

# 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 30 avril 1996

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

Relecture par : A. DASEN, R. GRAPPIN et les auteurs des articles

## SOMMAIRE

Cryoscopie : étude comparative entre les méthodes à temps fixe et la méthode par recherche de plateau p 1-3

Normes et projets de normes parus récemment

Evaluation : kit SNAP™ de détection des  $\beta$ -lactamines p 4-6

Rendez-vous

Note technique : influence des conditions de broyage dans les chaînes « pathogènes fromages » p 7-8

Nouveautés dans la réglementation

Validation AFNOR

Du côté de la biblio...

# CRYOSCOPIE : ETUDE COMPARATIVE ENTRE LES METHODES A TEMPS FIXE ET LA METHODE PAR RECHERCHE DE PLATEAU

**L**a méthode de référence de mesure cryoscopique du point de congélation du lait procède à la recherche du plateau sur la courbe de congélation, alors que les méthodes de routine mesurent le point de congélation à un temps fixe après le choc congélateur. Il est reconnu que les résultats obtenus selon ces deux types de méthodes peuvent différer sensiblement. Mais l'ordre de grandeur des écarts potentiels entre les deux méthodes est parfois mal connu ou mal apprécié. C'est pourquoi CECALAIT a comparé, dans des conditions rigoureusement contrôlées, les méthodes à temps fixe et la méthode de référence, au moyen des mêmes échantillons de lait individuel ou de troupeaux. Les résultats mettent en évidence les biais importants introduits par les méthodes à temps fixe. Ils montrent également que le temps nécessaire pour atteindre le plateau de la courbe de congélation peut fluctuer de façon notable.

**L**es différentes normes équivalentes, FIL 108B:1991, ISO 5764, AFNOR V 04-205 de 1990, décrivent la méthode cryoscopique de référence. Celle-ci correspond à la température du plateau atteint par le lait lors de la remontée de température consécutive à la cristallisation (choc congélateur) initiée mécaniquement après refroidissement à une température appropriée.

Nous avons en outre rappelé, à plusieurs reprises (cf Lettres de Cecalait, N° 13 et 17) l'existence et l'utilisation quasi-généralisée en analyse de routine, de méthodes, qui mesurent la température à un temps fixe après l'induction de la cristallisation. Or, bien que la littérature ait clairement établi les risques d'erreur systématique liés à ces méthodes, ils semblent parfois mal appréciés, et en tous cas mal connus des utilisateurs. C'est pourquoi une étude comparative des principaux modes de mesure à temps fixe avec la méthode de référence nous est apparue du plus grand intérêt.

## PROTOCOLE

### ♦ ECHANTILLONS

L'essai a porté sur 40 laits individuels (prélevés pour le contrôle laitier et additionnés de pastilles de bronopol) et 62 laits de mélange (laits sans conservateur) provenant de deux tournées de ramassage distinctes et ayant été prélevés à des fins de paiement du lait

Dans chacune des deux populations de laits, environ 20 à 30 % des échantillons ont été "mouillés" artificiellement à 3 et 6% afin d'obtenir une amplitude de point de congélation à la fois représentative de la réalité et permettant une bonne analyse des résultats.

Les essais ont été menés au laboratoire de physico-chimie de CECALAIT à l'aide d'un appareil Advanced Instrument 4 D III préalablement paramétré sur la mesure du point de congélation par recherche du plateau.

Chaque échantillon et chaque solution saline, utilisée pour l'étalonnage, ont été analysés en double. Afin de simuler le temps fixe, les températures affichées par l'appareil ont été

relevées exactement à 30, 60 et 90s après le choc congélateur. Puis, bien sûr, les valeurs finales affichées une fois le plateau atteint, ont été également relevées. De cette manière, la même prise d'essai a permis de mesurer pour chaque échantillon et en une seule phase de mesure, les 4 valeurs correspondant aux modalités potentiellement utilisables par les laboratoires. L'erreur d'échantillon en est alors limitée. En outre, pour chaque échantillon, on a effectué une mesure du temps total entre le choc congélateur et la prise de température (sur le plateau).

### ♦ TRAITEMENT DES DONNEES

L'appareil a été préalablement calibré sur une recherche de plateau (FIL 108 B: 1991). Mais les valeurs lues à un temps donné après le choc congélateur ont été transformées à l'aide des valeurs obtenues de façon similaire sur les solutions salines (correction sur 2 points de référence: - 0,483 °C et - 0,541 °C). De cette manière, on a simulé des calibrages de temps fixe, à respectivement 30, 60 et 90s. Une vérification de la correction a été établie par comparaison entre la valeur calculée et la valeur de référence d'une solution à - 0,512 °C.

La comparaison des différentes méthodes à temps fixe par rapport à la méthode de référence par recherche de plateau a été réalisée par régression linéaire en prenant comme variable expliquée Y, la méthode de référence et comme variable explicative X, la méthode à temps fixe. La justesse des méthodes à temps fixe a été appréciée au moyen de la moyenne des écarts, des écarts types des écarts, des écarts types résiduels et des équations des régressions linéaires estimées.

## RESULTATS

➤ La répétabilité de l'ensemble des méthodes testées a été satisfaisante avec des valeurs de Sr et r inférieures aux valeurs normalisées (Sr = 1,4 m°C; r = 4 m°C) et similaires pour toutes les méthodes.

➤ Comparaison des méthodes

Le tableau 1 et les figures 1 et 2 regroupent et illustrent l'ensemble des résultats obtenus en comparant les méthodes à temps fixe et la méthode de référence.

