

Résultats du programme européen sur *Clostridium perfringens*

La méthode ISO 7937 (1997) de dénombrement de *Clostridium perfringens* dans les aliments a été évaluée, dans le cadre d'un programme européen destiné à établir, au moyen d'études collaboratives, les performances de fidélité des méthodes ISO de détection et/ou dénombrement de microorganismes pathogènes dans les aliments. Dans le but d'arriver, en outre, à une harmonisation entre cette méthode ISO et une méthode normalisée de référence au niveau européen, la norme EN 13401 (1999), l'étude a inclus la comparaison de deux techniques de confirmation des colonies présumées *C perfringens*. L'une, décrite dans les deux textes, utilise le milieu lactose-sulfite ; l'autre, proposée en technique alternative dans la norme européenne, utilise à la fois le milieu « nitrate-mobilité » et le milieu lactosé à la gélatine.

Les méthodes ISO 7937 et EN 13401 ont été trouvées globalement satisfaisantes, avec des performances équivalentes quelle que soit la technique de confirmation employée. Les valeurs moyennes de fidélité obtenues pour le fromage sont :

- $r(\log) = 0,24$ et $R(\log) = 0,26$ après confirmation en milieu lactose-sulfite
- $r(\log) = 0,25$ et $R(\log) = 0,31$ après confirmation en milieu « nitrate-mobilité », combiné au milieu lactosé à la gélatine

Il a été recommandé d'inclure l'ensemble des valeurs de fidélité obtenues, pour les différentes matrices étudiées dans la norme ISO 7937 et d'autoriser dans ce texte aussi, la technique alternative de confirmation, déjà prévue dans la norme EN 13401.

Pour adopter une méthode normalisée en tant que norme Européenne, le CEN (Comité Européen de Normalisation) exige des données sur sa fidélité (répétabilité et reproductibilité) qui doivent avoir été établies par une étude collaborative, conformément à la norme ISO 5725. Fin 1996, la Commission Européenne a lancé un projet sur quatre ans, destiné à évaluer six méthodes microbiologiques horizontales ISO, portant sur la détection et / ou le dénombrement dans les aliments des microorganismes pathogènes suivants : *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* à coagulase positive, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*.

Par le passé, nous avons rendu compte des résultats obtenus à l'issue des études sur :

- le dénombrement de *Bacillus cereus* dans les aliments par la norme ISO 7932, 1993 (cf Lettre de CECALAIT n° 26).
- la détection et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* par les méthodes ISO 11290-1 & -2 (cf Lettre de CECALAIT n° 30).
- le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par les méthodes ISO 6888-1 & -2 (cf Lettre de CECALAIT n° 35).

Depuis, l'étude concernant *Clostridium perfringens* est, elle aussi, arrivée à son terme. Ses résultats et conclusions ont été présentés lors d'une réunion entre les différents partenaires du projet, début décembre 2000 et son rapport final est en passe d'être diffusé.

Dans ce projet de grande ampleur, impliquant une vingtaine de laboratoires internationaux, les coordinateur et partenaires du programme restent :

- coordinateur de l'ensemble du projet : AFSSA (Mme LAHELLEC)
- partenaires : le RIVM aux Pays-Bas et le MAFF-CSL au Royaume Uni

A tour de rôle, chacun de ces trois laboratoires a été responsable d'un volet du projet. L'étude sur *Clostridium perfringens* a ainsi été conduite par le RIVM.

Parmi les sous-contractants de ce programme, CECALAIT a assuré la préparation, la mise au point, la définition des

paramètres de conservation et l'expédition des échantillons de fromage.

1) CLOSTRIDIUM PERFRINGENS : GENERALITES ET METHODES DE DENOMBREMENT

Il s'agit de bâtonnets Gram positif, anaérobies stricts et sporulés, susceptibles de produire plusieurs toxines provoquant des affections digestives, lors de leur processus de sporulation. Ils sont considérés comme la 3^e cause mondiale des toxi-infections alimentaires (TIA), bien que ne représentant que 5% des TIA en France – mais 15% des hospitalisations consécutives (cf THOLOZAN et al.).

