pour les méthodes rapides de détermination de la richesse du lait (Matière grasse et matière protéique) utilisées dans le cadre du paiement du lait. En effet, dans ce même contexte, cette limite est également applicable au dénombrement bactérien.

③ LINEARITE

Elle a été évaluée par l'analyse en mode automatique (mode répétabilité: 3 répétitions / échantillon) dans l'ordre croissant et décroissant d'une gamme de laits aux contenus en germes régulièrement répartis sur la plage souhaitée.

Les essais ont été réalisés sur deux types de matrice:

- ◆ Un lait enrichi par maturation à basse température (4 à 8 °C) pendant 24 à 72 heures
- ◆ Un lait reconstitué obtenu après microfiltration tangentielle par mélange de rétentat de microfiltration, de filtrat de microfiltration et de crème

Les résultats ont montré une linéarité satisfaisante de l'instrument sur l'ensemble de la gamme testée de 0,6 à 6000 10³ UFC / ml.

Les modalités de préparation des gammes de dilutions ne semblent pas influencer sur l'appréciation de la linéarité de l'instrument. En effet, les gammes réalisées à partir de maturation des laits à basse température ou par microfiltration donnent des résultats équivalents.

④ LIMITE DE DETECTION

La limite de détection d'une méthode est la plus faible valeur de la grandeur mesurée dont la méthode permette d'affirmer qu'elle n'est pas nulle.

Selon les modèles de calcul utilisés, la limite de détection se situe dans une fourchette allant de 940 à 1900 UFC/ml.

En tout état de cause, l'instrument présente un seuil de détection en parfait accord avec la précision demandée pour son utilisation en routine.

⑤ REPETABILITE

La répétabilité a été évaluée en mode automatique par l'analyse de 851 échantillons de laits de troupeaux selon la norme FIL 128 (les racks d'échantillons sont passés 2 fois consécutivement sur l'instrument)

Les résultats obtenus originellement en 10³ IBC / ml ont été transformés dans un premier temps en Log IBC / ml puis en Log UFC / ml à l'aide de l'équation de calibrage forcée par zéro obtenue lors de l'évaluation de la justesse :

$$Y = 0.8036 X,$$

avec Y en Log UFC/ml, obtenu par la méthode de référence
X en Log IBC/ml, valeur donnée par l'appareil.

Les résultats sont consignés dans les tableaux ci-dessous qui présentent les écarts types de répétabilités Sr* en log UFC/ml ainsi que les écarts types relatifs géométriques relatifs (GRSDr en % UFC / ml) pour chaque niveau de taux. Ces niveaux ont été établis au préalable, soit en fonction de leurs correspondance aux classes de paiement du lait en France, soit à des fins de comparaison aux valeurs du Bactoscan 8000 déterminées lors de l'évaluation de ce dernier (tableau 2)

Tableau 1 : Répétabilité selon la norme FIL 128

classes UFC / ml (Log)	n	Moyenne (Log)	Sr (Log)	GRSDr (%)	RD 95 (%)
0 - 2000.10 ³ (0 - 6.301)	851	4.293	0.0537	13.2	41.3
0 - 50 10 ³ (0 - 4.699)	686	4.083	0.0564	13.9	43.9
50 10 ³ - 100.10 ³ (4.699 - 5.000)	80	4.823	0.0386	9.3	27.9
100.10 ³ - 300.10 ³ (5.000 - 5.477)	55	5.195	0.0477	11.6	36.1
> 300.10 ³ (> 5.477)	30	6.006	0.0253	6.0	17.5

avec:

n: Nombre d'échantillons

Sr*: Ecart type de répétabilité en log

GRSDr: Ecart type relatif géométrique relatif en % UFC / ml

RD 95: Différence maximale entre doubles dans 95 % des cas en % UFC / ml

Tableau 2 : Répétabilité, avec découpage des classes pour comparaison avec les résultats antérieurs obtenus sur Bactoscan 8000

classes UFC / ml (Log)	n	Moyenne (Log)	Sr* (Log)	Sr* Méth référence (Log)	Sr * (1) BSC 8000 (Log)
<10.10 ³ (0 - 4.00)	285	3.778	0.0671	0.070	0.132
10.10 ³ - 15 10 ³ (4.00 - 4.176)	125	4.079	0.0460	0.0443	0.092
15.10 ³ - 25.10 ³ (4.176 - 4.398)	141	4.279	0.0481	0.0477	0.078
25.10 ³ - 50.10 ³ (4.398 - 4.699)	135	4.531	0.0475	0.0647	0.051
50.10 ³ - 100.10 ³ (4.699 - 5.00)	80	4.823	0.0386	0.0543	0.035
100.10 ³ - 250.10 ³ (5.00 - 5.398)	50	5.172	0.0488	0.037	0.015
> 100.10 ³ (> 5.00)	35	5.923	0.0267	0.0623	0.005

avec :

(1) Résultats des essais: Dassen et al., 1991

n: Nombre d'échantillons

Sr*: Ecart type de répétabilité en log

RSDr : Ecart type relatif géométrique relatif en % UFC / ml

RD 95 : Différence maximale entre doubles dans 95 % des cas en % UFC / ml

Les deux tableaux montrent que l'instrument présente un écart type de répétabilité Sr* d'environ 0,054 log (soit un écart type géométrique relatif de 13,2 %) qui est significativement inférieur aux valeurs limites préconisées par le CNIEL pour les comptages bactérien (Sr* = 0,15 log).

