

EVALUATION DU RIDABUTY (R-Biopharm) POUR L'ESTIMATION DE LA CONTAMINATION DU LAIT EN SPORES DE *CLOSTRIDIA*

La méthode testée :

Comme pour la méthode de référence, le principe de numération de la méthode testée est celui du calcul du nombre le plus probable (NPP) à partir du nombre de puits révélés positifs sur 5 ensemencés à la dilution 0, et 5 à la dilution -1.

Le RIDABUTY est utilisé dans cette méthode pour la détection de la positivité ou négativité des puits ensemencés. Cet instrument est basé sur le principe de la nanorespirométrie (à pression et volume variable) et la mesure du gaz produit par un développement bactérien. Il a été mis au point par M. Bruno VERDIER du CNRS (Brevet n° 90 0 1605) et la Société AISSOR (Brevet n° FR 0011555 + PCT). L'appareil est distribué par la Société R-BIOPHARM.

Précisément, la méthode consiste en un ensemencement de microplaques de 96 puits par 1 ml de prise d'essai (lait ou dilution -1) et 70µl de bouillon Bryant et Burkey modifié par Bergère adapté à la méthode. La dilution -1 est réalisée dans du lait UHT (il est ainsi possible de réaliser 8 analyses par plaque). Après thermisation par aspersion d'eau à 80°C sous la plaque pendant 13 minutes, un film d'aluminium est thermoscellé sur la plaque. Le mélange lait-milieu contenu dans la plaque est agité manuellement, puis la plaque est refroidie et incubée sous presse 7 jours à 37°C +/- 1.

La lecture des plaques se fait par passage dans l'appareil RIDABUTY après centrifugation et perçage. L'appareil mesure le flux gazeux (exprimé en nanoMole/µl/heure) émis par chaque puits de la microplaque.

Ces résultats sont ensuite convertis en puits positifs ou négatifs à l'aide d'une valeur seuil (en flux gazeux) définie dans le logiciel de l'instrument. Le nombre de puits positifs détecté à la dilution 0 ainsi qu'à la dilution -1 (sur les 5 ensemencés) permet ensuite de quantifier le résultat en nombre de spores par litre de lait.

Lors de cette étude, l'exploitation des données brutes a été réalisée selon deux modalités de seuillage différentes :

- 1) Un seuil fixé à -0,14 (correspondant à une valeur seuil réelle de flux de -0,28 nanoMole/µl/heure) paramétré dans l'instrument pour tous les essais réalisés (identification dans les tableaux de résultats : RESP -0,14).
- 2) Un seuil fixé à -0,25 (correspondant à une valeur seuil réelle de flux de -0,50 nanoMole/µl/heure)

choisi a posteriori sur la base d'un objectif d'amélioration des résultats de l'essai. Pour ce faire, toutes les données brutes des essais ont été retransformées en valeur positive ou négative à l'aide d'un logiciel fourni par M. B. VERDIER (identification dans les tableaux de résultats : RESP -0,25).

Les essais

Les essais d'évaluation ont été menés dans le laboratoire de microbiologie de CECALAIT de novembre 2004 à mars 2005.

Ils ont été réalisés avec des échantillons à température ambiante sans réchauffage préalable et ont porté sur les points suivants :

- Evaluation de la spécificité de la méthode
- Evaluation de la linéarité de la méthode
- Evaluation de la répétabilité et la justesse de la méthode

La méthode prise comme référence pour cette étude est la méthode dont la mise en œuvre et les calculs sont décrits dans les documents du CNERNA (Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation) parus respectivement dans les n° 451 (avril 1986) et 469 (décembre 1987) de la Revue Laitière Française :

- Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de *Clostridia* par la méthode de culture en milieu liquide
- Recommandations pour établir les grilles de classements des laits en fonction de leur contamination en spores de *Clostridia*

1- Evaluation de la spécificité de la méthode :

Le principe consiste à observer la réponse par la méthode alternative de souches « BUTYRIQUES » et « NON BUTYRIQUES ». Chaque souche est testée sous forme sporulée par la méthode à évaluer et la méthode de référence.

-15 souches appartenant au groupe des « BUTYRIQUES » et 4 souches n'appartenant pas au groupe des « BUTYRIQUES » ont été testées.

