

GERMES PATHOGENES :

REGLEMENTATION ET METHODES DE DETECTION

(Résumé de l'intervention de Mme LAFARGE du CNEVA Paris lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT)

L'analyse des germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers fait l'objet d'une série de réglementation à l'échelle française et européenne avec des méthodes de détection pas toujours harmonisées. L'interprétation des résultats pour les critères microbiologiques peut diverger selon les organismes. Cette présentation a permis de faire la synthèse de tous ces points et a apporté des précisions sur la conduite à tenir vis à vis des résultats obtenus.

REGLEMENTATION

Les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché doivent répondre à des critères microbiologiques. Ces critères microbiologiques sont définis au niveau européen dans la directive 92/46/CEE du 16 juin 1992 et au niveau français dans l'arrêté ministériel du 30 mars 1994, qui est la transposition en droit français de cette directive, avec quelques modifications. Le tableau 1 indique les produits laitiers pour lesquels les critères microbiologiques ont été modifiés ou apportés par rapport à la directive 92/46/CEE.

Selon l'établissement de transformation, cette nouvelle réglementation est appliquée ou ne l'est pas. On distingue deux catégories d'établissements :

* établissements dérogatoires temporaires qui appliquent, jusqu'au 31 décembre 1997, la réglementation nationale antérieure à la directive 92/46/CEE (A.M. du 21.12.79 : laits fermentés..., A.M. du 21.06.82 : lait pasteurisé conditionné, A.M. du 15.04.86 : beurre..., A.M. du 21.11.83 : lait stérilisé et UHT, A.M. du 06.08.85 : lait cru° .

* établissements en possession d'un agrément sanitaire qui doivent appliquer l'A.M. du 30 mars 1994

Lors de l'interprétation des résultats, selon l'A.M. appliqué ou selon la nature du produit analysé pour l'A.M. du 30 mars 1994, la tolérance analytique sera appliquée ou ne sera pas ; note de la DGAL n° 2686 du 24 octobre 1996 (voir annexe).

Types de germes	produits	normes (ml, g)
<i>Listeria monocytogenes</i>	fromages autres que pâtes dures autres produits à base de lait * (sauf poudre de lait)	absence dans 25g n=5 et c=0 absence dans 1g n=5 et c=0
<i>Salmonella spp</i>	tous produits à base de lait sauf poudre de lait poudre de lait	absence dans 25g n=5 et c=0 absence dans 25g n=10 et c=0 <u>absence dans 1g</u> *** <u>absence dans 1g</u> ***
Germes à 30°C	produits glacés à base de lait (y compris glaces et crèmes glacées) <u>autres produits à base de lait</u> **	m = 100000 M = 500000 n = 5 et c = 2 <10 (pour 0,1 ml)
<u>Coliformes à 30°C</u> (par ml)	lait cru de vache destiné à la consommation en l'état	m = 100 M = 1000 n = 5 et c = 2
<u>Streptocoques β-hémolytiques</u> (pour 0,1ml)	lait cru de vache destiné à la consommation en l'état	absence n = 5 et c = 0

Tableau 1 : critères microbiologiques définis selon la directive 92/46/CEE du 16 juin 1992, modifiée selon les arrêtés : du 30 mars 1994 et du 2 mars 1995

* cette recherche n'est pas obligatoire pour les laits de conserve et les produits à base de lait traités par la chaleur après leur conditionnement ou leur emballage

** critère applicable aux produits à base de lait se présentant sous forme liquide ou gélifiée qui ont subi un traitement UHT ou de stérilisation et qui sont destinés à être conservés à température ambiante

*** la recherche des Salmonelles doit être effectuée dans 25g et non dans 1g contrairement à ce qui est indiqué dans l'A.M. du 2 mars 95

L'interprétation des résultats, en terme de conformité microbiologique d'un lot a été dictée par une note de service de la DGAL n° 8121 (13 juillet 1994) précisant les règles de mise sur le marché des laits de consommation et des produits à base de lait.

considéré comme défavorable et n'empêche pas la mise sur le marché du lot considéré.

Laits de consommation : Les lots de lait ne peuvent être mis sur le marché que s'ils satisfont à tous les critères qui leur sont applicables. Tous les résultats doivent être "satisfaisants" ou "acceptables".

