

Ce Lait

Association loi 1901

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

janvier 1996

N°17

**BONNE ANNEE
1996**

LA LETTRE DE CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 84.73.63.20 TELECOPIE : 84.37.37.81
e-mail : bapt@poligny.inra.fr ou trossat@poligny.inra.fr

Rédaction achevée le 9 février 1996

Equipe rédactionnelle :

A. BAPTISTE; R. GRAPPIN, O. LERAY; P. ROLLIER; Ph. TROSSAT

SOMMAIRE

Mise au point sur la détermination du point de congélation du lait par la méthode cryoscopique p. 1-2

Normes et projets de normes parus récemment

Nouveautés dans la réglementation

Le comptage des cellules somatiques dans la littérature récente p. 6-8

Rendez-vous

Estimation de la fidélité des méthodes de référence pour la numération des germes et des coliformes à 30°C dans le lait cru p. 6-8

Du côté de la biblio...

MISE AU POINT SUR LA DETERMINATION DU POINT DE CONGELATION DU LAIT PAR LA METHODE CRYOSCOPIQUE

La mesure du point de congélation du lait par cryoscopie se fait actuellement selon deux méthodes : la méthode de référence par recherche du plateau sur la courbe de congélation et une mesure de température à un temps fixe après la cristallisation. Cette dernière peut fournir des résultats sensiblement différents de la méthode de référence. Elle ne peut donc avoir qu'un statut de méthode de routine, quoique d'usage majoritaire dans les laboratoires laitiers pour des raisons économiques. Cette utilisation dominante induit cependant l'apparition d'une valeur de référence consensuelle, décalée par rapport à celle que donne la méthode de référence. Cette situation, sans conséquence pour des transactions à l'intérieur d'un même cadre régional est source de litiges dès lors qu'on en sort.

C'est pourquoi CECALAIT a développé pour l'étalonnage des cryoscopes, outre des solutions titrées de chlorure de sodium, un échantillon de lait de référence, dont la valeur de point de congélation a été déterminée par la méthode de référence. L'utilisation conjointe de ces échantillons doit permettre de définir les corrections à appliquer aux résultats de routine pour qu'ils deviennent équivalents à ceux obtenus par la méthode de référence.

DEFINITION DU POINT DE CONGELATION

La température du point de congélation du lait est définie par le principe de la mesure cryoscopique, décrit dans les normes équivalentes : FIL 108B:1991, ISO 5764, AFNOR V 04-205 de 1990.

Elle correspond à la température du plateau (plus haut palier) atteint par le lait lors de la remontée de température consécutive à la cristallisation initiée mécaniquement après refroidissement à une température appropriée. Ce plateau est actuellement défini comme la période de stabilité de la température pendant 20 s au minimum, dans une fourchette de $\pm 0,001$ °C.

La norme FIL 108B:1991 décrit la méthode de référence actuellement en vigueur et prend soin de mentionner l'existence et l'utilisation, d'instruments mesurant la température, à un temps fixe après l'induction de la cristallisation, comme méthode possible en routine pour le tri des laits. Cette méthode dérivée est, à l'heure actuelle largement majoritaire dans les laboratoires laitiers.

Toutefois, seule la méthode de référence à recherche de plateau est définie précisément, les appareils de mesure à temps fixe ne faisant l'objet de recommandation particulière, ni sur le délai de mesure, ni sur la précision attendue. Il est cependant clairement indiqué que les courbes de congélation peuvent varier d'un lait à l'autre (cause d'erreur aléatoire d'une méthode à temps fixe) de même qu'entre le lait et les solutions étalons (cause d'erreur systématique d'une méthode à temps fixe).

Ainsi, le rapport du groupe FIL E601 (E doc 596, 1994), établi par R. VAN BUUREN et repris dans La Lettre de CECALAIT, N° 13 de janvier 1995 précise les différences entre les résultats obtenus après une mesure à temps fixe et une recherche de plateau. L'exemple proposé se réfère à des résultats obtenus après un temps fixe de 90s. Or les appareils de routine, pour des raisons évidentes de cadences, ne sont, pour la plupart, utilisés qu'à des temps de 30s, soit trois fois moins!

C'est pourquoi le groupe FIL E601 s'est attaqué depuis fin 1994, à la redéfinition des méthodes de référence et de routine. Ce travail

a été présenté par M. LALOUX du CNEVA-LCHA lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT et repris dans La Lettre de CECALAIT, N° 15 de juillet 1995.

STATUT DES METHODES

A l'heure actuelle, le statut des cryoscopes à temps fixe ne peut être que celui de méthode rapide à l'instar des analyseurs infra-rouge pour l'analyse de la composition des laits. Comme tels, ces appareils doivent fournir en principe des résultats équivalents à la méthode de référence en usage. Dans l'état actuel des choses, les instruments à temps fixe ne délivrent pas le véritable point de congélation du lait, qui est la « *température la plus haute atteinte sur le plateau* » (In norme AFNOR V 04-205, 1990, 8.3, p.8)

Pourtant, l'usage quasi-généralisé des instruments à temps fixe impose de fait une sorte de référence consensuelle, décalée par rapport à la méthode de référence à recherche de plateau. Cette différence se manifeste notamment au cours des essais d'intercomparaison de laboratoires dans lesquels les laboratoires utilisateurs de la méthode de référence se trouvent généralement peu nombreux. Cette situation ne va pas sans créer quelques problèmes, notamment, par exemple, pour les laboratoires officiels, utilisateurs des méthodes de référence ou des méthodes parues au Journal Officiel, qui face à des présomptions de mouillage, se trouvent en porte-à-faux par rapport aux résultats d'essais d'intercomparaison de laboratoires.

