

CENTRE D'ÉTUDE ET DE CONTRÔLE  
DES ANALYSES EN INDUSTRIE LAITIÈRE

avril 1999

**N°29**

# LA LETTRE DE CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 03.84.73.63.20 TELECOPIE : 03.84.73.63.29  
E-mail : bapt@poligny.inra.fr ou trossat@poligny.inra.fr

Rédaction achevée le 7 mai 1999

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

Relecture par : V. LAFARGE, P. ROLLIER et les auteurs

## SOMMAIRE

Dosage des protéines laitières :  
1<sup>ère</sup> partie : évaluation du spectrophotomètre ATL 33

Validations AFNOR

Normes et projets de normes parus récemment

Rendez-vous

Détection des streptocoques  $\beta$ -hémolytiques

Nouveautés dans la réglementation

Du côté de la biblio...

# DOSAGE DES PROTEINES LAITIERES

## 1<sup>ère</sup> partie : évaluation du spectrophotomètre ATL33

**L**e spectrophotomètre ATL 33 de la société Humeau est un appareil utilisé lors du dosage des protéines du lait par la méthode colorimétrique au noir amido. Ses caractéristiques instrumentales et analytiques ont été évaluées par CECALAIT pour vérifier leur conformité avec les exigences réglementaires du paiement du lait. Dans ce cadre, sa stabilité, son traçage, sa répétabilité et sa justesse apparaissent satisfaisantes. Dans sa configuration normale de fonctionnement, ses caractéristiques de linéarité le rendent apte à être utilisé dans la zone de calibrage, allant de 25 à 36 g MAP/kg. Il s'agit d'ailleurs de la zone d'utilisation la plus courante de ce type d'appareil.

**P**our le paiement du lait, la méthode officielle de détermination de la teneur en protéines du lait est la méthode colorimétrique au Noir-Amido (cf arrêté du 2/5/1985) En outre, de nombreux laboratoires d'entreprise utilisent cette méthode, soit en usage direct, soit, comme les laboratoires de paiement du lait et de contrôle laitier, en tant que méthode de référence secondaire pour calibrer les appareils infra rouge. L'élément principal d'une méthode colorimétrique est le (spectro)photomètre. Les laboratoires français utilisent pour l'heure, principalement trois modèles d'appareils : Vital 33, Promilk et Astor 2000. Les deux premiers ayant cessé d'être fabriqués, de nouveaux modèles ont été développés et mis sur le marché. Compte tenu de l'importance de la méthode au noir amido en tant que méthode de référence secondaire pour le calibrage des appareils, la CST a décidé de soumettre cette nouvelle génération d'appareils à la procédure d'autorisation d'emploi dans le cadre du paiement du lait. Cette procédure exige des essais d'évaluation auprès de laboratoires experts (cf Lettre de CECALAIT, n° 0). C'est dans ce cadre que CECALAIT a évalué récemment les caractéristiques analytiques de deux nouveaux spectrophotomètres : l'ATL33, distribué par la société Humeau et le CECIL 2000, distribué par la société Grosseron.

Dans cette première partie ; nous présenterons brièvement l'évaluation de l'ATL 33. La deuxième partie, consacrée à l'évaluation du CECIL 2000 paraîtra dans le prochain n° de la Lettre de CECALAIT, en juillet.

### L'APPAREIL

L'ATL 33 est un spectrophotomètre, de bande passante de 5 nm, équipé d'une cuve à circulation de 1 mm de trajet optique. Il comporte un réseau couvrant une gamme de longueurs d'onde de 330 à 999 nm, mais est réglé sur une longueur d'onde de 620 nm pour la méthode noir amido. Il est composé de trois éléments distincts : le photomètre, un micro-ordinateur, qui gère tout le pilotage de l'appareil, et une imprimante.

### LES ESSAIS

Ils ont été menés en novembre 1998 au laboratoire de physico-chimie de CECALAIT, en utilisant la méthode au noir Amido, conformément à la norme FIL 98A :1985, selon le mode opératoire suivant :

- volume de lait de 0,8 ml
- addition de 16 ml de noir amido
- agitation par rotation pendant 10 mn

- séparation du surnageant par centrifugation (accélération 350g) pendant 5 mn
- détermination de la densité optique du surnageant à 620 nm par le spectrophotomètre.

Les essais ont porté sur les points suivants

- Evaluation de la stabilité de l'appareil,
- Evaluation de la contamination entre échantillons,
- Evaluation de la linéarité,
- Evaluation de la répétabilité,
- Evaluation de la justesse.

Les critères d'appréciation de ces différents paramètres se réfèrent aux normes FIL 128 :1985 et 135B :1991.

#### ① STABILITE

Ce point a été étudié grâce à une série de 4 solutions de noir amido, dilué à 4 niveaux distincts, analysée toutes les 15 mn au cours d'une demi-journée de travail.

La série comporte une solution 0 et trois solutions correspondant au surnageant obtenu avec un lait riche ( ≈ 36 g de protéines/kg), un lait moyen ( ≈ 30 g protéines/kg) et un lait pauvre ( ≈ 25 g protéines/kg).

Les calculs de reproductibilité en vue d'évaluer la stabilité des appareils ont été effectués selon la norme FIL 135 B.

Les résultats montrent que les écarts-types de reproductibilité, en valeur réelle et en valeur relative, SR et SR%, varient de :

**0,03 à 0,06 g/kg, soit de 0,10 à 0,24%**

Ces écarts faibles démontrent la bonne stabilité de l'appareil.

#### ② CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS

Elle a été évaluée par l'analyse d'une solution de noir amido diluée et d'eau, réparties dans des tubes à essai de 16 ml et analysées selon la séquence: EAU – SOLUTION 1 – SOLUTION 2, répétée 10 fois. Le test a été effectué sur 3 niveaux différents, à l'aide de 3 concentrations différentes en noir amido.

