



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

octobre 1997

N°24

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 23 octobre 1997

Equipe rédactionnelle : H. HASNI-PICHARD; C. LAPEYRE; O. LERAY; P. ROLLIER; Ph. TROSSAT

Relecture par : les auteurs

SOMMAIRE

Evaluation : ANADIS SCC 500

Rendez-vous

Normes et projets de normes parus récemment

Nouveautés dans la réglementation

Détection des entérotoxines staphylococciques

Validations AFNOR

Du côté de la biblio...

EVALUATION : ANADIS SCC 500

Le Somatic Cell Counter (SCC) est un appareil automatique de numération des cellules somatiques dans le lait fabriqué par la société PERSTORP / ANADIS utilisant la méthode fluoro-opto-électronique. Les caractéristiques instrumentales de base, à savoir : stabilité, traçage, répétabilité et justesse sont conformes aux exigences réglementaires. La linéarité de l'appareil (testée jusqu'à 2200x10³ cellules/ml) ajustée avec l'équation de calibrage implique une attention particulière quant au choix des étalons.

Le Somatic Cell Counter (SCC) est un appareil automatique de numération des cellules somatiques dans le lait fabriqué et commercialisé par la société PERSTORP/ANADIS (*) utilisant la méthode fluoro-opto-électronique. Il a été évalué par CECALAIT au laboratoire de physico-chimie pendant le mois de Novembre 1996, à Poligny.

DESCRIPTION

Le principe de fonctionnement est le suivant : l'échantillon, prélevé à l'aide d'une seringue de prélèvement, est dilué dans une seringue de mélange avec un réactif (solution tamponnée de triton X100 et de bromure d'éthidium) de manière à en disperser les globules gras et à colorer les noyaux des cellules somatiques. Une partie aliquote du mélange est injectée, via une seringue d'injection, dans un liquide de gainage en écoulement laminaire dans un capillaire. Les cellules colorées, exposées au faisceau d'un laser, émettent une lumière de fluorescence dirigée à travers un microscope vers un détecteur.

Les impulsions au dessus d'un seuil de discrimination fixe (exprimés en mV) sont comptabilisées et traduites en terme de concentration cellulaire via l'équation de calibrage.

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

L'appareil existe en deux versions utilisant la même technologie et fonctionnant suivant le même principe: le SCC 300 et SCC 500 qui se différencient par leur cadence analytique. Le SCC 500 utilise deux seringues de prélèvement pour assurer une cadence ajustable de 300 à 500 échantillons/heure.

LES ESSAIS

Ils ont porté sur les points suivants :

- ♦ évaluation de la stabilité de l'appareil,
- ♦ évaluation de la contamination entre échantillons,
- ♦ évaluation de la répétabilité,
- ♦ évaluation de la justesse.

L'appareil a été évalué dans 2 configurations distinctes: la configuration standard (400 échantillons/heure) et la configuration maximale, en terme de vitesse d'analyse, préconisée par le constructeur (450 échantillons/heure). Les différences entre ces deux configurations portent sur : le volume de lait pompé, le volume de mélange injecté dans la cellule et le temps de comptage effectif (cf annexe).

(*) Société reprise par la société Foss (cf. Lettre CECALAIT n°22)

Il n'existe pas de norme française (actuellement à l'état de projet), ni de cahier des charges officiel fixant les exigences en matière de précision de comptage cellulaire, aussi référence sera donc faite à la norme FIL 148 A: 1995.

❶ EVALUATION DE LA STABILITE DE L'APPAREIL

L'évaluation de la stabilité de l'appareil a été réalisée par l'analyse en mode automatique de 3 laits (600, 1000 et 1500 x 10³ cellules/ml environ) répétée en double toutes les 20 minutes au cours d'une demi-journée de travail, dans les conditions réelles d'un laboratoire interprofessionnel, l'ensemble de la manipulation a représenté 11 cycles de mesure, avec une configuration standard de 400 échantillons/heure.

Afin d'évaluer la stabilité de l'instrument, un calcul de répétabilité (Sr et r) et de reproductibilité (SR et R) a été effectué pour chacun des niveaux testés selon le modèle utilisé couramment pour les essais interlaboratoires d'évaluation de méthode (FIL 135 B: 1991).

Les essais montrent une bonne stabilité de l'instrument sur la période testée. En effet, l'écart type de reproductibilité relatif (SR%), pour les trois laits est respectivement de 3.4, 2.0, et 1.9%, nettement inférieur à 5 %, valeur maximale acceptée dans la norme FIL 148 A: 1995 comme coefficient de variation des numérations du même lait témoin au cours d'une journée.