Maintenant largement utilisée dans le cadre du paiement du lait, la méthode cryoscopique nécessite une définition précise des rôles respectifs que doivent jouer les méthodes à temps fixe et la méthode à recherche de plateau, et de la façon dont elles doivent être reliées entre elles.

L'usage généralisé en routine des appareils à temps fixe n'a, jusqu'à présent, pas posé de problème en raison de l'emploi de références régionales variables, pour la température critique du point de congélation. Ces moyennes régionales ou départementales sont des normes relatives, déterminées par la même méthode. Il n'en est pas de même dans le cadre de

transactions commerciales entre régions ou entre pays qui sortent dès lors d'un code local harmonisé et consensuel.

ETALONNAGE DES CRYOSCOPIES

Dans ce contexte, CECALAIT a commencé à proposer dès 1994 des solutions titrées de chlorure de sodium destinées à l'étalonnage des cryoscopes. Elles sont préparées selon la norme FIL 108B et validées périodiquement par essais interlaboratoires, de manière à harmoniser les étalonnages sur l'ensemble de la France et plus particulièrement au niveau des laboratoires interprofessionnels.

Malgré cela, on a continué à observer, dans certains laboratoires, des discordances entre les réponses sur solutions et les réponses sur lait, à l'occasion des chaînes d'analyses. Il est possible, sinon probable, que dans certains cas, la cause en ait été le principe de mesure décrit plus haut.

Aussi, à partir de 1996, CECALAIT a-t-il décidé d'ajouter aux solutions étalons un échantillon de lait de mélange, doté d'une valeur de point de congélation déterminée selon la méthode de référence (recherche de plateau, FIL 108B). Le principe d'un étalonnage réussi voudrait que les résultats sur solutions et sur lait se trouvent alignés sur une même droite d'étalonnage ou que l'appareil réglé sur solutions ne présente pas d'écart significatif, sur le lait de contrôle, par rapport à la valeur proposée. Lorsque ce n'est pas le cas, le laboratoire est en mesure d'évaluer son erreur de justesse par rapport à la norme et d'en tenir compte si nécessaire dans le cadre particulier où il utilise la méthode cryoscopique.

Cet échantillon de contrôle est donc intéressant à plus d'un titre :

- ◆ son premier intérêt est d'ordre informatif,
- ◆ son second intérêt réside dans la possibilité, dans le cadre d'un contexte harmonisé (procédure générale adoptée par un groupe identifié de laboratoires et pour un usage donné) :

➤ soit d'ajuster l'étalonnage de l'appareil,

➤ soit d'établir la correction à appliquer aux résultats de routine pour estimer les températures de manière équivalente à la méthode de référence.

Ce type d'utilisation conduirait ainsi à annuler l'erreur systématique de la méthode non normalisée (routine). Il n'éliminerait toutefois pas l'erreur aléatoire liée à la variabilité des courbes de congélation (cf E Doc 596, 1994, évoqué ci-dessus) et que l'on peut mesurer par l'écart type des écarts (routine-référence).

L'adoption de l'étalonnage sur le lait de contrôle doit pourtant s'inscrire dans un mouvement concerté de l'ensemble des laboratoires afin que la référence consensuelle du groupe des méthodes à temps fixe s'ajuste sur un nouveau point d'ancrage, sans perturbation excessive du paysage technico-économique interprofessionnel et commercial. En effet, l'ajustement sur la méthode de référence normalisée aurait tendance à élever les températures de point de congélation. Ceci conduirait, tout au moins au début, à accroître artificiellement la proportion des suspicions de mouillage. L'usage de références flottantes, souvent départementales ou régionales et révisées périodiquement effacera toutefois très rapidement les écarts artificiels d'un jour. Cette démarche logique, initiée par la révision en cours de la norme 108 B, devrait progressivement s'imposer et s'accompagnera au niveau français, interprofessionnel notamment, d'une définition des statuts et du cadre d'utilisation respectifs des différents types de mesure cryoscopique.

La révision de la norme 108B devrait, selon toute probabilité, conduire à terme à une remise en cause et une redéfinition du seuil réglementaire de la Communauté Européenne : - 0,52 °C, à partir de résultats d'expérimentations réalisées selon la nouvelle norme attendue pour la fin 1996.

NORMES ET PROJETS DE NORMES PARUS RECEMMENT

(reçus entre Octobre 1995 et Janvier 1996)

NORMES AFNOR

XP V 08-058 Novembre 1995 (ICS 07.100.30)

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Dénombrement de *Bacillus cereus* par comptage des colonies à 30°C : méthode de routine

XP V 08-059 Novembre 1995 (ICS 07.100.30)

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies à 25°C : méthode de routine

Il s'agit de deux normes expérimentales qui remplacent les projets de normes de même numéro.

V 04-214 (NF EN ISO 1211) Octobre 1995 (ICS 67.100.10)
LAIT Détermination de la teneur en matière grasse : méthode gravimétrique (*méthode de référence*).

Ce texte remplace le projet de norme correspondant.

Il ne diffère de la version de décembre 1985 que par des modifications de type rédactionnel. Les changements de solvants d'extraction que nous avons évoqués dans notre précédent numéro de La Lettre de CECALAIT ne sont donc pas encore pris en compte dans la pratique.

V 04-392 (NF EN ISO 3727) Décembre 1995 (ICS 67.100.20)
BEURRE Détermination des teneurs en eau, en matière sèche non grasse et en matière grasse sur la même prise d'essai. (*méthode de référence*).