La répétabilité relative, exprimée par les valeurs log d'écart type, apparaît liée au niveau moyen en germes, le Sr* passant de

0,0671 log (GRSDr = 16.7 %) pour les laits inférieurs à 10.10³ UFC / ml à 0,0267 log (GRSDr = 6.3 %) pour les laits supérieurs à 100.10³ UFC / ml.

On observe par rapport à des essais similaires sur le Bactoscan 8000, une certaine réduction des valeurs d'écart types de répétabilité, en particulier sur les laits faiblement chargés (inférieurs à 50.10³ UFC / ml).

© JUSTESSE

La justesse a été estimée au moyen de l'écart type résiduel de régression, en prenant la méthode de référence (Log UFC / ml) en variable expliquée Y et le Bactoscan FC en variable explicative X (Log IBC / ml).

Pour l'évaluation de la justesse, seuls les échantillons présentant une valeur de référence validée techniquement ont été conservés après élimination des boîtes hors des limites de comptage ou présentant des colonies dites envahissantes ou de contamination.

↳ Procédure

Dans un premier temps, afin d'avoir une population présentant une bonne répartition des teneurs en germes, une sélection de 450 laits de troupeaux de vache parmi 851 prélevés (sur 9 jours différents de mars à mai 1998) a été effectuée par une analyse en double selon la norme FIL 128 sur le Bactoscan FC.

Les laits sélectionnés ont été conservés entre 0 et 2 °C pendant 2 à 4 heures jusqu'au moment des analyses pour l'évaluation de la justesse. Les analyses ont été effectuées en doubles consécutifs sur l'instrument suivies immédiatement d'une analyse en double par la méthode de référence (FIL 100 B).

Les opérations se sont déroulées sur 9 jours non consécutifs étalés sur une période de 45 jours. Chaque série analytique était constituée de laits provenant d'une tournée de ramassage (24 ou 48 heures de stockage en tank) prélevés en double chez les éleveurs et ayant suivi le circuit d'acheminement normal des échantillons pour le paiement du lait.

↳ Résultats

La linéarité de l'appareil étant acquise sur l'ensemble de la gamme testée, une régression linéaire simple a été appliquée à la population globale et aux 9 sous-populations des essais journaliers.

L'analyse de la justesse série par série a permis d'observer une bonne homogénéité entre les 9 séries d'échantillons pour l'évaluation de la justesse et n'a détecté aucun effet lié à la série. Dès lors, ceci autorise un traitement de l'ensemble de la population des 385 laits dans une même régression sans correction.

La régression linéaire simple calculée -d'après des valeurs transformées en Log- a donné la relation suivante:

$$\text{Log (Référence)} = 0,757 \times \text{Log (Bactoscan FC)} + 0,656$$

$$S_{y,x} = 0,301$$

Statistiquement, la pente est significativement distincte de 1,00. De même, l'ordonnée à l'origine ainsi que la moyenne des écarts sont significativement différentes de 0.

Un calibrage apparaît donc nécessaire préalablement à toute utilisation.

La précision d'estimation obtenue pour le Bactoscan FC est de :

$$\pm 1,96 \times 0,301 \text{ soit } \pm 0,590 \text{ Log UFC / ml,}$$

soit, pour une valeur Y prédite par l'équation de calibrage, une limite supérieure et une limite inférieure de l'intervalle de confiance à P = 0,95 respectivement de

$$\text{Log Y} + 0,590 \text{ et } \text{Log Y} - 0,590.$$

En conclusion, les caractéristiques de précision (Sy,x principalement) du Bactoscan FC sont équivalentes à celles du Bactoscan 1 (GRAPPIN et al., 1985) et du Bactoscan 8000 (DASEN et al., 1991) pour l'ensemble du domaine d'application testé. Toutefois, du fait de l'excellente linéarité de son signal, il offre l'avantage, par rapport à ces appareils, de pouvoir être calibré simplement à l'aide d'une équation linéaire simple.

Le Bactoscan FC présente des performances de justesse satisfaisant aux besoins du paiement du lait.