❷ EVALUATION DE LA CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS

Ce paramètre a été évalué en mode d'analyse automatique, par le passage d'un même lait et filtrat de microfiltration exempt de cellules somatiques, selon la séquence « lait - lait - filtrat - filtrat », répétée 10 fois. Ce test a été effectué sur 3 laits de niveaux cellulaires différents, dans chacune des configurations à tester et sans correction interne de traçage. Le taux de contamination a été estimé par la formule :

$$Tc = [(S(\text{filt.1}) - S(\text{filt.2})) / (S(\text{lait2}) - S(\text{filt.2}))] \times 100$$

Le système SCC 500 laisse apparaître des contaminations entre échantillons variables de 1 à 2,5 % environ suivant la configuration et le niveau de contamination testé. Le logiciel de pilotage de l'instrument permet de compenser cette contamination en temps réel via un coefficient correcteur. Compte tenu des différences constatées, ce coefficient devra être déterminé par l'utilisateur en fonction de la configuration de travail choisie.

● EVALUATION DE LA REPETABILITE

La répétabilité a été testée en mode d'analyse automatique (précision standard) à partir de 118 laits individuels de vache provenant de 7 élevages, conservés avec du bronopol à 0,02% final.

Chaque élevage a été analysé en double selon la séquence spécifiée par la norme FIL 128 :

Ele1Rép1 / Ele1Rép2 / Ele2Rép1 / Ele7Rép1 / Ele7Rép2

Etendue (x10 ³ cellules/ml)	400 échantillons/heure					450 échantillons/heure				
	n	Moyenne	Sr	Sr %	r	n	Moyenne	Sr	Sr %	r
0 - 100	48	50	3.3	6.76	9.2	46	48	5.6	11.4	15.4
100 - 300	36	160	5.8	3.67	16.1	37	163	6.9	4.24	19.1
300 - 800	21	534	16.6	3.13	46.1	22	527	13.6	2.60	37.8
800 - 1500	9	942	11.6	1.23	32.1	9	941	17.6	1.87	48.7
1500 - 3000	4	2016	49.5	2.46	137.0	4	2086	32.6	1.58	90.4
0 - 3 000	118	304	12.5	4.14	34.74	118	310	11	3.56	30.5

TABLEAU 1 : Répétabilité sur l'ensemble des laits collectés

avec n : nombre d'échantillons
Sr % : Sr en pourcentage

Sr : écart-type de répétabilité
r : écart de répétabilité

● EVALUATION DE LA JUSTESSE

80 laits individuels de vache ont été sélectionnés parmi 118 prélevés dans 7 élevages du Jura et analysés en double sur l'appareil, préalablement calibré entre 0 et 1800 000 à l'aide de 9 échantillons commerciaux produits par CECALAIT. Ils sont ensuite analysés en simple par la méthode de référence (FIL 148A). En cas de résidu trop important après régression, un deuxième comptage a été effectué.

La justesse est estimée par les moyennes et les écarts types des écarts (appareil-référence) calculés par tranche de taux cellulaires. Chaque configuration a été calibrée préalablement aux analyses de laits individuels.

➤ CALIBRAGE DE L'APPAREIL

Le logiciel de calibrage utilise le principe de régression polynomial selon les moindres carrés, lequel permet d'ajuster simultanément linéarité et niveau de réponse sur les valeurs nominales des échantillons standards utilisés, aucun traitement de la linéarité du signal n'est effectué en amont.

Pour les deux configurations testées, la réponse de l'appareil est ajustée sur des polynômes d'ordre 3, entre 0 et 1800x10³ cellules somatiques/ml, ce qui a permis d'obtenir des écarts types résiduels de régression de 12800 pour la configuration standard et de 17100 pour la configuration 450 échantillons / heure.

➤ RESULTATS

Les droites de régression linéaire obtenue entre 0 et 2000x10³ cellules/ml montrent un bon ajustement de l'étalonnage pour les deux configurations testées avec les équations suivantes :

Le tableau 1 regroupe l'ensemble des résultats obtenus.

Le SCC 500 présente une répétabilité conforme aux indications de la norme FIL 148 A, avec un écart type de répétabilité relatif moyen inférieur aux 5 % recommandés, ceci pour les deux configurations testées.

On peut remarquer cependant que la configuration « vitesse maximale » présente des valeurs de répétabilité supérieures à celles de la configuration standard dans les taux cellulaires les plus faibles.