Figure 1

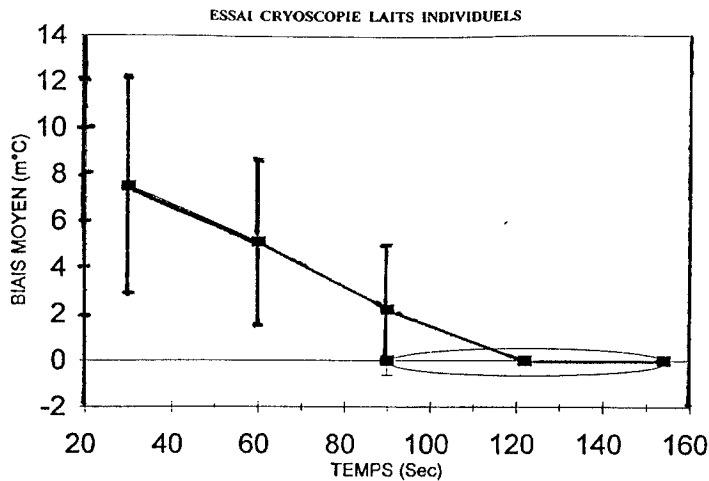
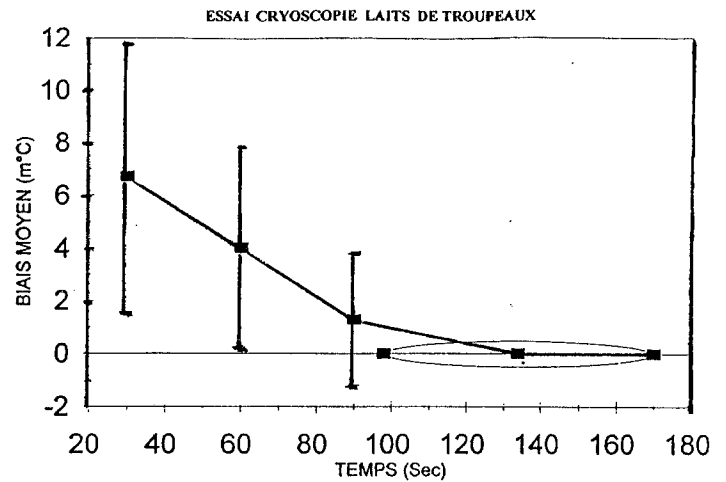


Figure 2



**Tableau 1:** Résultats des comparaisons des méthodes à temps fixe (TF 30, 60 et 90s) par rapport à la méthode de référence par recherche du plateau sur laits de troupeaux et laits individuels (valeurs x (-1000)).

	LAITS DE TROUPEAUX			LAITS INDIVIDUELS		
	TF 30 sec /RP	TF 60 sec /RP	TF 90 sec /RP	TF 30 sec /RP	TF 60 sec /RP	TF 90 sec /RP
$\bar{Y}$	518.0	518.0	518.0	529.3	529.3	529.3
$\bar{X}$	524.8	522.0	519.3	536.9	534.4	531.6
Sy	13.3	13.3	13.3	17.9	17.9	17.9
$\bar{d} = \bar{X} - \bar{Y}$	+6.7	+4.0	+1.3	+7.5	+5.1	+2.2
Sd	2.54	1.90	1.23	2.30	1.81	1.43
Sy,x	2.56	1.91	1.24	2.33	1.79	1.41
b	0.9956	0.9868	0.9940	0.9991	0.9769	0.9831
a	-4.43	+2.87	+1.82	-7.07	+7.23	+6.75
n	62	62	62	40	40	40

$\bar{X}$  : Moyenne méthode temps fixe

Sy,x : Ecart type résiduel de régression

$\bar{Y}$  : Moyenne méthode de référence

Sy : Ecart type de série

Sd : Ecart type des écarts

b : pente

a : ordonnée à l'origine

n : nombre d'échantillons

On observe que les mesures à temps fixe donnent, en général des valeurs de point de congélation significativement inférieures à la méthode de référence pour les laits individuels, comme pour les laits de troupeaux. De plus, l'écart entre les deux valeurs est d'autant plus important que le temps fixé entre le choc congélateur et la mesure est court.

Comme l'indique le tableau 1, la relation liant temps fixe et recherche de plateau consiste en un décalage constant à tous les

niveaux (pente statistiquement non distincte de 1,00). On le mesure par la moyenne des écarts à la référence  $\bar{d}$ . On observe ainsi, sur des laits de troupeaux des valeurs  $\bar{d}$  de l'ordre de 6 à 7 m°C pour un temps fixe de 30s, 4 à 5 m°C pour un temps fixe de 60 s et 1 à 2 m°C pour un temps fixe de 90 s.

Parallèlement, la précision d'estimation de la mesure (+/- 2 Sd) passe d'environ 5 m°C pour 30s, à 4 m°C pour 60s et à environ 2,4 m°C pour une mesure à 90s.

Les figures 1 et 2 montrent ainsi que les biais moyens ( $\bar{d} \pm 2 Sd$ ) et l'intervalle de confiance des mesures augmentent de manière quasi-linéaire avec la réduction du temps de mesure. Leurs valeurs sont notablement plus importantes pour les mesures à 30s qu'à 90s; on peut estimer la variation de l'erreur à environ -0,09 m°C/s entre 30 et 90s.

Ces figures illustrent également les résultats obtenus par la mesure du temps entre le choc congélateur et la prise de température sur le plateau. Elles témoignent d'une forte variabilité démontrant ainsi l'importance du facteur individuel lait dans la précision de la mesure. Les moyennes et intervalles de confiance des temps mesurés ( $t \pm 2 St$ ) sont ainsi de :  
 134  $\pm$  35,8 s, pour les laits de troupeaux  
 122  $\pm$  31,2 s, pour les laits individuels.

## CONCLUSION

Ces résultats mettent clairement en évidence et quantifient précisément les erreurs liées au temps de la mesure cryoscopique. Pour les mesures à 90s, ils confirment les résultats obtenus par Van Leeuwen et Black (1984), présentés dans la Lettre de CECALAIT N° 13, de janvier 1995. Ils soulèvent à nouveau le problème de l'harmonisation des résultats cryoscopiques en France, déjà évoqué dans la dernière Lettre de CECALAIT (N° 17 de janvier 1996).