PROJETS DE NORMES AFNOR

Projet V 04-294 : LACTOSERUM LIQUIDE : détermination de la matière sèche

Projet V 04-295 : LACTOSERUM CONCENTRE : détermination de la matière sèche

Projet V 08-019 (NF EN-ISO 7937)

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* : technique par comptage des colonies

NORMES FIL

107A:1995 CASEINES ET CASEINATES. Détermination des teneurs en particules brûlées et en corps étrangers

134A:1995. LAIT EN POUDRE ET PRODUITS LAITIERS EN POUDRE. Détermination de la masse volumique apparente

171:1995. LAIT ET POUDRE DE LAIT. Dosage de la teneur en aflatoxine M1 (*purification par chromatographie d'immunoaffinité et dosage par HPLC*)

172:1995. LAIT ET PRODUITS LAITIERS. Méthode d'extraction des lipides et des composés liposolubles.

173:1995. POUDRES DE PROTEINES LAITIERS. Détermination de l'indice de solubilité de l'azote

174:1995. POUDRE DE LAIT ENTIER INSTANTANE. Détermination du nombre de taches blanches

175:1995. LAIT. Détermination de la teneur en lactulose (*méthode enzymatique*)

NOUVEAUTES DANS LA REGLEMENTATION

FRANCE

Avis du 23/01/1996, relatif aux méthodes et normes utilisables pour la détermination des critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché.

Cet avis abroge le texte de même titre paru le 17 Mai 1994. Il reprend et met à jour la liste des références des normes FIL ou AFNOR concernant les méthodes de référence ou de routine à utiliser en analyse microbiologique. Il précise en outre que les méthodes alternatives, validées par l'AFNOR peuvent également être utilisées.

Concernant *Listeria*, ce texte détaille les conditions d'utilisation des milieux d'isolement sélectifs Oxford et Palcam, décrits dans la norme V 08-055 de 1993. Il préconise ainsi d'employer le milieu Palcam pour les produits à forte flore contaminante (fromages au lait cru), le milieu Oxford pour les produits à faible flore contaminante (fromages au lait traité thermiquement). Dans le cas où la nature du fromage à analyser est inconnue, les deux milieux doivent être utilisés simultanément.

Arrêté du 22/11/1995 (JO du 21/12/1995), relatif au retrait de la consommation humaine des denrées alimentaires d'origine animale contaminées par des résidus de pesticides. Il complète l'arrêté du 5/12/1994 par une liste supplémentaire de pesticides avec leurs teneurs maximales de résidus autorisées.

Avis du 12/10/1995, relatif à la production de laits de consommation et de produits à base de lait, en vue de leur mise sur le marché communautaire. Il s'agit de la mise à jour de la liste des établissements titulaires de la marque de salubrité, prévue par les arrêtés concernant l'agrément des transformateurs de lait et produits laitiers, ainsi que des centres de collecte, de standardisation ou de traitement du lait.

Arrêté du 25/9/1995 (JO du 21/10/1995), relatif aux conditions sanitaires régissant les échanges intracommunautaires de certains produits d'origine animale.

Ce texte comprend un chapitre qui spécifie les conditions de transport, d'hygiène et d'étiquetage pour le lait, les produits à base de lait et le colostrum, non destinés à l'alimentation humaine.

Arrêté du 25/9/1995 (JO du 5/10/1995), modifiant l'arrêté du 18/3/1994 relatif à l'hygiène du lait.

Il s'agit d'un paragraphe supplémentaire précisant que le lait ne peut être collecté dans une zone de fièvre aphteuse, sauf s'il est pasteurisé sous contrôle des services vétérinaires.

EUROPE COMMUNAUTAIRE

Règlements n° 2796/95, n° 2804/95, de la Commission, respectivement des 4 et 5/12/1995, modifiant l'annexe 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 L 290 du 5/12/1995, L 291 du 6/12/1995)

Ces textes complètent la liste des substances non soumises à une limite maximale de résidus. Il s'agit de certains hydrocarbures d'origine minérale, de substances utilisées dans les médicaments vétérinaires homéopathiques, et de toute une liste de « substances généralement reconnues comme inoffensives ».

Règlement CE n° 2721/95 de la Commission, du 24/11/1995 (JO CEE L 283 du 25/11/1995) fixant les règles d'application de méthodes de référence et de routine à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits

laitiers conformément à l'organisation commune des marchés.

Ce texte stipule que la Commission doit établir, avant le 1er Avril de chaque année, une liste des méthodes de référence applicables aux analyses physico-chimiques et microbiologiques du lait et des produits laitiers. .

Il précise, en outre, qu'une analyse effectuée dans le cadre du marché communautaire devra utiliser une méthode figurant sur cette liste.

Ce document concernera, bien sûr, principalement les méthodes FIL, ISO ou AOAC International, mais aussi des méthodes communautaires pas encore reprises par ces organismes. Enfin, il n'exclut pas l'utilisation de méthodes de routine, si elles sont régulièrement contrôlées par rapport à la méthode de référence.

LE COMPTAGE DES CELLULES SOMATIQUES A TRAVERS LA LITTERATURE RECENTE

Le dénombrement des cellules somatiques du lait est devenu un élément important de la qualité du lait, d'où des études sur la question dans de nombreux laboratoires laitiers à travers le monde. Certains de ces travaux, qui étudient principalement les méthodes instrumentales automatisées ont été publiés récemment.