Configuration 400 éch / heure

$$REF = 0,987 \times (SCC 500) - 4,4$$

$$Biais\ moyen : + 9100$$

$$Ecart\ type\ résiduel\ de\ régression: 23025$$

Configuration 450 éch / heure

$$REF = 0,996 \times (SCC 500) - 13,9$$

$$Biais\ moyen: +15500$$

$$Ecart\ type\ résiduel\ de\ régression: 27994$$

Dans la configuration standard, le biais moyen observé de + 9000 représente + 2,4 % en valeur relative, et la précision d'estimation apparaît constante à tous niveaux ($\pm 50\ 000$ environ).

Par rapport à cette configuration standard, la configuration « vitesse maximale » montre un biais moyen relatif plus important (de l'ordre de + 4,1 %) et une précision d'estimation également plus élevée au delà d'un niveau de 500 000, en augmentation avec les taux cellulaires des échantillons.

Pour les deux configurations, les biais moyens par tranche de taux cellulaire, même statistiquement significatifs pour certains, restent faibles et dans les limites autorisées par les incertitudes cumulées des étalonnages et des comptages visuels et compatible à la fois avec les besoins du paiement du lait et ceux du contrôle laitier.

La comparaison des résultats des 80 échantillons analysés dans les mêmes conditions sur le SCC 500 et un Somacount 150 (Bentley, USA) fonctionnant sur le principe de la cytométrie de flux utilisé par CECALAIT, montre une étroite concordance entre les deux appareils (écart type résiduel de 16800) sur la plage de calibrage (0 à 2 000x10³). Les paramètres de justesse, calculés par tranche de taux cellulaires sont reportés dans le tableau 2

Etendue de la mesure (x10 ³ cellules/ml)	400 échantillons/heure					450 échantillons/heure				
	n	Moyenne	d	Sd	+/- I	n	Moyenne	d	Sd	+/- I
0 - 100	16	73	+11.1 *	18.2	+/-36.4	16	73	+16.0 *	19.8	+/-40.6
0-200	38	107	+8.2 *	16.3	+/-32.6	38	107	+16.5 *	20.5	+/-41.0
100-300	31	166	+5.5 NS	18.0	+/-36.0	31	166	+17.7 *	21.5	+/-43.0
200-400	15	286	-3.0 NS	26.3	+/-52.6	15	287	+9.9 *	27.9	+/-55.8
330-600	13	435	+10.2 NS	35.4	+/-70.8	13	435	+19.5 *	34.2	+/-68.4
400-600	7	508	+30.4 *	29.7	+/-70.4	7	508	+40.2 *	21.8	+/-43.6
600-1000	13	782	+10.9 NS	27.4	+/-54.8	13	782	+8.0 NS	38.2	+/-76.4
0-500	56	174	+5.4 NS	20.8	+/-41.9	56	174	+15.5 *	22.9	+/-45.8
500-1000	17	728	+18.6 *	28.8	+/-57.6	17	728	+17.2 NS	38.2	+/-76.4
1000-2000	4	1476	+20.9 NS	24.1	+/-48.2	3	1403	+6.4 NS	52.7	+/-105.4
0-2000	77	364	+9.1 *	23.4	+/-46.8	76	346	+15.5 *	27.8	+/-55.6

TABLEAU 2 : Justesse du SCC 500

n : nombre d'échantillons

\bar{d} : moyenne des écarts appareil-référence

Sd : écart-type des écarts

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

* : significatif au seuil de 5%

NS : non significatif

5 CONCLUSION GENERALE

L'appareil ANADIS SCC 500, évalué à la demande de la société PERSTORP/ ANADIS, donne satisfaction sur l'ensemble des points testés: stabilité, traçage, répétabilité et justesse pour les deux configurations de travail et présente les qualités requises pour l'utilisation dans le cadre du paiement du lait et du contrôle laitier.

Pour l'utilisateur, il est important de noter que l'ajustement de la linéarité et la justesse de cet instrument s'effectue de façon simultanée à partir d'une régression polynomiale dont le degré est laissé au choix de l'utilisateur. Cet ajustement est dépendant de la configuration de travail (volumes respectifs, temps de comptage...). Une attention toute particulière doit être portée au choix des étalons (nombre, niveaux cellulaires...), à leur qualité de conservation et à une utilisation exacte des valeurs de référence de manière à prévenir tout artefact d'étalonnage lié à un (ou plusieurs) points « aberrant »s. Un contrôle graphique de l'ajustement ainsi qu'un contrôle de la valeur de l'écart type résiduel doivent être appliqués systématiquement.