Le taux de contamination (Tc %) a été estimé par la formule :

$$T_c \% = \frac{[\Sigma(\text{SOLUTION 2}) - \Sigma(\text{SOLUTION 1}) / \Sigma(\text{SOLUTION 2})]}{\times 100}$$

Dans ces conditions, le spectrophotomètre ATL 33 donne lieu à des contaminations entre échantillons allant de 0,45 à 0,51%. Ces taux sont abaissés jusqu'à 0,30 à 0,34% en utilisant des volumes de solution de 20 ml au lieu de 16 ml.

Ils pourraient éventuellement être abaissés encore en modifiant la longueur et/ou le diamètre du tuyau d'entrée dans la cuvette de mesure.

Cependant, dans tous les cas, les valeurs obtenues satisfont pleinement la limite de 1 % autorisée pour les méthodes rapides de détermination de la composition du lait, utilisées dans le cadre du paiement du lait et du contrôle laitier.

### ④ LINEARITE

Ce paramètre a été évalué par l'analyse dans l'ordre croissant et décroissant :

- d'une part, d'une gamme de solutions de noir amido diluées couvrant la plage de densité optique habituellement utilisée,
- d'autre part, d'une gamme de laits, obtenue par dilution d'un lait concentré, aux taux régulièrement répartis sur la plage de 20 à 45 g MAP/kg.

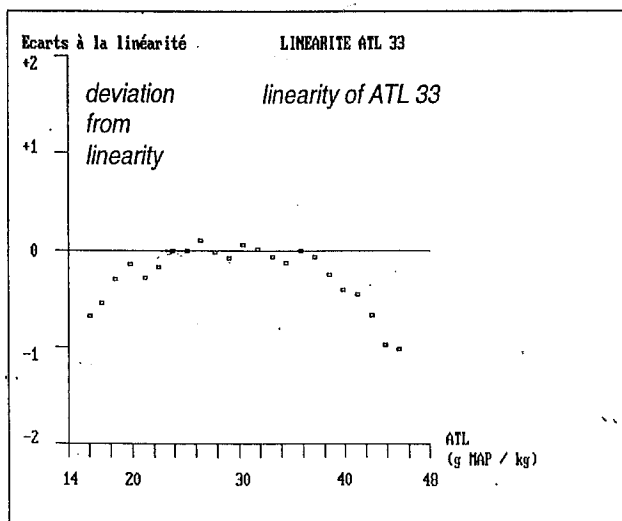
La linéarité a été étudiée par régression linéaire simple, en prenant :

- en variable expliquée Y, les taux théoriques linéaires (g MAP/kg)
- en variable explicative X, la moyenne des résultats obtenus sur chaque spectrophotomètre

L'examen graphique des résidus à la régression a permis de visualiser la distribution des écarts à la linéarité, en fonction des taux théoriques.

La figure 1 montre les résultats obtenus à partir d'une gamme de lait.

**Figure 1 : linéarité de l'ATL 33 sur une gamme de laits**  
*linearity of ATL 33 tested on a set of milk samples*



Les résultats montrent que l'appareil est linéaire dans une plage, englobant la plage de calibration 25 – 36 g MAP / kg. Cette réponse linéaire a été obtenue en utilisant le mode de calibration linéaire proposé dans la configuration de l'appareil. Il n'est donc pas nécessaire de faire appel au mode de calibration par segments, non linéaire, proposé par le logiciel de pilotage.

### ④ REPETABILITE

La répétabilité a été évaluée par l'analyse en double de 100 échantillons de laits individuels de vache (conservés avec du bronopol à la concentration finale de 0,02%).

Les résultats sont consignés dans le tableau 1 ci-dessous qui présente les écarts types de répétabilité, Sr et les écarts maximum entre doubles, r.

**tableau 1 : répétabilité de l'ATL 33**  
*table 1 : repeatability of ATL 33*

	n	moyenne mean g MAP/kg g NP/kg	Sr g MAP/kg g NP/kg	r g MAP/kg g NP/kg
Tous niveaux <i>whole range</i>	96	32,95 <i>32.95</i>	0,0642 <i>0.0642</i>	0,178 <i>0.178</i>
25 à 36 g MAP/kg <i>25 to 36 g NP/kg</i>	72	31,33 <i>31.33</i>	0,0687 <i>0.0687</i>	0,190 <i>0.190</i>

avec / with

n : nombre d'échantillons / number of samples

Sr : écart-type de répétabilité / standard deviation of repeatability

r : écart maximum entre doubles / maximum deviation between doubles.

Ces valeurs de répétabilité sont conformes aux prescriptions de la norme FIL 98A :1985 et sont très semblables à celles obtenues avec un appareil d'utilisation courante, tel le VITAL 33

### ④ JUSTESSE

#### ↳ Procédure

Pour l'évaluation de la justesse, 100 échantillons individuels de lait de vache ont été analysés, en double, parallèlement sur un photomètre VITAL 33 et sur l'ATL 33.

Il a été calibré à l'aide d'échantillons commerciaux de CECALAIT (ETG noir amido), à 3 niveaux protéiques : 25, 30 et 36 g de protéines/kg.

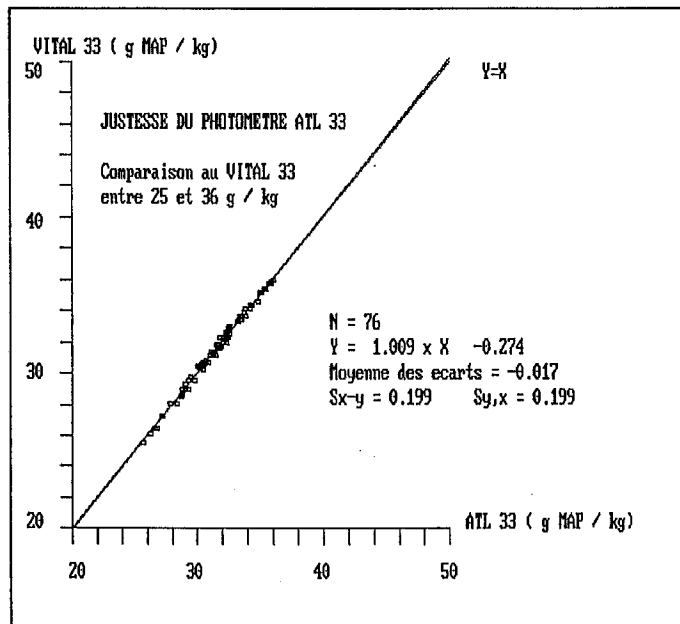
Les opérations se sont déroulées sur 3 jours non consécutifs, répartis sur une période d'une semaine. Chaque série analytique était constituée de laits de contrôle laitier, provenant d'élevages distincts (conservés avec du bronopol à la concentration finale de 0,02%).