Ils sont largement présents dans l'environnement ainsi que dans la flore intestinale des animaux sains et de l'homme. Ils constituent, soit directement, soit par le biais de l'environnement, des contaminants fréquents des aliments à base de viande. Leurs spores sont persistantes dans le sol, les sédiments et les zones sujettes à des pollutions fécales. En conditions favorables : température entre 15°C et 50°C, pH voisin de 7, aw entre 0,93 et 0,945, leur temps de doublement est très court. Au froid, le développement de quelques souches reste possible, mais leur croissance s'arrête rapidement : le nombre de formes végétatives diminue mais les spores survivent. A l'inverse, la plupart des spores sont détruites lors des traitements thermiques de cuisson, mais celles de certaines souches y résistent, permettant la multiplication ultérieure des germes dans les préparations alimentaires, surtout lorsque celles-ci sont refroidies trop lentement.

Au-delà d'un certain niveau microbien (de 10⁵ à 10⁸/g d'aliment selon différentes sources bibliographiques !) le déclenchement d'une TIA devient possible : les germes ingérés en même temps que l'aliment se multiplient dans l'intestin et sporulent, ce qui libère les toxines. Les symptômes : diarrhées et douleurs abdominales intenses se manifestent 6 à 48h après l'ingestion des aliments contaminés et régressent généralement au bout de 24h. La plupart des TIA dues à *C perfringens* ont été associées à la viande, aux préparations à base de viande et aux sauces.

↳ REGLEMENTATION

Dans la réglementation française, le critère *C. perfringens* n'apparaît en tant que tel que pour quelques produits : foie gras, végétaux.... Dans la plupart des aliments (viandes, semi-conserve,

pâtisseries), il est plutôt fait référence à des critères voisins, plus larges, mais bien moins définis, comme les *Clostridium* sulfito-réducteurs, voire les anaérobies sulfito-réducteurs. Pour les produits laitiers, seuls sont concernés certains aliments lactés destinés à une alimentation particulière, c'est à dire « aux enfants en bas âge, aux femmes enceintes ou allaitantes, aux convalescents, aux personnes âgées, à toute personne ayant des besoins particuliers en certains éléments »... Dans ce cadre, les aliments lactés « n'ayant pas subi de traitement thermique dans le récipient les contenant et nécessitant éventuellement une adjonction de liquide avant consommation » doivent répondre aux critères suivants :

Dans 1g de produit déshydraté ou 10g sous forme liquide :

- *C. perfringens* : absence,
- *Clostridium* sulfito-réducteurs à 46°C : < 10.

(cf AM du 30/3/1978, in note de service DGAI n° 2000-8155)

↳ METHODES

→ ISO 7937 de 1997 et EN 13401 de 1999

La méthode horizontale de référence pour dénombrer *Clostridium perfringens* est décrite dans la norme ISO 7937 de 1997. La norme européenne EN 13401 de 1999 y est quasiment identique sauf sur un point, la confirmation des colonies suspectes. Elle propose, en effet, le choix entre deux techniques : l'une reprend le milieu décrit par la norme 7937 de 1997, l'autre se base sur deux tests décrits dans la première édition de la norme 7937, en 1985.

Ces deux techniques ont donc été insérées dans le protocole expérimental de cette étude du programme européen, afin d'en comparer les performances et de permettre une harmonisation ultérieure entre les deux normes.

Le principe des normes ISO 7937 et EN 13401 se décomposent en plusieurs phases successives à partir de la préparation de la suspension mère.

- inoculer deux séries de boîtes de Petri stériles, vides, à partir de la suspension mère ou de ses dilutions décimales,
- sur l'inoculum, couler le milieu gélosé tryptose-sulfite-cyclosérine, exempt de jaune d'oeuf (SC), maintenu à 47°C et bien les mélanger,
- après solidification, ajouter une surcouche du même milieu gélosé SC,
- incuber en anaérobiose à 37°C pendant 20h,
- compter les colonies noires, présumées *C. perfringens*,
- faire un test de confirmation sur un certain nombre de colonies caractéristiques, retenues pour le dénombrement.