## Une approche de l'analyse cryoscopique en deux étapes :

L'analyse par recherche de plateau assure seule la valeur vraie du point de congélation. Cette méthode disponible sur certaines configurations d'appareils reste longue (entre 1,5 et 3 mn et en

moyenne autour de 2 mn par analyse), donc coûteuse. Elle peut difficilement répondre aux besoins de cadence de certaines catégories de laboratoires, tels que les laboratoires interprofessionnels. Il en découle la nécessité d'adopter une nouvelle stratégie en matière d'analyse cryoscopique. La stratégie à première vue la plus évidente consisterait en une analyse cryoscopique en deux étapes :

- ♦ une étape de tri où on identifie les échantillons suspects et qui utiliserait les méthodes rapides, telles que les méthodes à temps fixe, ou les méthodes de tri équivalentes, telles que le système associé à l'infra-rouge du Milkoscan 4000 de Foss Electric (DK). Cette étape requerrait un étalonnage par rapport à la méthode de référence FIL 108B, ainsi qu'une prise en compte de l'incertitude associée aux mesures, dans le choix d'un seuil de sélection,

- ♦ une étape de confirmation consistant à analyser en recherche de plateau (FIL 108B) les échantillons suspects détectés au préalable.

Pour ce faire, les matériels disponibles sur le marché se devraient d'offrir à l'avenir à l'utilisateur la possibilité d'ajuster de manière aisée et fiable le signal sur des valeurs de référence connues d'échantillons à teneur garantie (ETG) ou d'intégrer, de manière aisée, une relation correctrice qui serait fonction du temps de mesure choisi.

(par O. LERAY et Ph. TROSSAT)

## NORMES ET PROJETS DE NORMES PARUS RECEMMENT

(reçus entre Janvier et Avril 1996)

### NORMES AFNOR

**V 08-010 Mars 1996 (ICS 07.100.00; 07.100.30)**  
MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.

L'édition précédente est modifiée :

- ♦ par l'addition d'un paragraphe concernant l'eau peptonée diluée, un nouveau diluant,
- ♦ par l'introduction dans plusieurs paragraphes de considérations sur l'incertitude des mesures.

Ces modifications sont liées à la révision de la norme NF ISO 7218 (V 08-002), actuellement au stade de projet. Par conséquent, ce texte n'est pas équivalent à la norme ISO 6887 de 1983 sur le même sujet.

**V 08-026 (NF ISO 10272) Janvier 1996 (ICS 07.100.30)**  
MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Méthode horizontale pour la recherche de *Campylobacter* thermotolérants.

**V 08-060 Mars 1996 (ICS 07.100.30)**

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44°C. (méthode de routine)

### NORMES FIL

**99B:1995 EVALUATION SENSORIELLE DES PRODUITS LAITIERS.** Méthode de référence.

Par rapport à l'édition précédente, les modifications sont nombreuses, en particulier dans le paragraphe consacré à

l'évaluation des produits et dans le vocabulaire descriptif des défauts.

**143A:1995 LAIT ET PRODUITS LAITIERS.** Recherche de *Listeria monocytogenes*.

Cette norme diffère de l'édition précédente en particulier, en signalant qu'il est possible d'utiliser le milieu d'isolement Palcam, en complément du milieu Oxford. Elle se rapproche donc de la normalisation et de la réglementation française, à savoir la norme V08-055 de 1993 et l'avis du Journal Officiel du 23/01/1996.

**161A:1995. LAIT.** Détermination quantitative de la qualité bactériologique. (Guide pour l'évaluation des méthodes de routine).

Cette version précise certains points de l'édition précédente et ajoute une annexe supplémentaire décrivant une méthode rapide, mais grossière d'évaluation de la justesse d'une méthode de routine.

**170:1994. LAIT ET PRODUITS LAITIERS .**  
Dénombrement d'*Escherichia coli* présumés par :

- 1) technique du nombre le plus probable
- 2) technique du nombre le plus probable à l'aide de 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG)
- 3) technique de comptage des colonies à 44°C sur membranes

**176:1996. COAGULANTS MICROBIENS.** détermination de l'activité coagulante totale du lait.

Elle se fait par comparaison avec l'activité de poudres normalisées internationales de référence.

# EVALUATION :

## KIT SNAP™ DE DETECTION DES $\beta$ -LACTAMINES

**V**u leurs conséquences néfastes en santé publique et en technologie laitière, la présence éventuelle de résidus d'antibiotiques dans le lait est fréquemment contrôlée directement chez le producteur ou à l'arrivée en usine. Des tests rapides et de mise en oeuvre facile sont alors nécessaires. Compte-tenu de la composition des spécialités vétérinaires, la détection d'éventuelles  $\beta$ -lactamines constitue le plus souvent le point d'intérêt majeur, d'où la mise au point récente de plusieurs tests rapides spécifiques de ces substances, dont le SNAP™ test d>IDEX.

Ce test basé sur une réaction immunochimique permet de distinguer visuellement les échantillons positifs et négatifs par comparaison à la coloration de témoins. CECALAIT vient d'en évaluer la justesse et la sensibilité par comparaison avec la méthode officielle française. Les résultats obtenus montrent une bonne concordance des deux méthodes. De même, leur sensibilité est globalement voisine, avec de légères différences selon l'antibiotique testé.

**L**es conséquences néfastes liées à la présence d'antibiotiques dans le lait sont bien connues aussi bien en santé publique qu'en technologie laitière. En industrie laitière, les ferments lactiques utilisés dans la fabrication des yaourts ou en technologie fromagère sont très sensibles à l'effet inhibiteur des antibiotiques, avec comme conséquences possibles des retards d'acidification, des défauts d'égouttage ou la prolifération d'une flore annexe comme les coliformes. Pouvant être toxiques ou engendrer des réactions d'hypersensibilité pour les consommateurs, les antibiotiques peuvent également induire une sélection de souches résistantes aux antibiotiques chez des agents pathogènes. C'est pourquoi la législation communautaire a fixé des concentrations maximales, appelées Limite Maximale de Résidu (LMR) pour la plupart des antibiotiques susceptibles d'être présents dans le lait.