La justesse a été estimée au moyen de l'écart type résiduel de régression, en prenant l'appareil de CECALAIT en variable expliquée Y (g MAP/kg) et le spectrophotomètre ATL 33 en variable explicative X (g MAP/kg).

## ↳ Résultats

La figure 2 montre les résultats obtenus entre 25 et 36 g MAP/kg.

**Figure 2 : justesse de l'ATL 33.**  
**accuracy of ATL 33**  
**Comparison between ATL 33 and VITAL 33, in the range 25 to 36 g MAP/kg**



- les biais moyens, non significatifs, sont respectivement de  $-0,017$  sur cette plage (voir fig. 2) et de  $+0,016$  pour tous niveaux confondus.
- Les pentes de régression ne sont significativement différentes de 1 dans aucun cas.
- les écarts-types résiduels de régression sont respectivement de  $0,199$  (voir figure 2) et  $0,238$  g MAP/kg.

En conclusion, la comparaison des résultats entre ce nouvel appareil et un appareil très largement utilisé, comme le VITAL 33

montre une bonne concordance, notamment sur la plage 25 – 36 g MAP/kg.

## CONCLUSION

Le spectrophotomètre ATL 33 a été évalué dans le but d'une autorisation d'emploi pour le paiement du lait. Il a donné satisfaction sur les différents points testés: stabilité, traçage, linéarité, répétabilité et justesse.

Ses caractéristiques de linéarité ne le rendent, cependant apte à l'utilisation, que dans la zone de calibrage de 25 à 36 g/kg. En dehors de cette plage, dans la limite de 20 à 45 g MAP/kg, les résultats obtenus seront entachés d'une erreur dont l'importance dépendra de l'éloignement de la valeur cible par rapport à la zone de calibrage. Enfin, en dessous de 20 g MAP/kg et au dessus de 45 g MAP/kg, ne pourront convenir que des modes opératoires spécifiques aux produits dosés.

Après examen des résultats de cette évaluation, la CST a décidé d'accorder à ce spectrophotomètre, l'autorisation d'emploi dans le cadre du paiement du lait.

## BIBLIOGRAPHIE

- ♦ TROSSAT Ph. ; LERAY O. Rapport d'évaluation du spectrophotomètre ATL 33. CECALAIT, 1998, 10 pages.
- ♦ FIL 98A:1985 : Lait. Détermination de la teneur en protéines. Méthode au noir amido (méthode pratique)
- ♦ FIL 128:1985 : Lait. Définition et évaluation de la précision globale des méthodes indirectes d'analyse du lait - Application au calibrage et au contrôle de qualité
- ♦ FIL 135B:1991 : Lait et produits laitiers. Caractéristiques de fidélité des méthodes analytiques - schéma de conduite d'une étude collaborative
- ♦ arrêté du 2/5/1985 définissant les modalités techniques selon lesquelles sont prélevés et analysés les échantillons de lait livrés par les producteurs aux fins de la détermination de leur composition et de leur qualité. Journal Officiel de la République Française du 12/6/1985.

## Liste des abréviations

CST : Commission Scientifique et Technique du Ministère de l'Agriculture  
 MAP : Matière azotée protéique  
 ETG : Echantillon à teneur garantie

*Rendez-vous au prochain numéro de la Lettre de CECALAIT, pour l'évaluation du CECIL 2000, auquel la CST a également accordé son autorisation d'emploi dans le cadre du paiement du lait.*

## VALIDATIONS AFNOR

**M**mes DIGONNET et KEMAYOU de l'AFNOR nous ont fourni de nouvelles informations concernant les méthodes alternatives d'analyse. Quatre nouvelles

méthodes ont été validées, trois ont vu leur validation reconduite pour 4 ans, une autre a été abandonnée.

## VALIDATIONS NOUVELLES

Il s'agit d'une méthode Petrifilm coliformes, d'un milieu spécifique pour *E. coli* et coliformes et de deux tests de détection des Salmonelles. Les validations sont accordées pour une période de 4 ans.

↳ Le milieu gélose COLI-HD de la société BIOMERIEUX a été validé le 19/1/1999 (n° d'attestation : BIO 12/5 -01/99)

Il s'agit d'un milieu chromogène sélectif pour la détection et le dénombrement des coliformes et des *Escherichia coli*  $\beta$  glucuronidase positive, applicable à tous les produits alimentaires. La validation porte sur le dénombrement des *E. coli*.

Le milieu contient en fait deux substrats chromogènes. Les coliformes autres que *E. coli* y apparaissent donc sous forme de colonies bleues, par mise en évidence de l'activité  $\beta$  galactosidase, alors que les *E. coli* y sont roses, par mise en évidence de l'activité  $\beta$  glucuronidase. Rappelons que cette dernière activité enzymatique sert également de base à la méthode de routine, AFNOR V 08-053, décembre 1993. En conséquence, aucune de ces deux méthodes ne permet de détecter les *E. coli* O157H :7, connus pour être  $\beta$  glucuronidase négative.

La méthode de référence, AFNOR V 08-017, juin 1980, dénombre à la fois les coliformes fécaux et *E. coli*, après une série de tests biochimiques. Ces derniers, très consommateurs de temps, ne sont pas nécessaires avec la méthode validée, qui permet d'obtenir un résultat en 24h.