Références

FIL 135B: 1991. LAIT ET PRODUITS LAITIERS. Caractéristiques de fidélité des méthodes analytiques - Schéma de conduite d'une étude collaborative.

FIL 148A:1995. LAIT. Numération des cellules somatiques du lait.

Annexe

Configuration 400 échantillons / heure

Volume de lait pompé: 5.0 ml
 Volume de colorant pompé: 3.0 ml
 Volume analysé: 70 µl
 Temps de comptage: 4000 ms
 Temporisation: 150 µs
 Seuil de discrimination: 800 mV

Configuration 450 échantillons / heure

Volume de lait pompé: 3.0 ml
 Volume de colorant pompé: 3.0 ml
 Volume analysé: 60 µl
 Temps de comptage: 3500 ms
 Temporisation: 150 µs
 Seuil de discrimination: 800 mV

(par Ph. Trossat et O. Leray)

RENDEZ-VOUS

27-29 OCTOBRE 1997 : INTERNATIONAL WHEY CONFERENCE A CHICAGO (USA)

3-4 NOVEMBRE 1997 : SYMPOSIUM ON CODEX PROCEDURES AND IMPORTANCE A CHICAGO (USA)

17-20 NOVEMBRE 1997 : BELGIEN HYGIENE WEEK A BRUXELLES (BELGIQUE)

9-13 MARS 1998 : NEUSEELAND NUTRITION WEEK A WELLINGTON (NOUVELLE ZELANDE)

Pour tout renseignement, prendre contact avec les organismes suivants :

FIL	ALF
C. Brooks	34, rue de Saint Petersburg
41, square Vergote	75382 PARIS CEDEX
B 1040 BRUXELLES	TEL : 01.49.70.71.11
BELGIQUE	FAX : 01.42.80.63.45
TEL : +32.2.733.98.88	
FAX : +32.2.733.04.13	
E-mail : fil-idf@mail.interpac.be	

NORMES ET PROJETS DE NORMES PARUS RECEMMENT

(reçus entre Aout 97 et Octobre 97)

NORMES FIL

99C:1997. PRODUITS LAITIERS. Evaluation sensorielle des produits laitiers par cotation. *Méthode de référence.*

Cette norme remplace la norme provisoire FIL 99B:1995. Elle reprend le même texte en élargissement son domaine d'application. En effet, les méthodes pour l'évaluation de quatre nouveaux types de produits sont rajoutées, à savoir : le lait de consommation, la crème, les produits à base de lait fermenté et les crème glacée. Dans tous les cas, sont définis, le domaine d'application, les dispositions générales, le mode de prélèvement et de préparation des échantillons et l'évaluation avec la table internationale des termes qualitatifs spécifiques aux produits.

110B:1997. PRESURE DE VEAU ET PEPSINE BOVINE ADULTE. Détermination des teneurs en chymosine et en pepsine bovine (Méthode chromatographique).

La norme remplace la FIL 110A:1987, sans équivalent ISO

Cette norme spécifie la nature de l'échantillon présure de veau et pepsine de bovin adulte. Le principe d'analyse reste le même, mais le protocole est modifié en raison de la réactualisation du mode de séparation de la chymosine et tient compte de la norme provisoire FIL 157:1992 concernant le dosage de l'activité coagulante totale dans les présures bovines.

NOUVEAUTES DANS LA REGLEMENTATION

FRANCE

Avis du 30/07/1997, relatif aux appareils d'analyse utilisés dans le cadre du paiement du lait en fonction de sa composition et de sa qualité. On y rappelle la liste des appareils d'analyse qui bénéficient d'une autorisation d'emploi dans ce cadre. Par rapport

à l'avis du 2 Mars 1996, des appareils concernant la détermination de la composition et les dénombrements des germes totaux restent identiques. Par contre, pour le dénombrement des leucocytes, 3 appareils ont été ajoutés et un lecteur automatique de butyromètre a été autorisé. La liste, reprise dans le tableau ci-dessous, complète celle de mars 1996.

ANALYSE	FABRICANT ou DISTRIBUTEUR	APPAREIL	DATE autorisation
leucocytes	Foss Electric	Fossomatic 400	22.01.96
		Fossomatic 5000	19.06.96
	Anadis Instruments	SCC 500	26.03.97
Lecteur automatique de butyromètres	Sidena	Butyna	13.01.97

EUROPE COMMUNAUTAIRE

Règlement CE n°1278/97 modifiant le règlement CE n°577/97 portant certaines modalités d'application du règlement n°2991/94 du Conseil établissant des normes pour les matières grasses tartinables et du règlement CEE n° 1898/87 concernant la protection de la dénomination du lait et des produits laitiers lors de leur commercialisation (JOCE L 175 du 03.07.1997)

Il est tenu de déclarer la teneur en matière grasse minimale du produit sur tous les produits concernés par le règlement n°2991/94, à savoir le beurre, la margarine et les matières grasses composées. Une dérogation est accordée pour les marques déposées en Autriche, Finlande et suède avant le 1^{er} janvier 1995.