Une équipe australienne (Clarke et al.) a ainsi centré son travail sur l'effet de modifications de la préparation des échantillons ou des réactifs sur les résultats obtenus avec deux types d'appareils, fondés sur le même principe, mais de génération différente. Une équipe allemande (Heeschen et al.) a, elle, comparé les résultats donnés par des appareils fondés sur des supports de comptage différents. L'étude de la calibration et le développement d'échantillons de référence ont fait l'objet des travaux d'une équipe néerlandaise (Vermunt et al.). Enfin, une étude plus isolée s'intéresse uniquement au perfectionnement de la méthode de référence.

La littérature récente reflète le souci de la maîtrise des conditions expérimentales pour le dénombrement des cellules somatiques.

Des articles parus au cours de l'année 1995 étudient ainsi l'impact de la préparation des échantillons, des réactifs, des appareils utilisés, sur les comptages cellulaires instrumentaux. La calibration à l'aide d'échantillons à teneur garantie est également abordée. Enfin, on suggère de faire évoluer la méthode de référence.

Quelques articles récents

Clarke et al. (1995) s'intéressent principalement à l'influence des facteurs « mordants », sur la justesse du comptage des cellules. Rappelons qu'en bactériologie, un « mordant » est un agent intervenant dans une coloration, comme un intermédiaire qui facilite ou hâte la fixation du colorant sur l'objet à colorer.

Les facteurs susceptibles d'avoir un effet mordant sont notamment l'âge des échantillons, leur traitement par un conservateur ou par la chaleur, la préparation de certains réactifs. Leur étude est menée principalement sur deux types d'appareils différents, un appareil assez ancien à seuil fixe (Fossomatic 215) et un appareil plus moderne à seuil variable (Fossomatic 360).

Heeschen et al. (1994) évaluent les résultats obtenus par un appareil de comptage par cytométrie de flux (Somacount) dans différentes conditions de conservation des échantillons. Puis ils comparent les résultats de mesure obtenus selon ce principe avec ceux provenant d'un Fossomatic 360, autre type de compteur

automatique, utilisant le même procédé de coloration des cellules, mais un support de comptage différent.

Vermunt et al. (1995) ont surtout le souci de développer des échantillons de référence à teneur garantie pour le calibrage des appareils (Fossomatic 360, dans leur cas).

Faltusz (1994), enfin, ne s'intéresse qu'à l'amélioration de la méthode de référence.

LES FACTEURS AFFECTANT LE COMPTAGE INSTRUMENTAL

↳ AGE DES ECHANTILLONS

Les échantillons trop jeunes sont réputés aboutir à une sous-estimation des comptages cellulaires (Grappin et Jeunet, 1974). La norme FIL 148A:1995 recommande d'ailleurs de laisser reposer les échantillons sans conservateur au moins 24h au frais avant de les analyser selon une méthode fluoro-opto-électronique. Heeschen et al. notent cependant un manque de stabilité des comptages cellulaires entre 24 et 48 h de stockage réfrigéré pour des échantillons de lait cru exempts de conservateur.

Clarke et al. confirment que les cellules trop jeunes prennent mal le colorant et conseilleraient même un stockage plus long des échantillons, aussi bien dans le cadre d'une méthode instrumentale que dans la méthode de référence.

↳ EFFET DES CONSERVATEURS

On a reconnu depuis longtemps (Grappin et Jeunet) l'effet mordant du dichromate de potassium, ce qui augmente les résultats des comptages cellulaires. Clarke et al. attribuent cet effet à une intensité de coloration plus forte des cellules et constatent des effets très proches pour le dichromate de potassium et le bronopol. Heesch et al. observent de même des comptages cellulaires plus élevés en présence de conservateur. Ils obtiennent des résultats comparables entre le dichromate de potassium, le bronopol et l'acide borique; plus faibles en revanche pour l'azide de sodium.

Le bronopol et le dichromate de potassium garantissent, de manière égale, une stabilité du comptage cellulaire pendant au moins 48h, quel que soit le niveau de concentration en cellules. Cela semble plus délicat aux niveaux cellulaires élevés avec l'azide de sodium et l'acide borique (Heesch et al.).

↳ EFFET D'UN TRAITEMENT THERMIQUE

Une stabilité du comptage sur une durée beaucoup plus longue (10-12 semaines), recherchée pour le développement d'échantillons à teneur garantie ne peut toutefois être obtenue que par un traitement thermique, suivi de l'addition d'un conservateur (Vermunt et al.). Clarke et al. observent en outre un effet mordant dû au traitement thermique, principalement lors des comptages avec les appareils anciens ayant tendance à sous-estimer les comptages. Cet effet se surajouterait aux effets dus au vieillissement des échantillons et aux conservateurs. Clarke et al. l'attribuent à une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire aux colorants, sous l'effet de la chaleur.

↳ AMELIORATION DES REACTIFS

Persuadés de l'importance à accorder à tout ce qui est susceptible de modifier la perméabilité membranaire, Clarke et al. ont étudié les conséquences des modifications expérimentales portant sur tous les réactifs qui contiennent du Triton, un agent perméabilisant. Ils en concluent que, particulièrement pour les appareils anciens, il serait souhaitable de diminuer la durée de stockage des solutions diluées de Triton et d'augmenter la concentration en Triton des réactifs, afin de garantir leur pouvoir perméabilisant.

↳ INFLUENCE DE L'APPAREIL

Heesch et al. ont comparé des appareils basés sur le même principe de mesure, mais dont le support de comptage diffère, à savoir le Somacount (Bentley USA) et le Fossomatic 360 (Foss Electric Danemark).