Par rapport à la méthode de référence, les performances de justesse et de fidélité de la méthode alternative apparaissent satisfaisantes. Celle-ci est toutefois plus sensible que la méthode de référence lorsque, dans l'échantillon, la proportion d'*E. coli* est faible par rapport à l'ensemble des coliformes.

↳ Les tests VIDAS ICS SLM et ICS-Boîte de la société BIOMERIEUX, applicable à tous les produits alimentaires, pour la

détection de Salmonelles ont été validés le 23/3/1999. (n° d'attestation respectifs: BIO 12/6 - 03/99 et BIO 12/7 - 03/99)

↳ le Petrifilm haute sensibilité coliformes (PHSCC) à 30°C, de la société 3M permet le dénombrement des coliformes gazogènes à 30°C dans tous produits d'alimentation humaine. Il a été validé le 23/3/1999. (n° attestation 3M 01/7-03/99)

Les textes de ces trois dernières attestations de validation sont encore sous presse. Nous vous fournirons des informations plus détaillées dès leur parution.

## RECONDUCTIONS DE VALIDATIONS

Les méthodes rapides d'analyses suivantes ont vu leur validation reconduite pour 4 ans.

♦ Gene-Trak Systems, détection de *Listeria monocytogenes*, DNA GT609, distribué par DIFFCHAMB, validé jusqu'au 18/1/2003

♦ Accuprobe, détection de *Listeria monocytogenes*, ref GP 2920, distribué par BIOMERIEUX, validé jusqu'au 7/2/2003

♦ Oxoid *Listeria rapid test*, distribué par la société OXOID, validé jusqu'au 11/4/2003

## ABANDON DE VALIDATION

La méthode ListerScreen de détection du genre *Listeria* (n° d'attestation AES 10/2-04/95), distribuée par la société AES, n'a pas fait l'objet d'une procédure de reconduction. En conséquence, elle ne bénéficie plus de la validation AFNOR depuis le 11/4/1999. Les kits fabriqués auparavant restent néanmoins valides.

## ▶ VALIDATION AOAC

Dans cet autre système de validation, l'appareil d'analyse automatique EiaFoss *Salmonella* qui permet la détection des Salmonelles par un test ELISA après une phase d'enrichissement spécifique a été homologué par l'AOAC.

## NORMES ET PROJETS DE NORMES PARUS RECEMMENT

(reçus entre Janvier et Avril 1999)

### NORMES EUROPEENNES

NF EN ISO 14501, février 1999, AFNOR V 04-175 (ICS 67.100.10, lait). LAIT ET LAIT EN POUVRE. Détermination de la teneur en aflatoxine M1. Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par chromatographie liquide à haute performance.

Ce texte adopte la norme européenne, reproduction intégrale de la norme internationale 14501 de 1998 et, ce faisant, remplace les normes V03-120 de juin 1994 et V 04-170 de novembre 1981.

Cette méthode est également applicable au lait et au lait en poudre écrémés ou à faible teneur en matière grasse. Elle repose

sur l'extraction de l'aflatoxine M1 par passage sur une colonne d'immunoaffinité contenant des anticorps spécifiques fixés sur support solide. Elle est ensuite dosée par chromatographie liquide à haute performance associée à une détection fluorimétrique. Son niveau de détection validé le plus bas est de 80 ng/kg de lait en poudre, soit 8 ng/l de lait liquide reconstitué.

FD CR 12739, mars 1999 – AFNOR X 42-205 (ICS 07.080, biologie, zoologie, botanique) BIOTECHNOLOGIE.

Laboratoires de recherche, développement et analyse. Rapport sur le choix des équipements nécessaires dans les laboratoires de biotechnologie en fonction du degré de danger.

Il s'agit d'un rapport élaboré par le CEN qui donne les lignes directrices permettant de choisir le matériel à utiliser pour pouvoir effectuer de façon satisfaisante et en toute sécurité, des travaux de biotechnologie. Il préconise de faire l'analyse des dangers et notamment une évaluation du risque en vue de choisir un matériel limitant ces risques. En annexe, une abondante bibliographie renvoie à des monographies sur les dangers liés aux travaux biotechnologiques et à l'ensemble des normes consacrées à la sécurité des équipements de biotechnologie et au matériel de sécurité. Elle donne, en outre, la liste des Comités Techniques du CEN travaillant sur des sujets collatéraux.

## NORMES INTERNATIONALES

**ISO 11813 décembre 1998. LAIT ET PRODUITS LAITIERS.** Détermination de la teneur en zinc. Méthode par spectrométrie d'absorption atomique avec flamme.

**ISO 12081 décembre 1998. LAIT.** Détermination de la teneur en calcium. Méthode titrimétrique

**ISO 6887-1 février 1999. MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS.** Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique. Partie 1 : règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.

**ISO 6888-1 février 1999. MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS.** Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 1 : technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Paker.

**ISO 6888-2 février 1999. MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS.** Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 2 : technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène.

Nous vous informerons de façon plus détaillée lors des publications en normes françaises pour chacun de ces textes. En effet, ils sont tous repris dans des projets de normes AFNOR, à un stade plus ou moins avancé. Les deux premières normes citées ci-dessus, seront sans doute repris en normes AFNOR dès la fin de l'année ; les autres ultérieurement.

## NORMES AFNOR

**V 03-110 décembre 1998 (ICS 67.050, méthodes générales d'analyse et d'essai des produits alimentaires) ANALYSE DES PRODUITS AGRICOLES ET ALIMENTAIRES.** Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. Cas de méthodes d'analyse quantitatives.