Bien que les producteurs soient contrôlés plusieurs fois par mois par les laboratoires interprofessionnels, des contaminations accidentelles en antibiotiques peuvent subsister. De ce fait, des auto-contrôles sont de plus en plus souvent pratiqués directement chez le producteur ou à réception du lait en usine. Mais les tests conventionnels utilisés dans les laboratoires interprofessionnels et reposant sur le principe de l'inhibition microbienne, ont un délai de réponse long, au minimum 3 heures, inadapté aux cadences industrielles. Des tests rapides et faciles à mettre en oeuvre -souvent de type immunoenzymatique ou immunoradiologique- ont donc été mis au point ces dernières années, notamment des tests spécifiques des  $\beta$ -lactamines.

Ces antibiotiques, de la famille des pénicillines, sont en effet présents dans plus de 90% des spécialités vétérinaires employées dans le traitement des mammites, seuls ou en association avec d'autres familles d'antibiotiques.

Parmi ces tests figure le test SNAP™, de la Société Américaine IDEXX, déjà connue en France dans le diagnostic vétérinaire. Applicable au lait cru, il fournit un résultat en 10 minutes et peut être réalisé sans difficulté.

Entre Janvier et Mars 1996, CECALAIT a mené une étude d'évaluation des performances du test SNAP™  $\beta$ -lactamines par comparaison avec la méthode officielle française (arrêté du 2/9/1983, publié au JO du 6/10/1983).

### PRINCIPE, PRESENTATION ET MISE EN OEUVRE DU TEST

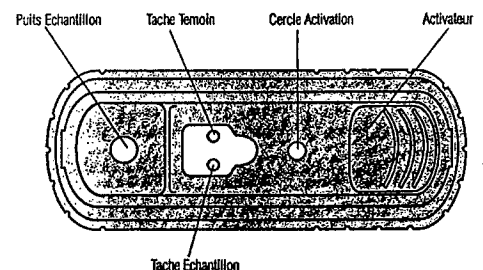
#### ♦ PRINCIPE ET PRESENTATION

Il s'agit d'un test immunoenzymatique, où des récepteurs spécifiques peuvent se lier, soit aux  $\beta$ -lactamines de l'échantillon testé, s'il en contient, soit aux  $\beta$ -lactamines fixées à la surface du test.

Chaque kit individuel prêt à l'emploi comprend une pipette pour le prélèvement du lait, un tube à essai contenant une pastille de réactif (récepteur), et un dispositif SNAP™ « encliquetable ».

Un bloc chauffant pouvant contenir de 2 à 6 dispositifs est nécessaire pour maintenir la température à 45 +/- 5°C pendant toute l'analyse; une version portable existe également.

#### ♦ MISE EN OEUVRE



Le test se déroule en trois étapes. Au départ, l'échantillon est mis en présence du récepteur pendant 5 minutes à 45°C. Si des  $\beta$ -lactamines sont présentes, elles s'y lient alors spécifiquement.

Le lait est ensuite versé dans le puits échantillon du dispositif SNAP™ et migre sur un support jusqu'au cercle d'activation bleu qui se décolore. Pendant cette migration, les récepteurs encore libres se lient aux  $\beta$ -lactamines fixées sur le support au niveau de la tache échantillon.

Enfin, lorsque le cercle activation commence à disparaître, le manipulateur appuie sur l'activateur, libérant le substrat qui migre jusqu'à la tache témoin et à la tache échantillon. Le substrat incolore est transformé par les enzymes fixées au niveau de ces taches en un produit coloré en bleu. La lecture définitive est réalisée après 4 minutes, soit visuellement, soit à l'aide d'un lecteur automatique.

♦ **INTERPRETATION DES RESULTATS:**

Pour un échantillon positif, les β-lactamines contenues dans l'échantillon vont se lier aux récepteurs, qui alors ne se fixent pas ou peu au niveau de la tache échantillon. La réaction colorimétrique est alors **plus faible ou de même intensité** que celle de la tache témoin qui correspond à une concentration en pénicilline de 4 ppb.

Pour un échantillon négatif, les récepteurs restés libres vont se fixer au niveau de la tache échantillon, dont la coloration deviendra alors **plus sombre** que celle de la tache témoin.

**LES ESSAIS**

Chaque échantillon a été soumis au test SNAP™, avec lecture visuelle, et à la méthode de référence.

Rappelons que celle-ci est basée sur la détection d'une acidification du milieu lors de la croissance de *Streptococcus thermophilus*. Il n'y a pas d'acidification quand la croissance bactérienne est perturbée en présence d'antibiotiques. Dans ce cas (résultat positif) ou dans les cas douteux, la méthode prévoit

une seconde étape de confirmation sur gélose, avec trois espèces bactériennes différentes.

Une seule de ces trois espèces est sensible aux pénicillines. Il s'agit de *Bacillus stearothermophilus*, qui a donc été la seule espèce utilisée pour confirmation dans cette étude.

♦ **ECHANTILLONS:**

\* Echantillons naturels: au total 159 échantillons de lait cru de producteur sélectionnés par la méthode officielle dans les laboratoires interprofessionnels, dont 109 échantillons positifs conservés sous forme congelée et 50 échantillons négatifs (non congelés).

\* Echantillons artificiels: Des dilutions successives d'antibiotiques ont été réalisées dans du lait garanti sans antibiotique ou inhibiteur, et stérilisé par ionisation. Afin d'apprécier la sensibilité du test, 5 à 6 concentrations de pénicilline G, d'ampicilline et de cloxacilline ont été testées. Pour plus de précision les analyses ont été répétées 5 fois par concentration.