Le Somacount utilise la cytométrie de flux, une méthode fluoro-opto-électronique basée sur la numération automatique des cellules en suspension dans un flux liquide en écoulement laminaire devant un objectif microscopique. Le Fossomatic 360, dont le principe de coloration est similaire effectuée sa lecture sur un film de suspension cellulaire, déposé sur la tranche d'un disque en rotation devant un objectif microscopique. Ils en concluent à des résultats comparables.

Par contre, il faut être plus prudent avec des appareils de génération différente. Clarke et al. soulignent ainsi que les

résultats obtenus avec les Fossomatic 215, appareils à seuil fixe, sont bien plus sensibles à l'impact des effets mordants qu'avec les appareils à détermination automatique de seuil, comme les Fossomatic 360. Quand l'effet mordant est défavorable, la fluorescence des cellules est certes réduite avec tous les appareils. Mais les comptages cellulaires obtenus risqueront de ne diminuer de façon considérable que pour les appareils anciens, incapables de distinguer la fluorescence des cellules de celle du fond.

Clarke et al. conseillent donc de veiller tout particulièrement à l'optimisation des effets mordants avec les appareils anciens. Pour pouvoir diagnostiquer les cas où les différents facteurs évoqués ci-dessus exercent des effets défavorables sur l'efficacité du comptage cellulaire, ils proposent de modifier les procédures de calibrage des appareils. Ils suggèrent ainsi d'utiliser ensemble deux séries d'échantillons de calibrage identiques, l'une non chauffée, et l'autre chauffée. Les résultats obtenus ne devraient pas différer.

Améliorer la norme !

Clarke et al. proposent que des précisions concernant l'ensemble des facteurs évoqués ci-dessus soient apportées en complément dans le texte de la norme FIL actuelle.

Il leur semblerait même que la méthode de référence doive elle aussi être revue. La littérature a déjà souligné sa sensibilité à certains effets mordants (Schmidt Madsen, 1979, in Clarke et al.), ainsi que ses incertitudes (Heesch et al.; Faltusz). Des modifications significatives ont d'ailleurs déjà été proposées (Faltusz).

Ces études ont le mérite de soulever de nombreuses questions. Elles peuvent inciter à une réflexion dans la définition des méthodes d'étalonnage, de contrôle d'appareils et d'analyse proprement dites.

Bibliographie

- CLARKE T.; EVANS M.E.; HEPWORTH G.; MOATE P.; STEWART J.A.** Mordant factors that affect the fluorescence and counting of somatic cells by instruments. *J. Dairy Research*, 1995, V. 62, p. 373-394
- FALTUSZ E.** Bestimmung der Anzahl somatischer Zellen in Rohmilch mit der REF-methode. [*Dénombrement des cellules somatiques du lait par la méthode REF*]. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1994, V. 199, N. 3, p. 219-221 [résumé en anglais]
- GRAPPIN R.; JEUNET R.** Premiers essais de l'appareil Fossomatic pour la détermination automatique du nombre de cellules du lait. *Lait*, 1974, V. 54, N. 539-540, p. 627-644
- HEESCHEN W.H.; UBBEN E.H.; RATHJEN G.** Zählung somatischer Zellen in Milch : Untersuchungen zur Messung in der Durchflußzytometrie (Somacount) und Vergleich mit den Meßergebnissen nach fluoreszenzoptischem Prinzip (Fossomatic 360). [*Dénombrement des cellules somatiques dans le lait : essais de mesure en cytométrie de flux (Somacount) et comparaison avec les résultats obtenus par une méthode fluoroptique (Fossomatic 360)*]. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 1994, V. 46, N. 4, p. 291-316 [résumé en français]
- VERMUNT A.E.M.; LOEFFEN G.J.M.; VAN DER VOET H.; NABER M.A.A.M.** Development of reference samples for the calibration and quality control of somatic cell count using a Fossomatic instrument. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 1995, V. 49, p. 111-123

RENDEZ-VOUS

⇒ RAPPEL

26 FEVRIER - 1ER MARS 1996 A BESANÇON (FRANCE) : SEMAINE FROMAGERE DE LA FIL SYMPOSIUM SUR L'AFFINAGE DU FROMAGE

Contact :

INRA -SRTAL
G. DASEN
BP 89

TEL :(+33) 84.73.63.00
FAX (+33) 84.37.37.81

39801 POLIGNY CEDEX (FRANCE)

10-15 MARS 1996 A WOLFPASSING (AUTRICHE) : SEMAINE « HYGIENE » DE LA FIL,

comprenant un symposium sur la qualité bactériologique du lait cru.

2-4 MAI 1996 A POTSDAM (ALLEMAGNE) : SEMAINE « NUTRITION » DE LA FIL

comprenant un atelier sur les microorganismes probiotiques

8 - 11 MAI 1996 A UPPSALA (SUEDE) : SEMAINE MICROBIOLOGIQUE DE LA FIL

20 - 24 MAI 1996 A SONTHOFEN (ALLEMAGNE) : SEMAINE CHIMIQUE DE LA FIL

comprenant la deuxième Semaine sur l'Assurance Qualité Analyses et les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

20 - 24 OCTOBRE 1996 A SANDTON, TRANSVAAL (AFRIQUE DU SUD) : 80E ASSISES ANNUELLES DE LA FIL

Pour tout renseignement sur ces différentes manifestations, prendre contact avec les organismes suivants.