Les échantillons proviennent d'une suspension à environ 50 000 à 100 000 spores/l dans du lait cru supposé exempt de spores.

Les analyses en double ont été faites par la méthode de référence et la méthode par microrespirométrie avec lecture finale à 7 jours d'incubation, en appliquant une lecture intermédiaire à 5 jours pour la méthode de référence.

Une vérification du taux réel de contamination en spores a été réalisée sur les échantillons à tester après une thermisation 15 minutes à 75°C par la numération sur gélose RCM 48 heures à 37°C en anaérobiose.

Les résultats de spécificité pour chaque souche sont présentés dans le tableau ci-dessous sous deux formes différentes :

- La valeur Log de la numération obtenue à l'aide de la table de conversion

- Une interprétation qualitative déterminée selon le résultat en spores/l comme suit :

- : < 180 (2,26 en log)

+ : > 180 (2,26 en log) et < 2400 (3,38 en log)

++ : > 2400 (3,38 en log) et < 10000 (4,00 en log)

+++ : > 10000 (4,00 en log)

Tableau 1 : Résultats des essais de spécificité

SOUCHES « BUTYRIQUES »

| Genre espèce | N° | Référence de la souche | Log (taux/l) | Log REF | Log RESP -0,14 | Log RESP -0,25 | REF | RESP. -0,14 | RESP. -0,25 |
|-------------------------|----|------------------------|--------------|---------|----------------|----------------|-----|-------------|-------------|
| <i>C. tyrobutyricum</i> | 1 | AQLC 3225 | 5,00 | 3,874 | 4,084 | 3,024 | ++ | +++ | + |
| | 2 | CNRZ608 | 4,75 | 3,081 | 3,244 | 2,846 | + | + | + |
| | 5 | ADQ30L20 | 4,82 | 2,822 | 2,543 | 2,079 | + | + | - |
| | 9 | CNRZ602 | 4,90 | 2,868 | 1,903 | 1,903 | + | - | - |
| | 10 | CNRZ603 | 4,88 | 3,006 | 3,065 | 2,914 | + | + | + |
| | 11 | CNRZ502 | 4,98 | 3,243 | 3,521 | 3,047 | + | ++ | + |
| | 12 | CNRZ509 | 4,84 | 2,827 | 2,653 | 2,102 | + | + | - |
| | 13 | ADQ39L26 | 4,83 | 3,329 | 1,903 | 1,903 | + | - | - |
| | 14 | ADQ55L35 | 4,93 | 3,914 | 2,847 | 2,477 | ++ | + | + |
| <i>C. beijerenckii</i> | 3 | CIP104308 | 5,69 | 3,387 | 4,380 | 3,889 | ++ | +++ | ++ |
| <i>C. sporogenes</i> | 4 | AQ94 | 4,81 | 3,447 | 3,496 | 3,345 | ++ | ++ | + |
| | 6 | CL18 | 4,90 | 3,361 | 2,653 | 2,653 | + | + | + |
| | 7 | 35CL13 | 4,81 | 3,305 | 3,114 | 3,006 | + | + | + |
| | 15 | 2J021 | 4,60 | 3,247 | 3,211 | 3,110 | + | + | + |
| | 16 | 1G021 | 4,99 | 3,228 | 3,638 | 3,638 | + | ++ | ++ |

SOUCHES « NON BUTYRIQUES » ET LAIT CRU

| Genre espèce | N° | Référence de la souche | Log (taux/l) | Log REF | Log RESP -0,14 | Log RESP -0,25 | REF | RESP. -0,14 | RESP. -0,25 |
|--------------------------|-------|------------------------|--------------|---------|----------------|----------------|-----|-------------|-------------|
| <i>C. bifementans</i> | 17 | 74483 | 4,90 | 2,976 | 2,923 | 2,923 | + | + | + |
| <i>C. perfringens</i> | 8 | TQ049 | 4,61 | 3,136 | 1,903 | 1,903 | + | - | - |
| <i>Bacillus cereus</i> | 18 | BC5 | 4,74 | 1,903 | 1,903 | 1,903 | - | - | - |
| <i>Bacillus polymyxa</i> | 19 | PRF | 4,94 | 2,884 | 3,964 | 3,964 | + | ++ | ++ |
| Lait cru (8/11) | 20(1) | Lait cru (1) | < 3,00 | 1,903 | 2,457 | 1,903 | - | + | - |
| Lait cru (25/11) | 20(2) | Lait cru (2) | < 3,00 | 1,903 | 2,884 | 2,102 | - | + | - |