**RESULTATS**

tableau I

tableau II

	Echantillons négatifs n = 50		Echantillons positifs n = 109	
	REFERENCE		REFERENCE	
	-	+	-	+
SNAP -	50/50 100 %		5/109 5 %	
SNAP +	0/50 0%		10/109 9 %	94/109 86%

		Résultats tous négatifs/5	Résultats intermédiaires (nb de résultats positifs sur 5)	Résultats tous positifs/5
		Pénicilline	SNAP test Référence	< 2 ppb < 2 ppb
Ampicilline	SNAP test Référence	4 ppb 4 ppb	6 ppb (3/5) 8 ppb (4/5)	10 ppb 6 ppb
Cloxacilline	SNAP test Référence	20 ppb ≥ 70 ppb		30 ppb > 70 ppb

♦ **JUSTESSE (TABLEAU I):**

Sur les 50 échantillons de lait cru négatifs, les deux méthodes ont donné des résultats négatifs.

Sur les 109 échantillons de lait congelés potentiellement positifs, le SNAP™ test a donné en majorité des résultats positifs (94 échantillons), mais aussi des faux positifs et faux négatifs:

\* Les faux positifs au nombre de 10 correspondent sans doute à une meilleure sensibilité du SNAP™ test par rapport à la méthode de référence, ou à une concentration faible en limite de détection des deux méthodes. Sur 2 échantillons, les résultats sont négatifs par acidification et positifs en confirmation.

\* Les faux négatifs sont au nombre de 5. Pour 3 d'entre eux nous avons obtenu des résultats positifs en utilisant un SNAP™-test différent, spécifique de la détection des tétracyclines. La souche utilisée en confirmation est, en effet, sensible à la fois aux β-lactamines et aux tétracyclines, alors que le SNAP™ test est spécifique des β-lactamines. Pour les

2 autres échantillons il s'agit sans doute d'une concentration faible en β-lactamines, en limite de détection des méthodes; ces échantillons n'ont pas pu être testés par le SNAP™ test tétracyclines.

♦ **SENSIBILITE (TABLEAU II)**

Globalement, le seuil de détection du SNAP™ test est de même ordre que la référence pour la pénicilline (2-3 ppb); et pour l'ampicilline (6-10 ppb) il est un peu supérieur à celui de la méthode officielle (6 ppb). Par contre, la limite de détection de 30 ppb en cloxacilline pour le SNAP™ test, est bien plus faible que pour la référence (> 70 ppb), du fait de la méthode d'acidification, alors que la limite obtenue en confirmation est 30 ppb.

**Des performances comparables à la méthode de référence**

En conclusion, sur 159 échantillons de lait cru, la concordance du SNAP™ test β-lactamines avec la méthode de référence est de 90,6%. Les discordances observées correspondent sans

doute à des différences de sensibilité des tests, ou à une plus grande spécificité du SNAP™ test.

Le SNAP™ test a une sensibilité comparable à la référence pour la pénicilline, plus élevée pour la cloxacilline et un peu plus faible pour l'ampicilline. Les résultats obtenus dans cette étude concordent avec ceux trouvés dans la littérature.

Si on compare les limites de détections (LD) obtenues dans cette étude aux limites maximales de résidus (LMR) fixées dans le lait cru par la législation européenne, on constate que ces LMRs sont détectables par le SNAP™ test pour la pénicilline et la

cloxacilline mais pas pour l'ampicilline. Celle-ci n'est d'ailleurs pas davantage détectable par la méthode officielle française.

	LD	LMR
* Pénicilline:	2-3 ppb	4 ppb
* Ampicilline:	6-10 ppb	4 ppb
* Cloxacilline:	30 ppb	30 ppb

[par P. ROLLIER (avec la collaboration technique de L. JEANNEROT)]

## RENDEZ-VOUS

### ➔ RAPPEL

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

**20 - 22 MAI 1996 A SONTHOFEN (ALLEMAGNE) : 2E SYMPOSIUM INTERNATIONAL FIL - AOAC**

sur la qualité des analyses et l'efficacité économique dans les laboratoires laitiers et alimentaires.

**22 - 24 MAI 1996 A SONTHOFEN (ALLEMAGNE) : SEMAINE CHIMIQUE FIL - ISO -AOAC**

**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.

<b>FIL</b>	ou	<b>ALF</b>
C. Brooks		34, rue de Saint
41, square Vergote		Petersbourg
B 1040 BRUXELLES		75382 PARIS CEDEX
BELGIQUE		FRANCE
TEL : +32.2.733.98.88		TEL : (1).49.70.71.11
FAX : +32.2.733.04.13		FAX : (1).42.80.63.45
E-mail : fil-idf@mail.interpac.be		

### ➔ AUTRES MANIFESTATIONS

**10 - 12 JUIN 1996 SYMPOSIUM INTERNATINAL POUR LE JUBILEE DE FOSS ELECTRIC A MARIENLYST (HELSINGOR) DANEMARK**

sur le monde laitier au-delà de l'an 2000 : perspectives, défis, visions sur l'avenir...

Pour tout renseignement, prendre contact avec :

### Foss Jubilee Symposium 1996

c/o DIS Congress Service Copenhagen A/S  
2C, Herlev Ringvej  
DK -2730 HERLEV  
DANEMARK  
tel : +45/4492 4492  
fax : +45/4492 5050

**23 - 28 JUIN 1996 : 30E ASSISES BISANNUELLES D'ICAR (INTERNATIONAL COMMITTEE FOR ANIMAL RECORDING : CONTROLE LAITIER INTERNATIONAL) A VELDHOVEN, PAYS-BAS .**

Pour tout renseignement, prendre contact avec :

RVN  
Mrs J. VAN GELDER  
PO BOX 454  
6800 ARNHEM  
PAYS-BAS  
tel : +31/26 3861226  
fax : +31/26 3861212  
E-mail : gelder@nrs.nl

**8 - 12 SEPTEMBRE 1996 : 110E RENCONTRES ANNUELLES ET EXPOSITION DE L'AOAC INTERNATIONAL A ORLANDO, ETATS-UNIS**

Pour tout renseignement, prendre contact avec :

AOAC International  
481 North Frederick Avenue, suite 500  
Gaithersburg, MD 20877-2504  
USA  
tel : +1/301.924.7077  
fax : +1/301.924.7089  
E-mail : aoac@aoac.org  
Internet :http://www.aoac.org

# NOTE TECHNIQUE : INFLUENCE DES CONDITIONS DE BROYAGE DANS LES CHAINES "PATHOGENES FROMAGES"

**L**es résultats observés avec les chaînes microbiologiques dans le fromage ont tendance à être plus dispersés que dans le cas du lait. La préparation des échantillons et notamment leur durée de broyage a sans doute une influence considérable sur la qualité des résultats obtenus. C'est pourquoi, CECALAIT a étudié l'effet de ce paramètre en partant à la fois de résultats obtenus dans le cadre d'essais interlaboratoires et de ceux provenant d'une étude *ad hoc* dans notre laboratoire.