Ce texte remplace la norme V 03-110 de juillet 1993, en l'actualisant et notamment en élargissant son domaine d'application. C'est un guide pour la constitution, au sein d'un laboratoire, d'un dossier de validation d'une méthode alternative d'analyse **physico-chimique ou biochimique**, quantitative, par rapport à une méthode de référence. Ceci suppose qu'il existe une méthode de référence quantitative, qui puisse être associée à

la méthode alternative et qui soit effectivement applicable, éventuellement dans un autre laboratoire que celui menant la validation. La norme fournit des outils statistiques pour déterminer les caractéristiques analytiques de la méthode interne, décrit l'organisation des protocoles de mesure et donne des exemples d'études de validation dans le domaine agro-alimentaire.

**V 08-050 février 1999 (ICS 07.100.30, microbiologie alimentaire) MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS.** Dénombrement des coliformes par comptage des colonies obtenues à 30°C. Méthode de routine.

Les colonies sont comptées sur un milieu solide au cristal violet, au rouge neutre, à la bile et au lactose (VRBL), après incubation à 30°C pendant 24h. Il s'agit d'une méthode de routine, qui simplifie la méthode de référence (NF ISO 4832, V 08-015) essentiellement en n'utilisant qu'une seule boîte par dilution.

**V 08-051 février 1999 (ICS 07.100.30, microbiologie alimentaire) MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS.** Dénombrement des microorganismes par comptage des colonies obtenues à 30°C. Méthode de routine.

Les colonies sont comptées sur une gélose nutritive (PCA). Il s'agit d'une méthode de routine, qui simplifie la méthode de référence (NF ISO 4833, V 08-011) principalement, en n'utilisant qu'une seule boîte par dilution.

Ces deux documents remplacent les normes expérimentales de même numéro de décembre 1992 en actualisant leur texte.

**V 08-054 février 1999 (ICS 07.100.30, microbiologie alimentaire) MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS.** Dénombrement des entérobactéries par comptage des colonies à 30°C. Méthode de routine.

Les colonies sont comptées sur gélose au cristal violet, au rouge neutre, aux sels biliaires et au glucose (VRBG), après incubation à 30°C pendant 24h. Cette méthode de routine diffère de la méthode de référence (NF ISO 7402, V 08-021) en :

- retenant la température d'incubation de 30°C, qui, dans la norme ISO 7402, est celle proposée pour les dénombrements à but technologique,
- excluant la technique NPP,
- n'utilisant qu'une seule boîte par dilution,
- n'exigeant pas de confirmation systématique des colonies.

Ce document remplace la norme expérimentale de même numéro d'octobre 1993 en actualisant son texte, notamment par rapport à la confirmation des colonies (voir ci-dessus).

**Signalons également la parution, début 1999, des nouveaux recueils de normes françaises et internationales en :**

- « **Microbiologie Alimentaire** ». Cet ouvrage est divisé en 2 tomes, consacrés respectivement aux méthodes horizontales, s'appliquant à l'ensemble des produits alimentaires et aux méthodes sectorielles, spécifiques d'une catégorie de produits. Cette septième édition remplace celle de 1996.

- « **Echantillonnage et contrôle des produits alimentaires** ». Cet ouvrage regroupe les normes donnant les principes des contrôles et échantillonnage, celles spécifiques à chaque catégorie de produits alimentaires et celles concernant les matériels d'échantillonnage. Il s'agit de sa cinquième édition qui remplace celle de 1992.

## PROJETS DE NORMES AFNOR, SOUMIS A ENQUETE

**Projet NF EN 13485 (E18-017)** : Thermomètres pour le mesurage de la température de l'air et des produits pour le transport, l'entreposage et la distribution de denrées alimentaires réfrigérées, congelées, surgelées et des crèmes glacées. Essais, performance, aptitude à l'emploi.

**Projet NF EN 13486 (E18-151)** : Enregistreurs de température et thermomètres pour le transport, l'entreposage et la distribution des denrées alimentaires réfrigérées, congelées, surgelées et des crèmes glacées. Vérification périodique.

**Projet NF EN ISO 8261 (V 04-018)** : Lait et produits laitiers. Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

**Projets NF EN ISO 14673-1/-2/-3 (V 04-172-1/-2/-3)** : Produits laitiers. Détermination de la teneur en nitrates et nitrites. Partie 1 : méthode par réduction au cadmium et spectrométrie. / Partie 2 : méthode par flux continu segmenté. / Partie 3 : méthode par analyse en flux continu et dialyse en ligne.

**Projet NF ISO 15323 (V 04-219)** : Produits à base de protéines lactiques sèches. Détermination de l'indice de solubilité de l'azote.

**Projets NF ISO 5765-1 et -2 (V 04-358 -1 et -2)** : Lait sec, mélanges secs pour crèmes glacées et fromages fondus. Détermination de la teneur en lactose. - Partie 1 : méthode enzymatique par la voie glucose. / Partie 2 : méthode enzymatique par la voie galactose.

**Projets NF EN ISO 3727-1 et -2 (V 04-392-1 et -2)** : Beurre. Détermination des teneurs en eau, en matière sèche non grasse et en matière grasse (méthode de référence). Partie 1 : détermination de la teneur en eau. / Partie 2 : détermination de la teneur en matière sèche non grasse

**Projet ISO 16305** : Beurre. Détermination de la fermeté

**Projet NF EN ISO 16654 (V 08-032)** : Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O 157

**Projet V 08-033** : Microbiologie des aliments et aliments des animaux. Méthode horizontale pour le dénombrement des microorganismes psychrotrophes

**Projets NF EN ISO 14698-1/-2/-3 (X 44-110, X 44-111, X 44-112)** : Salles propres et environnements maîtrisés apparentés. Maîtrise de la biocontamination. Partie 1 : principes généraux. / Partie 2 : évaluation et interprétation des données de biocontamination. / Partie 3 : méthodologie de mesurage de l'efficacité de procédés de nettoyage et/ou de désinfection de surfaces inertes portant des souillures humides biocontaminées ou des biofilms.

## la révision des normes en bref

Les normes sont généralement soumises à une procédure de révision tous les 5 ans. S'il y a matière à réviser, il y a publication d'un projet de norme, soumis à enquête probatoire auprès des utilisateurs intéressés, des commissions et départements ministériels considérés. Leurs remarques et commentaires pourront servir à l'élaboration du projet final. Celui-ci ne deviendra norme qu'après un vote. Cette procédure s'applique aux normes nationales, européennes et internationales.