FIL

C. Brooks
41, square Vergote
B 1040 BRUXELLES
BELGIQUE
TEL : +32.2.733.98.88
FAX : +32.2.733.04.13

ou

ALF

34, rue de Saint Petersburg
75382 PARIS CEDEX
FRANCE
TEL : (1).49.70.71.11
FAX : (1).42.80.63.45

JUIN 1996

Assises bisannuelles d'ICAR (International Committee for Animal Recording : Contrôle Laitier International) à VELDHOVEN, PAYS-BAS.

ESTIMATION DE LA FIDELITE DES METHODES DE REFERENCE POUR LA NUMERATION DES GERMES ET DES COLIFORMES A 30°C DANS LE LAIT CRU

Le regroupement des résultats de deux années d'essais interlaboratoires trimestriels organisés par CECALAIT et portant sur les méthodes de référence des numérations des germes totaux et des coliformes à 30°C a permis d'estimer des valeurs de répétabilité et de reproductibilité pour ces deux méthodes. Elles ont été comparées aux indications, relativement peu nombreuses, de la littérature. En ce qui concerne les germes à 30°C, les valeurs obtenues pour Sr et S_r apparaissent assez voisines. Elles diffèrent, en revanche pour les coliformes.

Ces nouveaux résultats pourraient fournir des éléments d'information propres à compléter les textes actuels en ce qui concerne la précision des méthodes.

Les circuits d'intercomparaison de laboratoires portant sur la numération des germes à 30°C et des coliformes à 30°C dans le lait cru sont encore en nombre limité (moins d'une dizaine en Europe), et concernent généralement des laits en poudre. Aussi dispose-t-on de peu d'indications sur la fidélité des méthodes mises en oeuvre, dans les conditions d'analyse réelle du lait liquide, y compris dans les normes. Depuis 1992, CECALAIT organise de manière régulière des essais interlaboratoires dans ce domaine, avec une participation importante de laboratoires qui utilisent les méthodes de référence.

Il est apparu intéressant d'extraire de cette importante masse de résultats les données spécifiques à ces méthodes et d'en déduire leurs caractéristiques de fidélité.

Des données manquantes sur la précision

Les méthodes de référence pour la numération des germes et des coliformes à 30°C sont respectivement les normes FIL 100B:1991 et 73A:1985. Elles consistent à ensemercer en profondeur un

milieu de culture défini, respectivement PCA, avec addition de lait écrémé, et VRBL, coulé dans des boîtes de Petri. Après incubation à 30°C pendant, respectivement 72 et 24h, puis comptage des colonies, le nombre initial de germes ou de coliformes est calculé grâce aux formules de calcul données dans les normes.

Aucun de ces textes ne fournit cependant de données sur la répétabilité et la reproductibilité, faute d'études suffisantes faites sur la question. Or les essais interlaboratoires organisés trimestriellement depuis 1992 par CECALAIT permettent maintenant de grouper un grand nombre de résultats et d'estimer ces caractéristiques.

LES CHAINES INTERLABORATOIRES DE CECALAIT

Huit essais, organisés entre 1993 et 1995, ont été repris ici pour estimer les valeurs de répétabilité et de reproductibilité. Chaque essai comprend une gamme de 10 échantillons de lait cru, additionnés de conservateur, qui empêche tout développement de la flore initiale, mais perd son effet à la dilution. La flore initiale est répartie sur une plage allant de 10 à 100 000 coliformes/ml et de 10 000 à 500 000 germes/ml. Le jour où ils sont préparés, les échantillons sont envoyés par Chronopost en boîtes isothermes à 4°C. Ils arrivent dans les laboratoires participants le lendemain et subissent une ou deux analyses par échantillon, le même jour.

Lorsqu'une analyse est faite en double, les prises d'essai proviennent d'un même flacon. Il ne s'agit donc pas d'analyses en double aveugle, ce qui est réputé conduire à une certaine sous-estimation de la répétabilité, d'où peut découler une surestimation de la variance entre laboratoires.

RESULTATS

Les résultats sont détaillés dans les deux tableaux ci-dessous. Ils ont été déterminés en fonction du niveau de contamination des échantillons, puis tous niveaux confondus.

GERMES A 30°C

TAUX MOYENS	REPETABILITE			REPRODUCTIBILITE		
	Sr en log	r en log	Nb de doubles	SR en log	R en log	Nb de valeurs
1 000 à 50 000 /ml	0,0673	0,190	483	0,206	0,582	759
50 000 à 100 000 / ml	0,0597	0,169	283	0,165	0,468	448
100 000 à 500 000 / ml	0,0664	0,188	494	0,164	0,463	783
Tous niveaux confondus	0,0653	0,185	1260	0,181	0,513	1990

COLIFORMES A 30°C

TAUX MOYENS	REPETABILITE			REPRODUCTIBILITE		
	Sr en log	r en log	Nb de doubles	SR en log	R en log	Nb de valeurs
10 à 1 000 /ml	0,0599	0,169	445	0,162	0,457	677
1 000 à 10 000 / ml	0,0585	0,165	288	0,120	0,340	424
10 000 à 100 000 / ml	0,0732	0,207	307	0,188	0,532	459
Tous niveaux confondus	0,0637	0,180	1040	0,160	0,453	1560

Des résultats assez surprenants pour les coliformes !

Pour les germes et les coliformes à 30°C, les valeurs Sr et S_r les plus satisfaisantes sont obtenues pour des taux de contamination moyens (de 50 000 à 100 000 germes/ml).

A partir des résultats renvoyés par les participants, CECALAIT procède alors à des traitements statistiques pour déterminer la répétabilité, ainsi que la justesse à partir de la moyenne des doubles.