Ces études montrent qu'il faut un temps de broyage d'au moins 2 à 3 min., mais qu'il n'est pas souhaitable de dépasser 3 min., avec le type de fromage utilisé lors de ces essais interlaboratoires. Il est toutefois important que chaque laboratoire adapte son temps de broyage en fonction du matériel utilisé et du type de fromage analysé.

**E**n règle générale, les chaînes microbiologiques "fromage" donnent lieu à une dispersion des résultats plus importante que dans les chaînes lait. Il est également plus difficile d'y déterminer une référence correcte, en particulier, pour les numérations d'*Escherichia coli*.

Pour remédier à ces problèmes, nous avons été amenés à examiner les conditions de préparation des échantillons, et tout particulièrement leur mode de broyage. Les résultats examinés proviennent à la fois d'une sélection de données issues des essais interlaboratoires, ainsi que d'une étude séparée, menée en conditions standardisées au laboratoire de microbiologie de CECALAIT.

## INTERPRETATION A PARTIR DES ESSAIS INTERLABORATOIRES:

Sur les 3 chaînes de l'année 1995 (mars, juin et septembre 1995), et d'après les renseignements fournis dans les feuilles de résultats, nous avons essayé de mettre en relation le temps de broyage avec la justesse des laboratoires, et avec leur répétabilité. Pour chaque temps de broyage nous avons calculé la moyenne des  $\bar{d}$  et  $S_d$ , en :

- ♦ sélectionnant les laboratoires qui avaient procédé aux analyses à la même date et qui utilisaient des milieux équivalents,
- ♦ écartant les laboratoires qui avaient obtenu des résultats aberrants ou qui n'utilisaient pas les méthodes d'analyses courantes.

Les tableaux 1a et b et la figure 1 illustrent, à titre d'exemple les résultats obtenus à partir de la chaîne de Juin 1995.

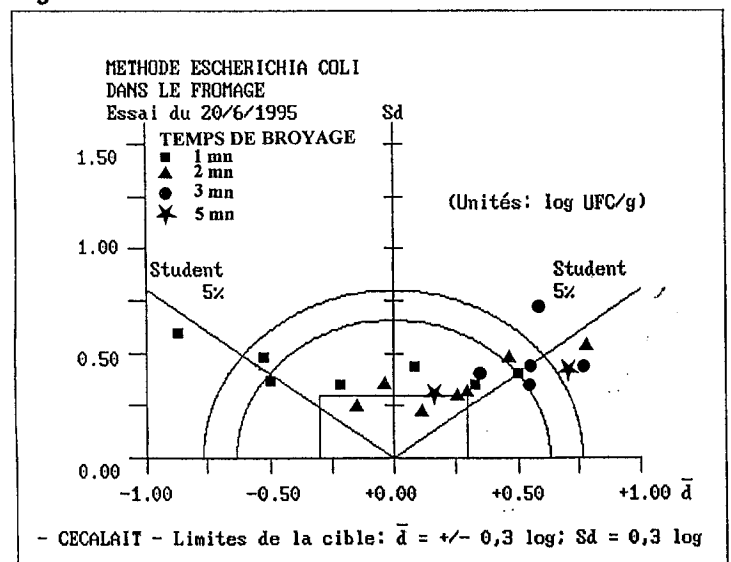
Rappelons que  $\bar{d}$  correspond, par laboratoire, à la moyenne des écarts de chaque résultat par rapport à la référence; la référence est ici la moyenne par échantillon de tous les laboratoires.

tableau 1a	JUSTESSE: moyenne des $\bar{d}$ en log (nb de labos)		
Tps broyage	0,5 à 1,5 min	2 min	3 à 5 min
Staphylocoques	-0,015 (18)	+0,042 (11)	+0,096 (9)
<i>E. coli</i>	-0,082 (8)	+0,166 (10)	+0,524 (7)

tableau 1b	REPETABILITE: moyenne des $S_d$ en log (nb de labos)		
Temps de broyage	0,5 à 1,5 min	2 min	3 à 5 min
Staphylocoques	0,129 (15)	0,053 (4)	0,062 (5)
<i>E. coli</i>	0,161 (7)	0,142 (5)	0,103 (4)

Rappel :  $S_d$  est l'écart-type de répétabilité calculé pour chaque laboratoire.

Figure 1



L'ensemble des résultats obtenus permet de constater que :

- ♦ Dans tous les cas, un temps de broyage de 1 minute est insuffisant pour permettre une bonne dispersion des germes ( $\bar{d}$  les plus faibles et  $S_d$  les plus élevés)
- ♦ Selon les chaînes, sans doute à cause de la texture du fromage, les différences sont plus ou moins marquées entre un broyage de 2 minutes et un broyage de 2,5 à 5 minutes. Elles sont très nettes dans l'exemple ci-dessus.
- ♦ En général, il faut un temps de broyage plus long pour homogénéiser les *E. coli* que pour les Staphylocoques.



Un temps de broyage de 2 minutes permet d'obtenir une bonne répétabilité pour les Staphylocoques, alors qu'il faut au moins 3 minutes pour les *E. coli*. La figure 1 montre que, pour ces germes, des temps de broyage différents ont conduit à une importante dispersion des moyennes des  $\bar{d}$ .

En conclusion, le temps optimal de broyage pour les numérations est de 2 à 3 minutes ( $\bar{d}$  les plus élevés et  $S_e$  les plus faibles).