Directive 97/41/CE du conseil modifiant les directives 76/895/CEE, 86/362/CEE, 86/363/CEE et 90/642/CEE concernant la fixation de teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur et dans, respectivement, les fruits et légumes, les céréales, les denrées alimentaires d'origine animale et certains produits d'origine végétale, y compris les fruits et légumes (JOCE L 184 du 12.07.1997).

Le domaine d'application est élargi notamment aux préparations pour nourrissons, aux produits séchés et aux ingrédients entrant dans la composition d'un produit composite. Les aspects de circulation des produits ont été recadrés dans l'article 5 ainsi que les mesures à prendre en cas de non-conformité d'un produit (article 9). La procédure concernant l'établissement de listes de produits ou de résidus pesticides est modifiée (articles 10 à 12).

DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

Les entérotoxines staphylococciques sont la cause de nombreuses toxi-infections alimentaires. Huit types sont actuellement connus dont le plus courant (type A) est responsable de 75% des cas. La dose limite infectante est de l'ordre de 100 ng de toxine par prise, il est donc indispensable d'avoir des méthodes de détection sensibles. Plusieurs kits utilisant des techniques immunologiques sont disponibles mais généralement non satisfaisants au niveau de leur sensibilité. Ce défaut est pallié avec un enrichissement de l'extrait alimentaire, avant dosage, par une méthode de dialyse/concentration, protocole mis au point au CNEVA Paris. L'association de ce mode de préparation aux diverses trousses assure la détection des entérotoxines à des niveaux inférieurs au seuil de toxicité.

GENERALITES

Les entérotoxines staphylococciques sont des métabolites de la croissance de staphylocoques toxigènes coagulase +. Des travaux ont rapportés que certains staphylocoques coagulase - seraient toxigènes mais leurs réelles implications dans des toxi-infections alimentaires restent à prouver. Ce sont des toxines protéiques de 27000 à 30000 daltons préformées dans les aliments contaminés par un nombre suffisant de staphylocoques toxigènes (supérieur à 10^5 cellules/g).

Elles sont responsables de nombreux cas de toxi-infections alimentaires (TIA) se situant, en France, au second rang des TIA d'origine bactérienne. La symptomatologie est rapide et brutale, entre 1 et 6 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé, avec vomissements, diarrhées et douleurs abdominales. La dose limite infectante est de l'ordre de 100 ng par prise alimentaire.

La prise en compte des facteurs « dose toxique et extraction difficile » pour ces entérotoxines de staphylocoques implique la nécessité de détenir des techniques de détection sensibles dans les denrées alimentaires complexes tels que les produits laitiers.

Huit entérotoxines sont à ce jour, connues, les types A, B, C₁, C₂, C₃, D, E et H. Parmi celles-ci, les plus fréquemment impliquées dans les phénomènes toxi-infectieux sont les types A, B, C_n, (n=1,2,3) et D, le type A représentant 75% des TIA à staphylocoques. Le type E correspond à 1% des souches staphylocoques toxigènes; quant au type H, il est encore actuellement peu décrit en raison de son identification récente (1995). Néanmoins, il faut retenir qu'il a été identifié dans des produits laitiers impliqués dans une TIA en Amérique du sud.

RECHERCHE DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

Elle se divise en deux parties : préparation de l'aliment en vue d'une extraction, puis détection des entérotoxines, d'autre part.

1 PREPARATION DES ALIMENTS

L'extraction des entérotoxines staphylococciques se fait à partir d'un broyat de l'aliment dans une solution aqueuse, suivi d'une acidification, une centrifugation, une neutralisation et une ultime centrifugation, la recherche des toxines étant réalisée sur la phase aqueuse issue de la deuxième centrifugation.

Des études réalisées au CNEVA Paris sur l'extraction des entérotoxines montrent que le taux de recouvrement des entérotoxines ajoutées à différentes matrices alimentaires est variable et partiel, inférieur à 50% selon les produits. Par ailleurs, ce taux est encore plus faible dans le cas d'une contamination naturelle.

2 RECHERCHE DES ENTEROTOXINES

Elle se fait à l'aide de méthodes immunologiques, de type :
EIA (Enzyme Immuno Assay)
ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)
RPLA (Reverse Phase Latex Agglutination).