Les projets de normes internationales sont généralement élaborés par des comités techniques de l'ISO et soumis au vote de chaque comité national membre de l'ISO (les organismes nationaux de normalisation). Ceux-ci procèdent à une enquête probatoire. La publication en tant que norme internationale requiert l'approbation de 75% au moins des Comités membres votants. Il peut donc arriver qu'une norme internationale ne soit pas reprise en norme nationale.

Quand le projet de norme internationale présente également de l'intérêt pour la normalisation européenne, les accords entre le CEN et l'ISO stipulent que l'enquête probatoire est valable pour les deux organismes. En cas d'acceptation du projet, le projet final sera soumis en parallèle à un vote au sein de l'ISO et à un vote formel au sein du CEN. Mais au contraire des normes ISO, l'adoption d'une norme par le CEN oblige les organismes nationaux de normalisation à s'aligner, dans un délai de 2 ans. Ceci veut dire qu'ils doivent réviser leurs normes nationales en conséquence pour reprendre les normes européennes concernées et qu'ils doivent annuler celles qui seraient en contradiction.

## RENDEZ-VOUS



à noter sur vos agendas

18 JUIN 1999

ASSEMBLEE GENERALE DE CECALAIT

au TAC Salons de « Bercy », 48, Bd de Bercy à Paris 12e ♦

- ♦ Le matin, assemblée générale statutaire
- ♦ L'après-midi, conférences scientifiques et techniques

## ➤ RAPPELS

☛\* ATTENTION : changements de dates et de lieux

### **23 - 26 MAI 1999 : SYMPOSIUM FIL A PENANG MALAYSIA "RECOMBINED MILK AND MILK PRODUCTS "**

renseignements auprès de

**Alison Johnson**

secretariat : 3<sup>rd</sup> international Symposium on recombined milk and  
milk products

Private Bag 16

WERRIBEE VICTORIA

AUSTRALIE 3030

tel : +61 3 9742 0117

fax : +61 3 9742 0201

mel : alison.johnson@foodscience.afisc.csiro.au

### **7 - 10 JUIN 1999 : SEMINAIRE FIL A SAINT-MALO "PROCEDES MEMBRANAIRES ET NOUVEAUX PRODUITS DANS L'INDUSTRIE LAITIERE**

Pour tout renseignement, prendre contact avec

Prof. J.L. MAUBOIS

Laboratoire de Recherches Laitières INRA

65, rue de Saint-Brieuc

35042 RENNES CEDEX

### **9 - 11 JUIN 1999 : 5<sup>E</sup> SYMPOSIUM INTERNATIONAL SUR L'AUTHENTICITE DES PRODUITS ALIMENTAIRES, A LA BAULE**

Pour tout renseignement, prendre contact avec

Dr M. LEES - C. MENARD

Eurofins Scientific

rue P.A. Bobierre BP 42301

44323 NANTES CEDEX 3

Télécopie : +33/(0)2.51.83.21.10

### **1 - 4 AOUT 1999 : IAMFES ANNUAL MEETING, A DEARBORN , MICHIGAN, ETATS-UNIS**

*IAMFES : International Association of Milk, Food and  
Environmental Sanitarians*

Pour tout renseignement, prendre contact avec

IAMFES

6200 Aurora Ave Suite 200W

DES MOINES

IA 50322-2863

ETATS-UNIS

Tel : +1/800.369.6337 ou +1/515.276.3344

Télécopie : +1/515.276.8655

mel : iamfes@iamfes.org

<http://www.iamfes.org>

### **18 - 21 OCTOBRE 1999 : METROLOGIE 99, 9<sup>E</sup> CONGRES INTERNATIONAL, A BORDEAUX**

Pour tout renseignement, prendre contact avec

Secrétariat Général Métrologie 99

Sandrine GAZAL

Maison de l'entreprise

429, rue de l'Industrie

34966 MONTPELLIER CEDEX 2

Télécopie : +33/(0)4.67.91.33.43

## ➤ AUTRES MANIFESTATIONS FIL

### **3 - 4 JUIN 1999 : BUENOS-AIRES, ARGENTINE**

« L'OMC : perspectives pour l'industrie laitière dans les  
prochaines négociations. »

### **14 - 18 SEPTEMBRE 1999 : ATHENES, GRECE, 83es SESSIONS ANNUELLES**

### **5 - 7 OCTOBRE 1999 : SAN FRANCISCO, USA, SEMAINE DE LA NUTRITION**

Pour tout renseignement, prendre contact avec

**FIL**

Secrétariat

41, square Vergote

B-1030 BRUXELLES

BELGIQUE

Fax : 32/2.733.04.13

mel : info@fil-idf.org

<http://www.fil-idf.org>

## ➤ AUTRES MANIFESTATIONS

### **26 - 30 SEPTEMBRE 1999 : HOUSTON, (TEXAS) USA, 113<sup>E</sup> RENCONTRES ANNUELLES DE L'AOAC INTERNATIONAL**

renseignement auprès de la FIL

### **3 - 10 OCTOBRE 1999 : SYDNEY, AUSTRALIE, 10<sup>E</sup> CONGRES MONDIAL DE SCIENCE ET TECHNOLOGIE DES ALIMENTS**

Pour tout renseignement, prendre contact avec

IUFoST Congress 10, GPO Box 128,

Sydney

NSW 2001

AUSTRALIE

Tel : +61 2 9262 2277

Fax : +61 2 9262 2323

mel : Tourhosts@tourhosts.com.au



# DETECTION DES STREPTOCOQUES $\beta$ -HEMOLYTIQUES

**N**ous avons été interrogés à plusieurs reprises sur l'existence d'une méthode normalisée de recherche de ces microorganismes. C'est pourquoi, il nous paraît utile de faire une mise au point rapide sur cette question et nous remercions Mme Lafarge de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, ex CNEVA) pour tous les renseignements fournis.