Log (taux / l) : Log de la valeur réelle de la contamination (vérification sur milieux solides)

Log REF : Log de la valeur obtenue par la méthode de référence

Log RESP -0,14 et -0,25 : Log de la valeur obtenue par la méthode à tester selon les deux seuils étudiés

REF, RESP -0,14 et -0,25 : interprétation qualitative

Au seuil RESP $-0,14$, les résultats de la méthode RIDABUTY sur les souches « BUTYRIQUES » sont assez concordants avec ceux de la méthode de référence. Par contre, les résultats obtenus au seuil RESP $-0,25$ sont généralement plus faibles qu'avec la méthode de référence. 2 souches de *C. tyrobutyricum* (au seuil $-0,14$) et 4 souches (au seuil $-0,25$) sont négatives en respirométrie et positives en référence.

Pour les 2 niveaux de seuil, la méthode RIDABUTY donne des résultats négatifs sur 2 souches « NON BUTYRIQUES », et positifs sur 2 autres souches (*C. bifementans* et *Bacillus polymyxa*), qui sont également positives avec la méthode de référence. La souche de *Clostridium perfringens*, négative en microrespirométrie donne une réponse positive en méthode de référence. On observe une assez bonne concordance entre les deux méthodes sur ces souches « NON BUTYRIQUES ».

En ce qui concerne le lait cru, les deux méthodes (référence et respirométrie) donnent des résultats négatifs au seuil $-0,25$ alors qu'au seuil $-0,14$, le lait cru répond positivement par la méthode respirométrie.

2- Linéarité :

Le principe est d'établir la relation, sur des échantillons de lait préparés à partir de suspensions de spores, entre

chacune des méthodes et le taux de spores réel de l'échantillon (déterminé après thermisation 15 minutes à 75°C par la numération sur gélose RCM 48 heures à 37°C en anaérobiose).

3 souches de *Clostridium* (sous forme sporulée) et 1 concentré d'ensilage (HS), préparé par CECALAIT à partir d'un ensilage d'herbe et conservé sous forme congelée, positifs par la méthode de référence, ont été utilisés.

Une suspension mère à environ 300 000 spores/l a été préparée dans du lait cru supposé exempt de spores. La suspension mère a ensuite été diluée dans le lait cru (dilutions Volume/Volume), de manière à couvrir une gamme approximative de 1000 à 300 000 spores/l. Les analyses en double des dilutions 0 à -2 ou -3 ont été faites par la méthode de référence et la méthode par microrespirométrie avec lecture finale à 7 jours d'incubation, en appliquant 1 lecture intermédiaire pour la méthode de référence (5 jours).

Une évaluation du taux réel de contamination en spores par numération sur une gélose RCM 48 heures à 37°C en anaérobiose, après thermisation 15 minutes à 75°C a été réalisée sur l'échantillon présentant le taux le plus élevé. Les échantillons constitués à partir des 3 souches pures testées ont montré une croissance très faible par la méthode par microrespirométrie et ce quel que soit le taux de contamination (alors que la méthode de référence

présentait une bonne corrélation avec les taux réels des échantillons).

Seule l'analyse des échantillons réalisés à partir du concentré d'ensilage a permis d'obtenir des résultats par la méthode de microrespirométrie présentant une très bonne concordance avec le taux réel des échantillons et la méthode de référence.

On peut observer que les résultats obtenus par la méthode microrespirométrie (au seuil de $-0,14$ et de $-0,25$) présentent une bonne relation de proportionnalité avec le taux de spores.

On peut néanmoins remarquer au seuil de $-0,25$, un très bon alignement des points relatifs à la méthode par microrespirométrie.