CONCLUSION

L'appareil Bactoscan FC 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 performances de précision générales mesurées le rendent apte à être utilisé dans un laboratoire interprofessionnel après confirmation (phase II) dans les conditions réelles d'analyse des laboratoires de routine.

BIBLIOGRAPHIE

- ♦ *Dasen A.; Olid R.M.; Piton-Malleret C.; Grappin R. Evaluation du BactoScan 8000 pour la numération automatique et rapide de la flore microbienne du lait cru. Le Lait 1991, V. 71, p. 661-670*
- ♦ *Grappin R.; Dasen A.; Favennec P. Numération automatique et rapide des bactéries du lait cru à l'aide du Bacto-Scan. Le Lait, 1985, V. 65, p. 123-147*
- ♦ *FIL 100B:1991 : Lait et produits laitiers. Dénombrement des microorganismes (comptage des colonies 30°C)*
- ♦ *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*
- ♦ *FIL 161A:1995 : Lait. Détermination quantitative de la qualité bactériologique. Guide d'évaluation des méthodes de routine*
- ♦ *AFNOR V 03-110 juillet 1993 Analyse des produits alimentaires. Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse quantitative par rapport à une méthode de référence*

Liste des abréviations

GRSDr : écart type relatif géométrique relatif de répétabilité

GRSD_R : écart type géométrique relatif de reproductibilité

IBC : individual bacteria cell

UFC ; unité formant colonie

(par Ph TROSSAT, O.LERAY et P.ROLLIER)

NOUVEAUTES DANS LA REGLEMENTATION

FRANCE

Décret du 3/6/1998 relatif à l'AOAC "Brocciu corse" ou "Brocciu" , Jo France du 5/6/ 1998

Loi n°98-535 du 1/7/1998 relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme, JO France du 2/7/1998

Ce texte prévoit notamment la création de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Elle a pour mission d'évaluer les risques sanitaires et nutritionnels que peuvent présenter les aliments destinés aux hommes ou aux animaux. Pour ce faire, elle mènera à la fois des actions de collecte des données scientifiques et techniques nécessaires, d'évaluation de leur pertinence, des programmes de recherche scientifique et technique...etc et aura un rôle d'expertise auprès du Gouvernement. En termes de structures, l'Agence englobera notamment le CNEVA qui lui transférera ses compétences, moyens, droits et obligations. Les laboratoires publics intervenant

dans ses domaines d'activité seront également amenés à faire de même selon des modalités à définir.

Une de ses tâches majeures sera de proposer dans un délai de 2 ans une rationalisation du système national d'expertise en Sécurité Sanitaire des aliments.

➔ Pour plus de détails, consulter les pages 10062 à 10065 du texte de loi.

Avis des 20/5 et 28/6/1998 modifiant la liste du 08 février 1998, relatif à la mise sur le marché communautaire de laits de consommation et de produits à base de lait

Ces textes complètent la liste des établissements conformes aux dispositions de l'arrêté du 02 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

Règlements n° 1000/98 du 13/05/1998, 1076/98 du 27/05/1998, 1191/98 du 9/06/1998 de la Commission modifiant les annexes I et II du 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. (JO. CE L142 du 14/05/1998, L154 du 28/05/1998, L 165 du 10/06/1998)

Ces textes complètent la liste des différents antibiotiques et agents antiparasitaires avec les LMRs exprimées en µg/Kg de lait : Thiamphénicol (50 µg), Rifaximine (60 µg), Thiabendazole (100 µg), Albendazole (100 µg)

Enfin, ils rajoutent à la liste des substances qui ne sont pas soumises à une limite maximale de résidus :

- ♦ quelques composés organiques comme l'amino-2-éthanol, la procaine, le chlorhydrate de dénávérine, le chlorure de benzalkonium, la corticotrophine, la kétamine
- ♦ un composé inorganique : le sélénate de sodium.

Directive 98/36 de la Commission du 2/6/1998 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 L67 du 12/6/1998)

Ce texte donne quelques précisions sur les exigences de composition de ces préparations.

Règlement n° 1298/98 du 23/6/1998 et rectificatif du 17/7/1988 de la Commission modifiant le règlement n° 577/97 portant certaines modalités d'application du règlement (CE) n° 2991/94 du Conseil établissant des normes pour les matières grasses tartinables et du règlement n° 1898/97 du Conseil concernant la protection de la dénomination du lait et des produits laitiers lors de leur commercialisation. (JO L 180 du 24/6/1998)

Le règlement retarde au 1er janvier 1999, au lieu du 1er juillet 1998 la date d'entrée en vigueur de la méthode de contrôle de la déclaration de la teneur en matières grasses.