## ➤ Réglementation

Les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques sont des pathogènes responsables notamment d'affections rhino-pharyngées et de la scarlatine dans l'espèce humaine, de mammites chez les bovins. Si la réglementation communautaire ne prend pas en compte ce critère, la réglementation française [1], dans ses critères microbiologiques pour le lait cru, destiné à la consommation en l'état, spécifie

**l'absence de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques dans 0,1 ml**

et précise qu'entrent dans cette catégorie des streptocoques appartenant aux groupes A, B, C, G ou L de Lancefield. Ces groupes font référence à une classification sérologique, établie en 1933, par Lancefield R.C. [2]

## ➤ Pas de méthode normalisée

Or, si un avis du Journal Officiel, daté du 23/1/1996, [3] donne la liste des méthodes normalisées utilisables pour la détermination de tous les autres critères prévus à l'arrêté [1], il reste muet sur ce dernier critère. En fait, il n'existe aucune méthode normalisée de recherche de ces germes

La littérature [4] signale qu'il n'existe pas de milieu sélectif réellement satisfaisant pour la détection des streptocoques. Cependant le milieu TKT, décrit en 1953 par Hauge et Ellingsen, cités en [4], est généralement considéré comme permettant la détection et la croissance sélective de l'ensemble des streptocoques  $\beta$ -hémolytiques [4] et [5]. Ce milieu est basé sur une gélose au sang, additionnée de sulfate de thallium (T), de violet de cristal (K) et d'une toxine (T) provenant d'une culture de staphylocoque  $\beta$ -hémolytique. Celle-ci accentue la réaction hémolytique des streptocoques recherchés. Il y a quelques années, cette toxine était produite industriellement et permettait de préparer ce milieu relativement facilement. Or cette production a été arrêtée, mettant les laboratoires utilisateurs dans l'obligation de préparer eux-mêmes cette toxine, ce qui ne va pas sans difficulté ! Cette carence semble d'ailleurs être à l'origine de l'abandon d'un projet de norme, développé par l'AFNOR, il y a quelques années, sur la base de ce milieu.

Pour l'heure, il n'existe aucun milieu commercial de remplacement. Les galeries d'identification supposent un isolement préalable (cf ci-dessous). Quant aux kits commerciaux de recherche des streptocoques fécaux, ils s'intéressent principalement à ceux appartenant au groupe D de Lancefield, qui ne sont pas concernés ici.

## ➤ méthode de l'AFSSA

Dès lors, l'AFSSA conseille d'utiliser comme milieu d'isolement une gélose classique au sang. Elle recommande cependant de modifier légèrement le protocole habituel. En effet, sur ce milieu non sélectif, les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques risquent de devenir indétectables, du fait de la forte concurrence d'autres germes à croissance plus rapide et produisant des colonies plus grosses. C'est pourquoi l'AFSSA préconise d'étaler 0,1 ml de la suspension d'origine **sur plusieurs boîtes**, afin de favoriser la séparation des colonies.

Les colonies présentant une hémolyse doivent ensuite être repiquées pour confirmation et identification. Le premier test est un examen microscopique pour repérer les chaînettes de coques caractéristiques. Ces colonies caractéristiques sont ensuite soumises :

- à une coloration de Gram ; les streptocoques sont Gram+ ,
- au test de la catalase ; les streptocoques sont catalase - ,
- à une série de tests biochimiques comme le test de Camp, l'hydrolyse de l'esculine, de l'hippurate et l'utilisation de certains sucres. Ces tests peuvent être remplacés par l'utilisation d'une galerie d'identification, par exemple, la galerie API20Strep, qui permet de confirmer rapidement l'appartenance des colonies à une espèce pathogène de streptocoques.

Eventuellement, dans le cadre d'une recherche épidémiologique ou d'autres recherches particulières, il peut être nécessaire de compléter l'identification par des tests sérologiques [4], disponibles notamment sous forme de kits prêts à l'emploi.

## ➤ En conclusion

Puisqu'il y a, à la fois, une demande des utilisateurs et une obligation réglementaire, définir une méthode de référence apparaît hautement nécessaire. Dans la mesure où il existe une méthode applicable, mais mal connue, il serait souhaitable d'entamer une démarche afin de la normaliser et de doter ainsi l'ensemble des utilisateurs d'un outil permettant de déterminer aisément ce critère réglementaire.

## Bibliographie

[1] **arrêté du 30/3/1994**, relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché. Journal Officiel de la République Française du 21/4/1994

[2] **LANCEFIELD R.C.** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med., 1933, V. 57, p. 571-595

[3] **Avis** 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. Journal Officiel de la République Française du 23/1/1996

[4] ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), International Association of Microbiological Societies. Microorganisms in foods. 1. Their significance and methods of enumeration. Toronto : University of Toronto Press, 1978, ISBN 0-8020-2293-6. The *streptococci*, p. 38-41 & *Hemolytic streptococci*, p. 149-156.

[5] POUTREL B. Les staphylocoques et les streptocoques de mammites. In Les Groupes microbiens d'intérêt laitier. Hermier J., Lenoir J., Weber F. Eds. Paris : CEPIL, 1992, p. 415-453.

*Nous remercions les personnes du LDA de l'Ariège qui ont, il y a peu, attiré à nouveau notre attention sur cette question et partagé leurs interrogations avec nous.*

## NOUVEAUTES DANS LA REGLEMENTATION

### FRANCE

**Arrêté du 12/1/1999 relatif aux méthodes de dosage des vitamines B1, B2 et B6 dans les denrées et boissons destinées à la consommation humaine.** (JO France du 4/2/1999). Ce texte décrit les méthodes officielles de dosage.