SELECTION DES LABORATOIRES ET DES RESULTATS

Dans les essais interlaboratoires organisés par CECALAIT, la méthode d'analyse utilisée est laissée au libre choix des laboratoires participants. Le cadre particulier de cette étude imposait de ne retenir que ceux qui avaient utilisé les méthodes normalisées. Les laboratoires qui avaient travaillé avec une méthode alternative ou qui avaient utilisé un milieu autre n'ont donc pas été sélectionnés ici, à l'exception, toutefois, des laboratoires ayant utilisé le milieu PCA sans adjonction de lait écrémé.

En outre, pour limiter les causes de variation, seuls ont été retenus les laboratoires ayant procédé aux analyses le lendemain de la préparation, dès réception des échantillons.

Comme dans tout traitement de chaîne d'analyses, il est nécessaire d'identifier et d'exclure des calculs les valeurs jugées aberrantes, au moyen des tests de Cochran, sur les écarts entre doubles, et de Grubbs sur les moyennes des doubles. Ces tests sont généralement pratiqués au seuil de 5% pour des essais où cohabitent différentes méthodes. Le but est alors d'identifier des taux susceptibles de nuire à la bonne estimation des valeurs de référence, non d'aboutir à une juste estimation des dispersions des résultats. En revanche, dans le cadre de l'évaluation d'une méthode, ces tests sont réalisés au seuil de 1%, avec pour but d'éliminer uniquement les résultats vraiment aberrants, non liés à la méthode, et d'en estimer les valeurs de fidélité le plus justement possible.

Pour les germes à 30°C, comme pour les coliformes, ces valeurs sont en légère augmentation aux taux de contamination élevés. Cette observation, plutôt classique en microbiologie est généralement attribuée aux incertitudes des dilutions successives.

Ces valeurs paraissent, de même plus élevées aux taux de contamination faibles. Il s'agit là également d'une constatation

habituelle en microbiologie, liée aux incertitudes de répartition d'un faible nombre de colonies.

La comparaison des résultats obtenus pour les coliformes et pour les germes à 30°C est, en revanche, plus surprenante. En effet, sauf aux taux de contamination élevés, les valeurs S_r et S_r semblent légèrement plus faibles pour les coliformes que pour les germes à 30°C. En règle générale, c'est le contraire qui est observé dans la littérature.

En conséquence, pour les coliformes les valeurs S_r et S_r observées ici : $S_r = 0,0637$ et $S_r = 0,160$, tous niveaux confondus, sont beaucoup plus faibles que les valeurs trouvées dans les diverses sources bibliographiques et travaux antérieurs sur le sujet :

$S_r = 0,20$ et $S_r = 0,35$

En revanche, les résultats obtenus pour la numération des germes à 30°C correspondent assez bien aux études antérieures notamment pour la répétabilité, avec la valeur « synthèse de la littérature » :

$S_r = 0,08$.

La reproductibilité observée dans nos résultats est, en revanche, plus forte ($S_r = 0,181$, tous niveaux confondus) si l'on considère la valeur « synthèse » extraite de la littérature : $S_r = 0,12$.

Rappelons que pour les chaînes d'analyse de CECALAIT, les valeurs limites de répétabilité, puis de justesse, ont été déterminées en fonction des indications de la littérature ou par reprise des valeurs admises, par exemple dans les chaînes d'analyses des laboratoires interprofessionnels pour la numération des germes à 30°C (cf fascicule ci-joint).

Pour le traitement des chaînes d'analyses, les limites de répétabilité fixées apparaissent donc correctement choisies par rapport aux possibilités de la méthode, pour les germes à 30°C. Elles apparaissent, en revanche, élevées pour les coliformes et pouvant limiter l'efficacité dans la détection des problèmes analytiques. Pour la justesse - où interviennent les valeurs de S_r et de S_r - les limites sont correctes pour les coliformes mais pourraient apparaître un peu sévères pour les germes à 30°C.

Dans ce dernier cas, toutefois, les limites fixées relèvent d'un objectif de qualité interprofessionnel, de nature technico-économique. Cet objectif est atteint dans la plupart des chaînes d'analyse interprofessionnelle pour les niveaux requis et peut être également un objectif pour les autres laboratoires.

Un complément d'information sur la précision !

Les valeurs de fidélité obtenues à partir des essais interlaboratoires de CECALAIT sur la numération des germes à 30°C et des coliformes dans le lait cru sont globalement conformes à la littérature pour les germes à 30°C, mais s'en distinguent pour les coliformes.

Ces résultats qui seraient à compléter au fil des mois à venir peuvent contribuer à définir des objectifs de qualité adaptés et raisonnables pour les laboratoires de microbiologie laitière. Ils devraient permettre de combler les lacunes des textes normatifs actuels, en matière de précision et de proposer des valeurs de fidélité représentatives de la pratique effective des méthodes dans le secteur laitier.

DU COTE DE LA BIBLIO

Après un tour d'horizon de la littérature parue ce trimestre, nous avons relevé quelques documents plus particulièrement intéressants.

Si vous souhaitez obtenir des précisions sur l'ensemble des références repérées, n'hésitez pas à prendre contact avec nous...

☞ Tout d'abord quelques articles courts ont le mérite de faire, en français, le point sur l'offre actuelle en matière de méthodes rapides d'analyse.

➤ pour la détection d'antibiotiques

LANGLEY-DANYSZ P., FAURE O. Détection des antibiotiques : rapidité et fiabilité. RLF, 1995, N. 553, p. 31-33

➤ pour la détection de microorganismes

LEMOINE D. Analyses rapides : un vaste choix. RIA, 1995, N. 545, p. 142-147

Dans le même esprit, signalons également un dossier paru dans RIA, n° 547 -1995-, sur la microbiologie prédictive, ses outils et ses apports.