Toutefois, l'utilisation des seuls résultats provenant des différents laboratoires ayant participé aux essais interlaboratoires ne nous permettait pas de contrôler l'ensemble des conditions analytiques susceptibles d'influencer les résultats. C'est pourquoi nous avons également mené une petite étude en conditions standardisées dans notre laboratoire.

### ETUDE A CECALAIT EN CONDITIONS STANDARDISEES:

L'étude a porté sur trois échantillons différents. Chacun d'eux a été dilué au 1/10<sup>e</sup> (soit 10 g dans 90 ml de tampon phosphate) puis broyé au Stomacher dans des sacs avec filtre sur une longueur de 20 cm. Ils ont été analysés pour différents temps de broyage en doubles par la méthode Spiral. Les tableaux 2a et b regroupent les résultats obtenus.

obtenus dans le tableau 2a ne doivent donc pas être comparés à ceux du tableau 1a.

tableau 2b	Ecart type de répétabilité en log				
	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min
Temps broyage					
Staphylocoques	0,043	0,027	0,016	0,031	0,034
<i>E. coli</i>	0,052	0,045	0,008	0,036	0,029

La norme FIL 122B préconise un temps de broyage de 1 à 3 minutes, cependant les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus montrent de grandes différences de numération entre 1 et 3 minutes (0,14 log pour *E. coli*, et 0,18 log pour les Staphylocoques).

D'après nos essais, il n'est pas souhaitable de prolonger le broyage au delà de 3 minutes, temps pour lequel les écarts types de répétabilité et les écarts types entre échantillon sont les plus faibles. En outre, 3 minutes correspond à un aspect visuel homogène de la suspension mère, sans grain de fromage.

### Adapter le temps de broyage à son produit!

En conclusion, un temps de broyage de 3 minutes peut donc être préconisé pour ce type de fromage. Cependant, ce temps peut et doit être modifié suivant le matériel utilisé (broyeur, sac, vitesse de broyage...) et suivant la texture plus ou moins compacte de ce produit d'une chaîne à l'autre. Une vérification visuelle de l'homogénéité de la suspension-mère est indispensable.

Dans la pratique, avec des fromages de texture différente, le temps de broyage optimal peut varier. Aussi, est-il conseillé à chaque laboratoire dans ses analyses de routine, d'adapter le temps de broyage à chaque type de produit analysé.

(par P. ROLLIER)

tableau 2a	Moyenne des différences par rapport à 5 min en log : $\bar{d}$ et écart type entre échantillons en log : ET					
	Temps broyage	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min
Staph.	$\bar{d}$	-0,183*	-0,029	-0,001	0,000	+0,042*
	ET	0,035	0,014	0,002	0,018	0,016
<i>E. coli</i>	$\bar{d}$	-0,165*	-0,041*	-0,025	0,000	-0,010
	ET	0,014	0,012	0,010	0,016	0,019

\* Différence significative par rapport à 5 minutes par le test de Student

$\bar{d}$  est ici la moyenne des écarts par rapport au temps de broyage de 5 minutes, pris arbitrairement comme référence. Les résultats

## NOUVEAUTES DANS LA REGLEMENTATION

### EUROPE COMMUNAUTAIRE

Règlements n° 281/96, n° 282/96 de la Commission, du 14/2/1996, modifiant les annexes I, II et III 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 37 du 15/02/1996)

Ces textes complètent la liste des substances pharmacologiquement actives soumises à une limite maximale de résidus et celle des substances non soumises à cette LMR.

Une LMR de 100µg/kg de lait a ainsi été définie pour les sulfonamides et les tétracyclines. Pour la cefquinome, (antibiotique de la famille des céphalosporines), la LMR a été fixée à 20µg/kg de lait.

Des LMRs de 50µg/kg de lait s'appliquent également à la colistine et au triméthoprime, substances actives utilisées dans certains médicaments vétérinaires.

Enfin certaines substances organiques comme la caféine viennent compléter la liste des substances non soumises à une LMR.

## FRANCE

**Avis du 24/03/1996**, relatif à la production de laits en vue de leur mise sur le marché communautaire.

Il s'agit de la mise à jour de la liste des établissements produisant des laits de consommation ou des produits laitiers, qui sont titulaires de la marque de salubrité, prévue par la réglementation.

**Arrêté du 8/02/1996**, fixant les conditions dans lesquelles certains établissements mettant sur le marché du lait traité thermiquement ou des produits laitiers peuvent être dispensés de l'agrément sanitaire. (JO du 13/02/1996)

Il s'agit d'établissements dont l'essentiel de la production est destiné à la cession directe aux particuliers pour leur propre consommation. Ils sont néanmoins tenus de se référer à des guides officiels de bonnes pratiques d'hygiène, lorsqu'ils existent.

## VALIDATION AFNOR

Mme Gomy de l'AFNOR nous informe de la validation d'une nouvelle méthode microbiologique par l'AFNOR en novembre 1995. Il s'agit du :

**Test de détection de *Listeria spp.*, enrichissement ISO FRASER, Li 0691, Li 0694, Li 0685, Li 0689** de la société TRANSIA DIFFCHAMB SA.

Ce test se pratique après une période d'enrichissement en milieu sélectif. Il est basé sur une réaction immunochimique ELISA de

type sandwich, qui détecte les antigènes spécifiques de *Listeria*, libérés au préalable sous l'effet d'un choc thermique. Applicable à tous les types d'aliments, il donne des résultats négatifs en 2 jours. L'obtention de résultats positifs demande 5 jours, car les échantillons présumés positifs doivent être confirmés par les techniques de culture habituelles.

(N° d'attestation : TRA-02/6-11/95)

## DU COTE DE LA BIBLIO

**C**omme dans tous les numéros, cette rubrique nous permet de vous indiquer les documents qui nous ont paru les plus intéressants ou les plus originaux, à travers la littérature dépouillée ce trimestre.

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

↳ La plupart des articles repérés concernent des aspects microbiologiques. Signalons d'abord trois articles de revue.