L'utilisateur ne peut intervenir sur les caractéristiques de ces différents outils de diagnostic délivrés sous forme de trousses de détection. La plupart ont de bonne sensibilité pour les toxines en solution, mais pas toujours suffisante au niveau de l'échantillon. En effet, compte tenu des paramètres « seuil de toxicité et extraction difficile et partielle », un seuil de détection de l'ordre de 0,1 ng de toxine par gramme de produit serait souhaitable pour certifier de la qualité hygiénique des produits en matière d'entérotoxines staphylococciques.

2-1 Dialyse/concentration

Des études menées au CNEVA Paris sur les facteurs pouvant intervenir sur l'extraction des entérotoxines et sur la composition de l'extrait alimentaire montrent que le seul facteur déterminant est « l'enrichissement de l'extrait ». Actuellement, celui-ci est réalisé par la méthode de dialyse/concentration. La phase récupérée à l'issue de la 2^{ème} centrifugation est mise à concentrer dans des sacs de dialyse, sous l'action du polyéthylène glycol. L'extrait concentré est ensuite solubilisé et repris par une solution tampon à pH 7,3. Le protocole détaillé peut être fourni sur simple demande.

La méthode d'enrichissement de l'extrait alimentaire par « dialyse/concentration » joue un rôle important dans la recherche des entérotoxines, car elle permet d'abaisser leur seuil de détection dans les denrées complexes, à des niveaux proches du seuil toxique.

Cette technique fait actuellement partie de la méthode officielle de recherche des entérotoxines staphylococciques (note de service DGAL/SDHA/N°97/N°8097 du 28 mai 1997). Néanmoins, en raison du manque de praticabilité et de standardisation de la « dialyse/concentration », d'autres techniques de capture et de purification des entérotoxines staphylococciques, faisant appel à la chromatographie d'affinité, sont à l'étude.

2-2 Point sur les techniques « officielles et/ou reconnues » de détection des entérotoxines staphylococciques en 1997

→ AOAC Official Method 976-31. *Staphylococcal Enterotoxins in Foods. Microslide Gel Double Diffusion Test (1976 et 1977).*

* Seuil de détection : 0,1 à 0,01 µg d'entérotoxines/ml.

* Durée : 48 à 72 heures.

* Toxines détectées : A à E.

→ AOAC Official Method 980-32. *Staphylococcal Enterotoxins in Foods. Extraction and separation methods (1980 et 1981).*

* Durée : 3 jours (dialyse/concentration + chromatographie).

→ AOAC Official Method 993-06. *Staphylococcal Enterotoxins in selected Foods. Polyvalent Enzyme Immunoassay method (TECRA SET) (first action 1993).*

* Seuil de détection : 4 à 10 ng d'entérotoxines/g d'aliment.

* Durée : 4 heures + préparation de l'extrait.

* Toxines détectées : A à E.

→ *J. of AOAC International (1996). Immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins (TRANSIA SET tubes) : inter-national interlaboratory studies. C. Lapeyre, M.N. De Solan and X. Drouet*

* Seuil de détection : 0,5 à 1,5 ng d'entérotoxines/g d'aliment.

* Durée : 90 mn + préparation de l'extrait.

* Toxines détectées : A à E.

→ TRANSIA SET tubes : validation AFNOR, en attente.

→ *Méthode du CNEVA Paris. Indirect double sandwich ELISA using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal A, B, C_n and D in food samples. Food Microbiology (1988). C. Lapeyre, F. Janin and S.V. Kaveri. Technique de référence pour les validations AFNOR et pour la DGAL.*

* Seuil de détection : < 0,1 ng d'entérotoxines/g d'aliment.

* Durée : 3 heures + préparation de l'extrait.

* Toxines détectées : A à E.

annexe : extrait de la note DGAL/SDHA/N°17/N°8097 du 28 mai 1997

Il y a lieu de distinguer la méthode officielle et les méthodes de routine. Cependant, dans les deux cas, compte-tenu de la fréquence des résultats « faux-négatifs » et en l'absence de technique validée AFNOR, il importe de faire précéder la détection des toxines par une phase de dialyse/concentration adaptée pour pallier au faible rendement d'extraction de toxines.

Méthodes de routine

La mise en oeuvre d'une de ces méthodes comporte la phase de dialyse/concentration puis l'utilisation, au choix du laboratoire selon son équipement et ses habitudes, de l'une des méthodes dont la liste figure ci dessous.