☞ Toujours dans le domaine de la microbiologie ou de la détection d'antibiotiques, certains articles plus détaillés ont également attiré notre attention. Ainsi :

SUHREN G.; LUITZ M. Evaluation of microbial inhibitor tests with indicator in microtitre plates by photometric measurements. *Milchwissenschaft*, 1995, V. 50, N. 8, p. 467-470

BRINKMAN E.; VAN BEURDEN R.; MACKINTOSH R.; BEUMER R. Evaluation of a new dip-stick test for the rapid detection of *Salmonella* in food. *Journal of Food Protection*, 1995, V. 58, N. 9, p. 1023-1027

MAKINO S.I.; OKADA Y.; MARUYAMA T. A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, V. 61, N. 10, p. 3745-3747

LIN W.J.; JOHNSON E.A. Genome analysis of *Clostridium botulinum* type A by pulse-field gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 1995, V. 61, N. 12, p. 4441-4447

➤ Concernant *Clostridium*, nous avons eu l'occasion de nous replonger dans des articles de fond, bien plus anciens, mais toujours d'actualité. C'est notamment le cas de :

BERGERE J.L. , HERMIER J. Etude des facteurs contrôlant la croissance et la sporulation de *C. tyrobutyricum*. II Facteurs liés à la croissance. Ann. Inst. Pasteur, 1965, V. 109, p. 391-405

BERGERE J.L. La germination de la spore de *C. tyrobutyricum*. I. Action de différents composés sur la phase initiale. Ann. Inst. Pasteur, 1969, V. 117, p. 179-195

BERGERE J.L., HERMIER J. Spore properties of *Clostridia* occurring in cheese; J. Appl. Bact., 1970, V. 33, p. 167-179

Dans le domaine des analyses physico-chimiques, les centres d'intérêt sont un peu plus éclatés.

↳ Signalons tout d'abord que le suivi de la lipolyse bénéficie d'un article de revue très complet, avec :

COLLOMB M.; SPAHNI M. Revue des méthodes de dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. Lebensm. - Wiss. u. Technologie, 1995, V. 28, p. 355-379

Des composés majeurs du lait et des produits laitiers sont également objet d'études dans les articles suivants.

GLAESER H. Différenciation par analyse de la matière grasse anhydre et de l'huile de beurre. [traduction d'un article paru dans]. DMZ Lebensm. Milch., 1995, V. 116, N. 12, p. 536-539

NARINESINGH D.; STOUTE V.A.; DAVIS G.; PERSAD D. Improved spectrophotometric determination of lactose in milk using flow-injection analysis. Analytica Chimica Acta, 1992, V. 258, N. 1, p. 141-149

↳ Pour ce qui est des composés indésirables, nous avons plus particulièrement remarqué le travail suivant

SCHIMMEL H.; GRIEPINK B.; MAIER E.A.; KRAMER G.N.; ROOS A.H.; TUINSTRA L.G.M.T. Intercomparison study on milk powder fortified with PCDD and PCDF. Fresenius J. Anal. Chem., 1994, V. 348, N. 1-2, p. 37-46

↳ Les conditions d'utilisation d'une méthode analytique aussi importante que l'analyse infra-rouge continuent à susciter des travaux, ainsi :

LYNCH J.M.; BARBANO D.M.; FLEMING J.R. Evaluation of commercially available milk powders for calibration of mid infrared analyzers. Journal of AOAC International, 1995, V. 78, N. 5, p. 1219-1224

SMITH E.B.; BARBANO D.M.; LYNCH J.M.; FLEMING J. R. Infrared analysis of milk : effect of homogenizer and optical filter selection on apparent homogenization efficiency and repeatability. Journal of AOAC International, 1995, V. 78, N. 5, p. 1225-1233

↳ Enfin, à l'écart des centres d'intérêt précédents, mais bien dans l'actualité, nous avons repéré :

➤ **MUIR D.D.; HUNTER E.A.; WATSON M.** Aroma of cheese. 1. Sensory characterisation. Milchwissenschaft, 1995, V. 50, N. 9, p. 499-503

➤ **SCHULZE M.** Differenzierung von konventionellen und rekombinanten Chymosinpräparaten. [Différenciation entre des préparations de chymosine conventionnelle et recombinante]. Milchwissenschaft, 1995, V. 50, N. 4, p. 205-208

et aussi :

➤ **BUREL D.** Codex Alimentarius : une arme à double tranchant. RLF, 1995, N. 554, p. 10-11,

un article où l'auteur plaide pour une forte implication de la profession dans les travaux de la FIL, qui occupe une position privilégiée au sein du Comité du Lait du Codex. Une telle participation permettrait notamment d'influer sur les choix faits pour définir les produits, leurs modes de fabrication, l'autorisation d'additifs ou de technologies nouvelles...

Cet article souligne, en outre, le rôle décisif accordé aux critères scientifiques par les instances du Codex lors de l'élaboration de normes sur les produits et estime souhaitable de prendre également en compte les préoccupations des consommateurs, les facteurs culturels...

[Sur les liens entre Codex, GATT et libre circulation des denrées alimentaires, nous vous invitons à vous reporter aux articles que nous avons succinctement résumés dans La Lettre de CECALAIT, N° 13, (janvier 1995) (J.P. DOUSSIN, Option Qualité, 1994, N. 117, p. 11-17 et N. 118, p. 15-19)].