3- Evaluation de la répétabilité et de la justesse :

Les laits prélevés chez les éleveurs ont suivi le circuit d'acheminement normal des échantillons pour le paiement du lait et ont été envoyés à CECALAIT par transporteur express (arrivée le lendemain matin avant 12h). Les échantillons ont été analysés à CECALAIT par les deux méthodes simultanément. Ils étaient issus de 4 régions distinctes en matière de grille de paiement.

➤ Répétabilité :

La répétabilité de la méthode testée et de la méthode de référence a été évaluée par l'analyse en double d'environ 100 laits de producteurs.

➤ Justesse :

La comparaison de la méthode testée avec la méthode de référence a été réalisée sur environ 280 laits de producteurs.

La justesse a été estimée au moyen de l'écart type résiduel de régression (régression des moindres carrés), en prenant la méthode de référence (log spores/l) en variable expliquée Y et le RIDABUTY en variable explicative X (log spores/l).

Tableau 2 : Résultats de répétabilité en log spores/l

| | REFERENCE | RESPIROMETRIE n = 101* | |
|------------------|------------------|-------------------------------|----------------------|
| | n = 102 | Seuil à -0,14 | Seuil à -0,25 |
| Sr en log | 0,23 | 0,33 | 0,30 |

Les résultats de répétabilité obtenus par la méthode par microrespirométrie sont très proches pour les deux seuils testés mais sont cependant supérieurs à ceux obtenus par la méthode référence. Dans les deux configurations, la valeur d'écart type de répétabilité observée est inférieure à la limite de 0,4 log définie dans le manuel CNIEL PROC CL-05-01/00.

**Une valeur a été éliminée du calcul en respirométrie, l'écart entre double étant de 1,9 log au seuil de -0,14. Cette valeur n'a pas été prise en compte pour l'interprétation en justesse.*

Tableau 3 : Résultats de justesse en log spores/l

| | n = 281 | |
|---|-------------------|-------------------|
| | RESP -0,14 | RESP -0,25 |
| Seuil de positivité | | |
| Ecart moyen : RESP - REF | 0,16 | -0,20 |
| Sd : Ecart-type des écarts | 0,57 | 0,51 |
| Sy,x : Ecart type résiduel de régression | 0,54 | 0,48 |

Figure 1 : Représentation de la relation entre la méthode RIDABUTY et la méthode de référence au seuil de -0,14

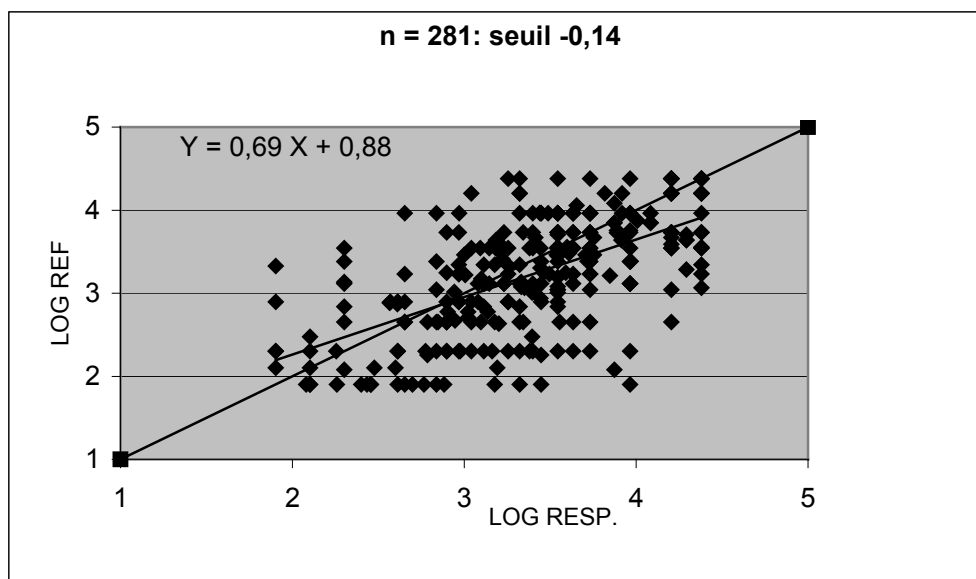
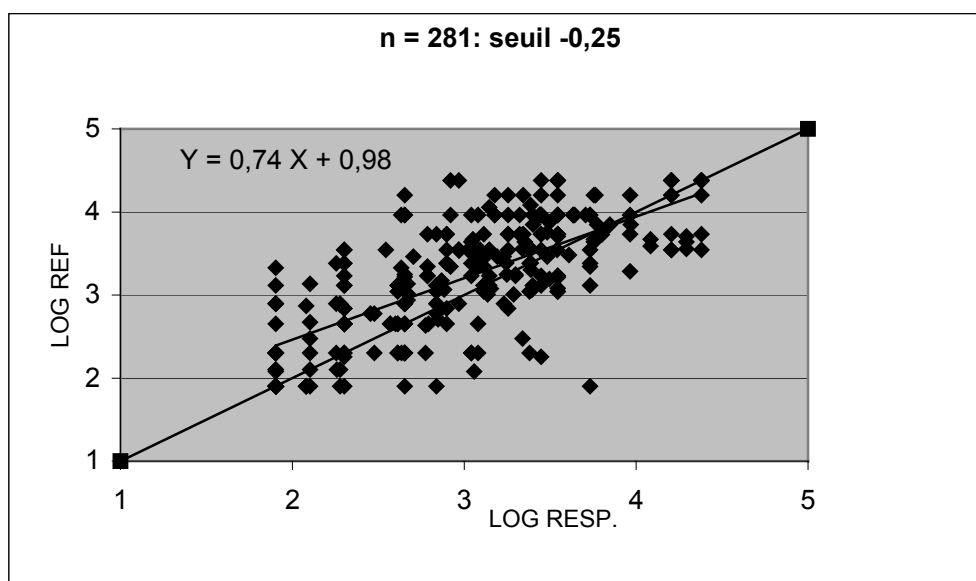