SET RPLA (Oxoid)		RPLA
SET EIA (Bommeli)	EIA	
Ridascreen SET A, B, C, D, E (Biopharm)		EIA
SET Vidas (Bio Mérieux)		ELFA
TRANSIA SET tubes, SET plaques(Transia-Diffchamb)		EIA

Cependant, compte-tenu de la fréquence élevée des résultats « faux-positifs », dans le cas où l'utilisation d'une de ces méthodes révélerait la présence d'entérotoxine, le résultat doit être confirmé par l'utilisation d'une seconde parmi celles citées et différente de la première.

Pour les laboratoires susceptibles de la mettre en oeuvre, la méthode SET-EIA du fabricant Bommeli peut, au titre de l'autocontrôle, être utilisé directement sans phase de dialyse/concentration.

Les méthodes utilisées en routine pourront être mises en oeuvre dans le cadre des autocontrôles.

Méthode officielle

La méthode officielle préconisée par le CNEVA Paris comporte la phase de dialyse/concentration puis l'utilisation obligatoirement de l'une des deux troussees TRANSIA, méthodes présentant le moins d'interférences possibles avec les enzymes endogènes de la matrice laitière.

La méthode de référence devra être utilisée dans le cas où la recherche d'entérotoxines est en relation, avec une toxi-infection alimentaire collective à partir de produits laitiers ou bien dans le cadre de contrôle officiel lorsque la numération de *Staphylococcus aureus* est supérieure à 10⁴germes/grammes.

2-3 Troussees de détection des entérotoxines staphylococciques

Il existe actuellement sept troussees de détection :

SET RPLA (Oxoid)
SET EIA (Bommeli)
TECRA S.E.V.I. (BioenterprisesPty.Ltd)
TRANSIA SET tubes (Transia-Diffchamb)
TRANSIA SET plaques (Transia-Diffchamb)
Ridascreen SET A, B, C, D, E (Biopharm)
SET Vidas (Bio Mérieux)

Parmi ces troussees, TECRA est recommandée par l'AOAC, TRANSIA SET tubes est en attente de reconduction de validation AFNOR et a été expertisée lors d'une étude collaborative internationale publiée dans le JAOAC en 1996.

Par ailleurs, la commercialisation de la trousse SET Vidas est momentanément stoppée.

Le tableau 1 présente les avantages et inconvénients de chacune de ces troussees.

2-4 Point sur les techniques d'identification et de détection des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers (cadre des contrôles officiels et de routine)

Ces techniques sont décrites dans la note de service DGAL/SDHA/N°17/N°8097 du 28.05.97, faisant référence à l'arrêté du 30 mars 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 (voir en annexe).

(par C. LAPEYRE, CNEVA Paris)

FABRICANT	NOM	Type	Toxines détectées	Test : Volume durée enzyme	Limite de détection	AVANTAGES	INCONVENIENTS
OXOID	SET RPLA	RPLA	[A] - [B] - [C] - [D]	25 µl 24 Heures	0,2 ng/ml	* Pas d'interférence pour le lait cru * Sensibilité ++ * Détection spécifique * Contrôle matrice	* Interprétation difficile * Durée longue * Pas de détection de SEE * Concentration OUI
Bommeli	SET EIA	EIA	[A] - [B] - [C] - [D]- [E] - [H] !!	20 ml 1 nuit + 7H Phosphatase	0,1 à 1 * ng/ml (* SED)	* Sensibilité ++++ (sauf SED) * Concentration NON * Détection possible H (Ac - D) !! * Détection spécifique * Contrôle matrice	* Assez difficile d'emploi * Faux positifs (+) dans les produits laitiers (E.E.) * Durée longue
Bioenterprises Pty Ltd	TECRA S.E.V.I.	EIA	[A B C D]	200 µl 4H péroxydase	1 ng/ml	* Test rapide et facile	* Sensibilité mauvaise * Pas de détection de SEE * Faux positifs (+) dans les produits laitiers (E.E.)
Diffchamb TRANSIA	1- SET tubes 2- SET plaques	EIA	[A B C D E]	500 µl test 1 200 µl test 2 90 min péroxydase	0,05 à 0,2 ng/ml	* Sensibilité ++ * Tests rapides et faciles * Automatisation possible pour le test 2	* Faux positifs (+) dans les produits laitiers (E.E.) * Concentration OUI
Biopharm	Ridascreen SET A, B, C, D, E	EIA	[A] - [B] - [C] - [D]- [E]	100 µl 2 H30 péroxydase	0,1 ng/ml	* Sensibilité ++ * Détection spécifique * Contrôle matrice * Test rapide et facile	* Faux positifs (+) dans les produits laitiers (E.E.) * Concentration OUI
Bio Mérieux	SET VIDAS	ELFA	[A B C D E] H !!	500 µl 1H 20 Phosphatase	0,1 à 1 * ng/ml (* SEC)	* Test rapide et facile * Automate * Détection possible H (Ac - D) !! * Sensibilité ++ (sauf SEC)	* Faux positifs (+++) dans les produits laitiers (E.E.) * Concentration OUI * Automate