➤ Dans les normes ISO 7937 et EN 13401, ce test se base sur une abondante production de gaz et l'apparition d'un précipité noir, en milieu lactose-sulfite après incubation en anaérobiose à 46°C.

➤ La norme EN 13401 laisse cependant la possibilité d'utiliser une méthode alternative, faisant appel à la combinaison de deux autres tests qui doivent être

pratiqués à partir d'une **même** colonie caractéristique, bien isolée :

- ♦ l'un a lieu en milieu « nitrate-mobilité » après incubation en anaérobiose à 37°C : les *C. perfringens* y sont non mobiles et réduisent le nitrate en nitrite, d'où l'apparition d'une intense couleur rouge, après adjonction d'un réactif approprié,
- ♦ l'autre se base sur une abondante production de gaz et l'apparition d'une couleur jaune, en milieu lactosé à la gélatine, puis sur la liquéfaction de la gélatine.

→ Rappel des méthodes françaises

La méthode de référence AFNOR actuelle, V 08-019 de décembre 1985 est équivalente à la méthode ISO 7937, dans sa version de 1985, c'est à dire qu'elle fait appel aux tests de confirmation « mobilité-nitrate » et milieu lactosé à la gélatine. Il existe cependant une méthode de routine, V 08-056 d'avril 1994, basée sur les mêmes principes que la norme ISO 7937 de 1997, utilisant donc un test de confirmation en milieu lactose-sulfite.

Quant au dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs, un critère mentionné, on l'a vu, dans de nombreux textes réglementaires, il est également basé sur l'utilisation du milieu SC, mais ne prévoit pas de tests de confirmation.

Pour en revenir au programme européen, l'objectif de l'étude était donc de valider la méthode décrite dans ISO 7937, -et éventuellement la variante décrite dans EN 13401- et de déterminer leurs valeurs de fidélité en termes de répétabilité, r, et de reproductibilité, R, au moyen d'une étude collaborative.

2) ETUDE COLLABORATIVE

Comme pour chacune des méthodes microbiologiques évaluées au cours de ce programme européen, les échantillons utilisés se divisent en :

- matériaux de référence, à savoir des capsules de gélatine, préparées par le RIVM, contenant de la poudre de lait, contaminée par des spores de *Clostridium perfringens*.
- trois types d'aliments, représentatifs de la diversité du domaine d'application de la méthode, à savoir :
 - ♦ un produit laitier : fromage, préparé par CECALAIT,
 - ♦ un produit carné : viande de bœuf hachée lyophilisée, préparée par le MAFF-CSL,
 - ♦ un produit sec : aliment pour animaux, préparé par le RIVM. Celui-ci a dû, cependant, ajouter du lait en poudre contaminé à ce type d'aliment, trop gluant pour pouvoir être contaminé artificiellement.

Ils ont tous été contaminés artificiellement, à plusieurs niveaux d'inoculum, à la fois par une souche appropriée de *Clostridium perfringens** sous forme sporulée, ainsi que par une flore autochtone simulée pour le fromage et la viande. Pour les aliments pour animaux, c'est la flore autochtone naturelle qui a été conservée. (cf tableau 1).

* d'origine alimentaire ou d'origine clinique.

Quel que soit leur niveau de contamination, l'homogénéité et la stabilité des échantillons d'aliments ont été vérifiées avant le début de l'étude collaborative.