Figure 2 : Représentation de la relation entre la méthode RIDABUTY et la méthode de référence au seuil de -0,25



Sur la base des échantillons analysés, la configuration de l'instrument avec un seuil fixé à -0,25 permet d'abaisser la valeur de l'écart type résiduel de régression (et la précision d'estimation par voie de conséquence) de 0,54 log à 0,48 log. Ce changement conduit également à une inversion de l'écart moyen entre les deux méthodes qui passe de +0,16 à -0,20 log.

CONCLUSION GENERALE

En premier lieu, on peut souligner le caractère très important de la valeur du seuil de « positivité » choisie sur la performance de la méthode.

Dans les essais réalisés, nous pouvons observer que le seuil RESP -0,25 permet d'obtenir de meilleures performances de linéarité, répétabilité et justesse qu'avec le seuil initialement programmé RESP -0,14.

Par contre, dans cette configuration, 4 souches pures de *C. Tyrobutyricum* ne sont pas détectées dans l'étude de spécificité, contre 2 pour le seuil RESP -0,14.

Au niveau de la justesse de la méthode (par rapport à la méthode de référence), les performances observées lors de cette étude sont du même ordre de grandeur que les valeurs obtenues lors d'un essai CNIEL conduit en 1995. Cet essai de reproductibilité intra laboratoire, a été mené dans 6 laboratoires interprofessionnels, sur un total de 768 échantillons

analysés en double. Un écart type résiduel de régression (intra méthode CNERNA) de 0,51 log avait été obtenu, contre, respectivement 0,54 log et 0,48 log pour la configuration RESP -0,14 et -0,25 (régression de la méthode évaluée par rapport à la méthode CNERNA) lors de cette évaluation.

BIBLIOGRAPHIE

ROLLIER P., TROSSAT Ph. **Rapport d'évaluation du Ridabuty (R-Biopharm) pour l'estimation de la contamination du lait en spores de *Clostridia***, CECALAIT, 04/04/2005

CNERNA (Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation) :

- **Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de *Clostridia* par la méthode de culture en milieu liquide**, Revue Laitière Française, avril 1986, n° 451
- **Recommandations pour établir les grilles de classements des laits en fonction de leur contamination en spores de *Clostridia***, Revue Laitière Française, décembre 1987, n° 469

CNIEL. **Procédures de suivi de l'analyse visant à dénombrer les spores butyriques dans le lait**, CNIEL PROC CL-05-01/00