Produits à base de lait : La mise sur le marché des lots est possible dès que les résultats sont "satisfaisants" en *Listeria monocytogenes* et *Salmonella*.

Le critère *Staphylococcus aureus* n'a pas de conséquence réglementaire sur la mise sur le marché des produits sauf pour les fromages à pâte molle. En effet, dès que le résultat dépasse M, la recherche de la présence d'entérotoxine staphylococcique doit être entreprise, et si la toxine n'est pas mise en évidence, le résultat de l'analyse n'est pas

METHODES DE DETECTION

Les méthodes de détection des germes pathogènes sont décrites dans diverses normes. Elles peuvent être classées selon différents critères :

- nature : méthodes traditionnelles (méthodes de dénombrement en milieu solide ou liquide, méthodes de recherche après enrichissement) ou méthodes rapides telles que les méthodes immunologiques, l'impédancemétrie ou les sondes nucléiques-hybridation. Le choix de la méthode rapide est à l'appréciation du laboratoire en fonction du nombre d'échantillons à analyser, du prix de revient de l'analyse, de l'équipement disponible, du personnel en place et de la nature de l'échantillon.
- dimension : nationale (méthode AFNOR) ou internationales (méthodes FIL ou ISO).

Pour les germes pathogènes, l'ensemble des méthodes disponibles est résumé dans le tableau suivant

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli enterohemorhagique</i>
METHODES TRADITIONNELLES					
Référence	NF ISO 11290-1 (97) FIL 143A (95)	NF ISO 6579 (93) FIL 93B (95)	NF V08-014 (84) FIL 145 (90) FIL 60B (90) NF V08-057-1 (94) NF V08-057-2 (94)	NF V08-017 (80) NF ISO 7251 (94) FIL 170 (94)	cf. FDA Bacteriological Analytical method
Routine	NF V08-055 (93)	NF V08-052 (93)		NF V08-053 (93)	
METHODES RAPIDES					
Validées	- TRANSIA <i>Listeria</i> - VIDAS <i>Listeria</i> - VIDAS <i>Listeria mono.</i> - GENE TRAK <i>Listeria</i> - GENE TRAK <i>Listeria mono</i> - GEN-PROBE - ACCUPROBE <i>Listeria mono</i> - <i>Listeria</i> RAPID TEST - LISTERSCREEN	- <i>Salmonella</i> Rapid Test - Kit TECRA - Kit TRANSIA - Kit LOCATE - <i>Salmonella</i> 1,2 Test - VIDAS <i>Salmonella</i> - <i>Salmonella</i> Tek - Dynal <i>Salmonella</i> - Probelia <i>Salmonella</i> - Gélose RAMBACH		- PETRIFILM <i>E. coli</i> - Milieu "RAPID" <i>E. coli</i>	- DYNABEADS Anti <i>E. coli</i> 0157
Autres					- VIDAS <i>E. coli</i> 0157 - PETRIFILM HEC - VIP TM <i>E. coli</i> 0157:H7 - EZ COLI 0157 - Milieu RAINBOW™ AGAR 0157

Tableau 2 : Synthèse des méthodes de détection des principaux germes pathogènes pour l'analyse du lait et des produits laitiers

La comparaison de ces méthodes de détection pour *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli* sont disponibles auprès de CECALAIT (Transparents de Mme LAFARGE).

Certaines méthodes ont fait l'objet d'études comparatives, en essayant de définir les avantages et les inconvénients. Ainsi pour les méthodes de dénombrement des *E. coli*, les

trois méthodes de référence par la technique de comptage des colonies ont été évaluées (tableau suivant).

Pour les méthodes de dénombrement des *Staphylococcus*

aureus, les deux milieux de culture ont été comparés (BP et RPFA) ; l'ensemble des résultats est présenté dans la Lettre de CECALAIT n° 20.