Tableau 1 : Liste des différentes trousse disponibles avec les avantages et inconvénients

H !! : la détection de cette entérotoxine n'est pas prouvée

AC - D : méthode utilisant des anticorps anti entérotoxines D

SEE, SEC, SED : Staphylococcal enterotoxin E, C, D

E.E.: Enzyme endogène

VALIDATIONS AFNOR

Mme Robert de l'AFNOR nous a fourni les informations concernant les méthodes alternatives d'analyse : une nouvelle méthode a été validée et cinq autres ont eu une prolongation ou reconduction de date de fin de validation.

➤ pour les Laboratoires 3M SANTE, les techniques Pétrifilm ont vu leurs dates de validations reconduites pour 4 ans, à savoir :

* Pétrifilm Flore Totale jusqu'au 10.09.2001

* Pétrifilm E. Coli jusqu'au 06.06.2006

➤ Le milieu de dénombrement des E. Coli distribué par la Société SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR (Milieu « Rapid » E. Coli) est prolongé jusqu'au 30.11.1997, tout comme la méthode Pétrifilm Coliformes, (3M SANTE) validée jusqu'au 30.11.1997.

➤ Le système de détection des antibiotiques, fabriqué par VALIO et commercialisé par UCB Pharma S.A. sous la dénomination « Test T101 Flacon, plaque 16 puits, plaque 96 puits », a une date de fin de validation prolongée jusqu'au 10.09.2001.

➤ Les Laboratoires 3M SANTE commercialisent un milieu de culture pour la numération des entéro-bactéries, sous la référence « Petrifilm enterobacteriaceae », s'appliquant à tous produits d'alimentation. Cette recherche fait appel à la méthode de référence NF ISO 7402 (V08-021). Sa période de validation s'étend du 10.09.1997 au 10.09.2001. N'ayant pas encore reçu d'information détaillée sur cette méthode, nous vous tiendrons au courant dès que possible.

➤ Une liste des méthodes validées AFNOR, classée par type de méthode, a été publiée :

- Pour la recherche d'antibiotiques, où la méthode de référence est publiée dans J.O. du 6.10.83, deux tests ont été validés :

* Penzym, basé sur le principe d'une réaction enzymatique, applicable au lait cru, stérilisé ou en poudre;

* T 101, basé sur le principe d'une réaction bactérienne, applicable au lait cru.

- Pour les microorganismes, la synthèse est résumée dans le tableau suivant :

Recherche ou dénombrement	Salmonelle	Listeria (genre)	Listeria mono.	Entero-Bactéries	Coliformes	E. Coli	E. Coli O157	Flore totale (*)
Méthode référence	NF ISO 6579	V 08-055	V 08-055	NF ISO 7402 (V08-021)	ISO 4831 (V08-016) ISO 4832 (V08-015) V08-017	ISO 4832 NF V08-017	Méthode BAM 1992	ISO 4833 FIL 100A
Type de méthode								
Milieu de culture				Pétrifilm Entéro-bacteriaceae	-Pétrifilm Coliformes - P2000	-Pétrifilm E. Coli -Rapid'E.Coli.		-Pétrifilm Flore totale
Test immunologique	-Salmonella Rapid test -Salmonella 1-2 test -Dynabeads salmonella	-Listeria rapid test -Listerscreen					-Dynabeads E. Coli O157	
Test immunoenzymatique	-kit TECRA -kit TRANSIA -VIDAS Salmonella -Salmonella Tek	-kit TRANSIA -kit TRANSIA (enrichissement ISO-FRASER) -VIDAS listeria	-VIDAS Listeria mono.					
Test d'hybridation moléculaire		-Genetrak listeria	-Genetrak Listeria mono. -Accuprobe Listeria mono.					
P.C.R.	-Probelia Salmonella							

* : Pour le lait pasteurisé, la norme FIL 100A (remplacée par la FIL 100B) fait référence au dénombrement des microorganismes à 30°C.

DU COTE DE LA BIBLIO

Cette fois encore, nous vous fournissons en annexe la liste complète des références intégrées dans 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.