- Les vitamines y sont extraites par hydrolyse acide et enzymatique, puis,
- oxydée en thiochrome pour la vitamine B1, transformée en pyridoxol après un certain nombre de réactions chimiques pour la vitamine B6,
- enfin la vitamine B2, le thiochrome et le pyridoxol sont dosés chacun par fluorimétrie, après isolement des composés par chromatographie liquide à haute performance, en phase inverse. (et appariement d'ions pour le pyridoxol)

**Avis du 28/2/1999 modifiant la liste du 8 février 1998 (et ses avis modificatifs), relatifs à la mise sur le marché communautaire de laits de consommation et de produits à base de lait**

Ce texte complète la liste des établissements conformes aux dispositions de l'arrêté du 2 mars 1995 relatif à l'agrément des centres de collecte, de standardisation, de traitement, de transformation du lait et des produits à base de lait.

➤ A signaler, les services de la DGAL remplacent progressivement leurs plans de surveillance par des plans de contrôle, conformes aux directives européennes. Ces nouvelles modalités de suivi de la qualité sanitaire diffèrent des précédentes par des prélèvements d'échantillons et une recherche de contaminants, de résidus de médicaments vétérinaires, de résidus d'anabolisants....etc... plus systématiques. Les plans de contrôle prévus pour 1999 concernent notamment la contamination des produits laitiers.

### EUROPE COMMUNAUTAIRE

**Règlement n° 175/99 du 26/1/1999, de la Commission modifiant les règlements CEE n°3942/92, CE n° 86/94, CE n° 1082/96 et CE n° 1459/98 établissant des méthodes de référence pour la détermination de certains traceurs dans le beurre, le butter-oil et la crème** (JOCE L 20 du 27/1/1999). Ce texte modifie les limites de tolérance

applicables à l'incorporation des traceurs sitostérol et stigmastérol.

**Règlement n° 508/99 du 4/3/1999, de la Commission modifiant les annexes I à IV 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.** (JOCE L60 du 9/3/1999)

Saluons le remarquable effort de clarification que constitue ce texte ! Il reprend en effet l'ensemble des règlements ayant modifié les annexes et en fait la synthèse. Il fournit donc les tableaux complets, (au 4/3/199), des substances :

- pharmacologiquement actives soumises à une LMR, provisoires ou non, avec l'espèce animale concernée, leurs denrées cibles, le résidu marqueur recherché et la valeur de la LMR (respectivement répertoriées en annexes III et I),
- pour lesquelles aucune limite n'a pu être fixée (annexe IV),
- non soumises à LMR (annexe II).

Cependant dès le 16/4/1999, les annexes I, II et III ont été modifiées par le règlement n°804/1999 (JOCE L102 du 17/4/1999). Ce texte ajoute notamment les LMRs suivantes pour le lait : ceftiofur (100 µg/kg), lincomycine (150 µg/kg), céfaccétrile (125 µg/kg), céphapirine (10 µg/kg), nafcilline (30 µg/kg), lincomycine (150 µg/kg)

**Règlement n° 568/99 du 16/3/1999, de la Commission modifiant le règlement n° 577/97 portant certaines modalités d'application du règlement (CE) n° 2991/94 du Conseil établissant des normes pour les matières grasses tartinables et du règlement n° 1898/97 du Conseil concernant la protection de la dénomination du lait et des produits laitiers lors de leur commercialisation.** (JOCE L70 du 17/3/1999) . Il s'agit d'une modification très mineure du texte.

**Directive 1999/11/CE de la Commission du 8/3/1999 portant adaptation au progrès technique des principes de bonnes pratiques de laboratoire visés dans la directive 87/18/CEE du conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques.** (JOCE L77 du 23/3/1999)

Ce document est le fruit du travail d'un groupe d'experts de l'OCDE depuis 1995, chargés de la révision et de la mise à jour des principes de BPL, adoptés en 1981 par cet organisme. Celui-ci avait alors élaboré une synthèse des méthodes de gestion, des pratiques scientifiques et de l'expérience de divers organismes nationaux et internationaux.

**Directive 1999/12/CE de la Commission du 8/3/1999 portant deuxième adaptation au progrès technique de l'annexe de la directive 88/320 du Conseil concernant l'inspection et la vérification des bonnes pratiques de laboratoire (BPL) (JO L77 du 23/3/1999).** Ce texte donne les dispositions relatives à l'inspection et à la vérification des bonnes pratiques de laboratoire.

#### ↳ AUTRES TEXTES

➤ **La décision 1999/217/CE du 23/2/1999 de la Commission** portant adoption d'un répertoire des substances

aromatiques, utilisées dans et sur les denrées alimentaires. (JOCE L84 du 27/3/1999)

➤ Enfin, signalons **La directive 1999/2/CE du 22/2/1999 du Parlement Européen et du Conseil relative au rapprochement des législations des Etats membres sur les denrées et ingrédients alimentaires traités par ionisation.** (JOCE L66 du 13/3/1999). Jusqu'à la fin de l'an 2000, les Etats membres pourront maintenir leurs autorisations de traitement par ionisation (par exemple, pour certains camemberts en France). D'ici là, la Commission établira une liste positive qui s'imposera à tous les Etats membres. Pour l'heure, cette liste ne concerne que les épices, condiments végétaux et herbes aromatiques séchées. (directive 1999/3 du 22/2/1999)

↳ Outre-Manche, signalons, par ailleurs, le projet de création d'une Agence indépendante des normes alimentaires (FSA), officiellement annoncé par le gouvernement britannique.

## DU COTE DE LA BIBLIO

**V**ous trouverez ci-joint la liste complète des références repérées pour notre base de données sur les techniques analytiques laitières au cours du dernier trimestre.

Si vous souhaitez obtenir des précisions sur ces références, ou la copie d'un document signalé, n'hésitez pas à prendre contact avec nous.

Attention, nous vous rappelons que nous ne pouvons photocopier ni les ouvrages, ni les normes !

➤ **A signaler** : la parution dans Journal of Dairy Science, 1998, V. 81, N. 11, des actes d'un symposium intitulé « **Casein micelle structure : modern approaches to an age old problem.** » 55 pages, 6 articles.