	Avantages	Inconvénients
NF V08-017 (VRBL)		- résultats en 4 j - confirmation des colonies
NF V08-053 (PTX)	- résultats en 24h - pas de confirmation des colonies - bonne spécificité - adaptée aux analyses en série	- pas dénombrement des <i>Escherichia coli</i> β glucuronidase négative
FIL 170 (membrane)	- dénombrement des bactéries stressées - bonne spécificité	- méthode contraignante (étape de revivification 4h à 37°C) - coûteuse

Tableau 3 : comparaison des trois méthodes de référence pour la détection de *E. coli* par la technique de comptage des colonies

CONCLUSION

Dans le domaine de recherche concernant les méthodes d'analyse du lait et produits laitiers, l'unité Hygiène et Microbiologie des produits laitiers du CNEVA Paris travaille sur plusieurs axes tels que :

- * Evaluation des méthodes de détection des *Escherichia coli* 0157:H7
- * Etudes de nouveaux bouillons d'enrichissement pour *Listeria*
- * Amélioration de la méthode de préparation des prises d'essais de caséine présure
- * Etude de milieux sélectifs pour staphylocoques.

ANNEXES

Liste des arrêtés et des directives

Directive 92/46/CEE du 16 juin 1992 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

Directive 94/71/CEE du 13 décembre 1994 modifiant la Directive 92/46/CEE du 16 juin 1992

A.M. 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

A.M. du 2 mars 1995 relatif à l'agrément des centres de collecte, de standardisation ou de traitement du lait et des établissements de transformation du lait et des produits à base de lait.

Tolérance analytique appliquée

- A.M. du 21 décembre 1979 : laits fermentés, ...
- A.M. du 21 juin 1982 : lait pasteurisé conditionné
- A.M. du 15 avril 1986 : beurre et corps gras à base de matière grasse butyrique
- A.M. du 30 mars 1994 : fromages, poudre de lait et produits glacés à base de lait (tolérance jusqu'à 3m)

Tolérance analytique non appliquée

- A.M. du 21 novembre 1983 : laits stérilisés et laits UHT
- A.M. du 6 août 1985 : lait cru
- A.M. du 30 mars 1994 : tous les produits sauf les fromage, la poudre de lait et les produits glacés à base de lait

Liste des normes

METHODES DE DETECTION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

NF ISO 11290-1 (1997) – Microbiologie alimentaire – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* – Partie 1 : Méthode de recherche

FIL 143 A (1995) – Lait et produits laitiers – Recherche de *Listeria monocytogenes*

NF V08-055 (1993) – Microbiologie alimentaire – Recherche de *Listeria monocytogenes* – Méthode de routine

METHODES DE DETECTION DE *SALMONELLA*

NF ISO 6579 (1993) – Microbiologie – Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*

FIL 93B (1995) – Lait et produits laitiers – Recherche des *Salmonella*

NF V08-052 (1993) – Microbiologie alimentaire – Méthode de routine pour la recherche des *Salmonella*

METHODES DE DENOMBREMENT DES *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

NF V08-014 (1984) – Microbiologie alimentaire – Directives générales pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus* – Méthode par comptage des colonies

FIL 145 (1990) – Lait et produits à base de lait – Dénombrement des *Staphylococcus aureus* – Technique de comptage des colonies à 37°C

FIL 60B (1990) – Produits laitiers secs – Dénombrement de *Staphylococcus aureus* – Technique du nombre le plus probable

NF V08-057-1 (1994) – Microbiologie alimentaire – Méthode de routine pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C – Partie 1 : Technique avec confirmation des colonies

NF V08-057-2 (1994) – Microbiologie alimentaire – Méthode de routine pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C – Partie 2 : Technique sans confirmation des colonies

METHODES DE DENOMBREMENT DES *E. COLI*

NF V08-017 (1980) – Microbiologie alimentaire – Directives générales pour le dénombrement des coliformes fécaux et d'*E. coli*

NF ISO 7251 (1994) – Microbiologie – Directives générales pour le dénombrement d'*E. coli* présumés – Technique du nombre le plus probable

FIL 170 (1994) – Lait et produits laitiers – Dénombrement d'*E. coli* présomptifs

- Partie 1 : Technique du nombre le plus probable

- Partie 2 : Technique du nombre le plus probable à l'aide de 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide (MUG)

- Partie 3 : Technique par comptage des colonies sur membranes à 44°C

NF V08-053 (1993) – Microbiologie – Dénombrement des *E. coli* β -glucuronidase positive par comptage des colonies à 44°C – Méthode de routine