➤ L'un fait le point sur les méthodes de détection de microorganismes souvent mal connus, il s'agit de :

**GOURAMA H.; BULLERMAN L.B.** Detection of molds in foods and feeds : potential rapid and selective methods. *Journal of Food Protection*, 1995, V. 58, N. 12, p. 1389-1394

➤ L'autre reprend les applications de la mesure d'impédance en microbiologie alimentaire

**SILLEY P.; FORSYTHE S.** Impedance microbiology - a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology*, 1996, V. 80, p. 233-243

➤ Le dernier rassemble les facteurs microbiologiques et enzymatiques qui affectent la conservabilité du lait, ainsi que les traitements, thermiques surtout, destinés à limiter la croissance des psychrotrophes.

**MUIR D.D.** The shelf-life of dairy products : 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 1996, V. 49, N. 1, p. 24-32

Un article plus ciblé propose d'ailleurs un nouveau milieu plus sélectif pour la détection du genre bactérien majoritaire chez les psychrotrophes.

**FLINT S.; HARTLEY N.** A modified selective medium for the detection of *Pseudomonas* species that cause spoilage of milk and dairy products. *Int. Dairy J.*, 1996, V. 6, p. 223-230

➤ En ce qui concerne les méthodes de détection et d'identification encore relativement nouvelles, nous avons relevé :

**FEHRMANN A.; FRANZ M.; HOFFMANN A.; RUDZIK L.; WUST E.** Dairy product analysis : identification of microorganisms by mid-infrared spectroscopy and determination of constituents by Raman spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 1995, V. 78, N. 6, p. 1537-1542

➤ Certains groupes bactériens font l'objet d'une attention toute nouvelle, c'est notamment le cas des bifidobactéries, avec, par exemple,

**LIM K.S.; HUH C.S.; BAEK Y.J.; KIM H.U.** A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 1995, V. 78, N. 10, p. 2108-2112

**PACHER B.; KNEIFEL W.** Development of a culture medium for the detection of bifidobacteria in fermented milk products. *Int. Dairy J.*, 1996, V. 6, p. 43-64

➤ *Clostridium* connaît également un regain d'intérêt...

**HERMAN L.M.F.; DE BLOCK J.H.G.E.; WAES G.M.A.V.J.** A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, V. 61, N. 12, p. 4141-4146

**HUCHET V.; THUAULT D.; BOURGEOIS C.M.** Modélisation des effets du pH, de l'acide lactique, du glycerol et du NaCl sur la croissance des cellules végétales de *Clostridium tyrobutyricum* en milieu de culture. *Lait*, 1995, V. 75, p. 585-593

➤ Les pathogènes ne sont jamais oubliés...

**BECKER H.; MARTLBAUER E.** Problèmes posés par la mise en évidence des entérotoxines staphylococciques par la méthode immuno-enzymatique. [Traduction d'un article paru dans] *DMZ-Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, 1995, V. 116, N. 10, p.446-451

**BOTTARI D.A.; EMMETT C.D.; NICHOLS C.E.; WHIPPIE K.D.; RODRIGUEZ D.; DURBIN G.W.; KEOUGH K.M.; GROODY P.; MOZOLA M.A.; REYNOLDS G.N.** Comparative study of a colorimetric DNA hybridization method and conventional culture procedures for the detection of *Listeria spp.* in foods. *Journal of Food Protection*, 1995, V. 58, N. 10, p. 1083-1090

**PODA G.; CESARONI D.; ROSI Y.; MASSA S.** A comparison between two methods the recovery of *Listeria monocytogenes* in milk powder reference samples. *J. Food Quality*, 1995, V. 18, N. 2, p. 167-192

↪ Aux limites des analyses microbiologiques et physico-chimiques, nous avons noté des articles très concrets sur la détection des inhibiteurs et le comptage des cellules somatiques

➤ Détection des antibiotiques

**KATZ S.E.; SIEWIERSKI M.** *Bacillus stearothermophilus* dic assay : a review. *Journal of AOAC International*, 1995, V. 78, N. 6, p. 1408-1415

**SUHREN G.; HEESCHEN W.; REICHMUTH J.** Antibiotics testing : results of IDF-intercomparisons 1989 and 1992. *Bulletin de la FIL*, 1995, N. 305, p. 18-28

➤ Evaluation d'un compteur automatique de cellules somatiques

**HEESCHEN W.H.; UBBEN E.H.; GYODI P.; BEER P.** Zählung somatischer Zellen in Milch : vergleichende Untersuchungen zur Messung nach fluoreszenzoptischem Prinzip (Fossomatic 360) und in der Durchflußzytometrie (Somascope). [Dénombrement des cellules somatiques du lait : essais comparatifs de mesure selon le principe fluoroptique (Fossomatic 360) et la cytométrie de flux (Somascope)]. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 1993, V. 45, N. 2/3, p. 109-136

➤ En physico-chimie, toujours...

**MACRAE R., NICOLSON I.A., RICHARDSON D.P., SCOTT K.J.** Chromatographic determination of vitamins in dairy products. In : *Special Publication, Royal Society of Chemistry*, 1984, V. 49, p. 155-166

**BERGAENTZLE M., ARELLA F., BOURGUIGNON J.B., HASSELMANN C.** Determination de la vitamine B<sub>6</sub> dans les aliments par HPLC - Etude collaborative. *Food Chemistry*, 1995, V. 52, p. 81-86

**JEBSON R.S.; CURTIS H.C.; HUGHES I.R.** Sampling of anhydrous milkfat. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 1979, V. 14, p. 59-62

➤ Enfin dans le domaine de la qualité des matières premières ... ou des données...

**HIDDINK J.** Water supply, sources, quality and water treatment in the dairy industry. *Bulletin de la FIL*, 1995, N. 308, p. 16-32

**ALBERT R.H.; HORWITZ W.** Incomplete data sets : coping with inadequate databases. *Journal of AOAC International*, 1995, V. 78, N. 6, p. 1513-1515