Le rectificatif élimine le mot "laitiers" à la fin du paragraphe 1 de l'article premier dans le règlement 623/98, du 19/3/1998 (modifiant le règlement 577/97)

Règlement n° 1459/98 du 8/7/1998 de la Commission établissant une méthode de référence pour la détermination de la vanilline dans le beurre concentré, dans le beurre et dans la crème. (JO CE L 193 du 9/7/1998)

Ce texte détaille la méthode de référence par HPLC à utiliser pour la détermination de ce produit utilisé comme traceur dans les produits laitiers cités ci-dessus.

Règlement n° 1525/98 du 16/7/1998 de la Commission modifiant le règlement n° 194/97 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (JO L201 du 17/7/1998)

Ce texte s'intéresse aux aflatoxines et fixe notamment à 0,05 µg/kg la teneur maximale en aflatoxine M1 admise dans le lait cru et le lait de consommation traité thermiquement.

Directive 98/53 de la Commission du 16/7/1998 portant fixation de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (JOCE L201 du 17/7/1998)

Ce texte complète le règlement précédent en précisant les modalités de prélèvement des échantillons pour le contrôle des teneurs en aflatoxines dans les aliments, dont le lait. Il fixe également les critères analytiques auxquels doivent satisfaire les méthodes d'analyse que choisiront les laboratoires.

➤ **contrôle de la contamination des produits laitiers....à suivre**

Un nouveau plan de contrôle établi en 1998 par la DGAL (Direction Générale de l'Alimentation) prévoit la recherche de résidus d'antibiotiques et de sulfamides ainsi que d'un antiparasitaire, la recherche des aflatoxines M1 et la recherche de contaminants issus de l'environnement comme les pesticides et les métaux lourds.

RENDEZ-VOUS

➤ **RAPPELS**

16-19 AOUT 1998 : CONGRES ANNUEL DE "THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF MILK, FOOD AND ENVIRONMENTAL SANITARIANS" : ADVANCING FOOD SAFETY A NASHVILLE (ETATS-UNIS)

Pour tout renseignement, prendre contact avec :

IAMFES
6200 Aurora Ave
Savoy, IL 61874 USA
tel : 1/217 356 3182
fax : 1/217 398 4119
mel : jamfes@iamfes.org

15-18 SEPTEMBRE 1998 : EUROPEAN DAIRY EXPERTS SYMPOSIUM A ARNHEM (PAYS-BAS)

Pour tout renseignement, prendre contact avec :

Mrs H.R.M. Kentie / Mrs A.A. Greeven
IAC
PO Box 88, 6700 AB WAGENINGEN
PAYS-BAS
tel : 31/317 490285/490287
fax : 31/317 418552
mel : h.r.m.kentie@iac.agro.nl

21-23 SEPTEMBRE : 25E CONGRES INTERNATIONAL DE LA FIL A AARHUS (DANEMARK)

24-26 SEPTEMBRE : 82E SESSIONS ANNUELLES DE LA FIL A AARHUS (DANEMARK)

Pour tout renseignement sur ces deux derniers événements, prendre contact avec les organismes suivants :

FIL
C. Brooks
41, square VergoteB 1040 BRUXELLES
BELGIQUE
tel : 32/2 733 98 88/16 90
fax : 32/2 733 04 13
mel : fil-idf@mail.interpac.be

ou

ALF
34, rue de Saint Petersburg
75382 PARIS CEDEX
TEL : 01.49.70.71.11
FAX : 01.42.80.63.45

➔ AUTRES MANIFESTATIONS

18 SEPTEMBRE 1998 : ASSEMBLEE GENERALE ORDINAIRE ET EXTRAORDINAIRE DE CECALAIT

aux Salons de Bercy, 48bis, Boulevard de Bercy à Paris

Un courrier de convocation, avec plus de précisions vous sera adressé en temps utile

13 OCTOBRE 1998 COLLOQUE AFNOR : "L'EVOLUTION DES ISO 9000 ET LES OUTILS POUR S'Y PREPARER" A PARIS LA DEFENSE

4 NOVEMBRE 1998 COLLOQUE AFNOR : "NORMALISATION ET VALIDATION DES METHODES D'ANALYSE " A PARIS LA DEFENSE

Pour tout renseignement sur ces deux derniers événements, prendre contact avec

AFNOR :
Tour Europe
92049 PARIS LA DEFENSE CEDEX
tel : 01.42.91.55.99
fax : 01.42.91.56.56
<http://www.afnor.fr>

30 NOVEMBRE 1998 - 1 DECEMBRE 1998 : SYMPOSIUM COST95 : "QUALITE ET MICROBIOLOGIE DES FROMAGES TRADITIONNELS ET AU LAIT CRU" A DIJON

Pour tout renseignement, prendre contact avec

INRA - SRTAL
BP 89
39801 POLIGNY
tel : 03.84.73.63.00
Fax : 03.84.37.37.81
mel : grappin@poligny.inra.fr