Les niveaux de contamination s'établissent finalement selon le tableau 1.

tableau 1 : niveaux de contamination des échantillons d'aliments
table 1 : contamination levels of the samples

niveau level	<i>C. perfringens</i>	flore autochtone autochthonous flora
témoin (negative)	0	5. 10 ³ pfc/g pour le fromage 5. 10 ³ cfp/g for cheese autres matrices, cf ci-dessous other matrixes, see below
bas low	10 ² - 10 ³ pfc/g cfp/g	même niveau que <i>C. perfringens</i> pour le fromage
moyen medium	≈ 10 ⁴ pfc/g cfp/g	10 ⁵ pfc/g pour la viande 1. 10 ³ pfc/g, aliment animaux same level as <i>C. perfringens</i> for cheese
haut high	≈ 10 ⁵ pfc/g cfp/g	1. 10 ⁵ cfp/g for meat 1. 10 ³ cfp/g for feed
référence (reference)	≈ 5000 pfc /capsule cfp	

Après un pré-essai entre les trois laboratoires partenaires pour bien cerner les difficultés de la méthode et fixer le mode opératoire, l'étude collaborative a eu lieu en janvier et février 2000 et a finalement rassemblé 17 laboratoires de 13 pays européens.

Les analyses ont été effectuées en double aveugle et la plupart des laboratoires ont testé tous les échantillons, en utilisant les deux techniques de confirmation.

3) RESULTATS

Les résultats des organismes préparant les échantillons ont montré que leur stabilité et leur homogénéité étaient satisfaisantes.

Puis, le dépouillement des rapports d'essais a permis de constater que leur transport et leur réception avaient été globalement satisfaisants.

Pour ce qui est du protocole expérimental, le seul point délicat relevé par les laboratoires concerne les conditions d'incubation lors du test de confirmation en milieu lactose-sulfite. Les indications de la norme ISO 7937 semblent manquer de clarté sur ce point, d'où une incubation en anaérobiose pour certains laboratoires, en aérobiose, pour d'autres, ce qui a pu provoquer quelques difficultés d'interprétation des résultats du test, dans ce dernier cas. Cette péripétie a toutefois été sans conséquence sur les résultats finals et aucune élimination de résultat de laboratoire n'en a résulté.

En ce qui concerne les comptages, les résultats ont ensuite été transformés en log. Puis les valeurs aberrantes ont été éliminées à l'aide du test de Duncan, avant le calcul des valeurs de répétabilité et de reproductibilité.

Ces calculs ont été effectués selon les indications de la norme ISO 5725, comme à l'accoutumée, mais aussi selon le projet de norme EN ISO 16140 qui, s'appuyant sur la détermination de la médiane, semblerait plus adapté aux méthodes microbiologiques.

Les tableaux 2 et 3 présentent les valeurs obtenues, en appliquant ce dernier mode de calcul. Mais, en fait, l'une ou l'autre façon de calculer aboutissent quasiment aux mêmes résultats.

Tableau 2 : répétabilité et reproductibilité des méthodes ISO 7937 et EN 13401 en utilisant le test de confirmation en milieu lactose-sulfite

Table 2 : repeatability and reproducibility of ISO 7937 and EN 13401, using lactose-sulfite medium confirmed counts

Echantillons samples	Nombre labos number labs	médiane (log) median	r (log)	R (log)
Fromage <i>cheese</i>	13	2.52	0.28	0.34
		3.53	0.19	0.21
		4.54	0.25	0.22
Viande <i>meat</i>	13	2.72	0.23	0.34
		3.61	0.21	0.60
		4.54	0.35	0.70
Aliment animaux <i>dried feed</i>	13	2.61	0.28	0.75
		3.82	0.11	0.69
		4.79	0.17	0.52
Référence	13	3.72	0.19	0.27

avec / with

médiane : paramètre de position tel que la moitié des observations lui sont inférieures ou égales et la moitié supérieures ou égales. (In DAGNELIE)

NB : quand la population est répartie selon une loi normale, la médiane est égale à la moyenne

median : value such as half of the observed values are lower or equal and half of the observed values are higher or equal (In DAGNELIE)

NB : when the population is normally distributed, the median is equal to the mean

r : répétabilité. En échelle log signifie que la différence logarithmique obtenue entre deux répétitions dans le même laboratoire a une probabilité de 95% d'être inférieure à r.

r : repeatability. In a log scale, it means that the log difference between two replicates performed in the same laboratory has a 95% probability of being lower than r

R : reproductibilité. En échelle log signifie que la différence logarithmique obtenue entre deux analyses dans des laboratoires différents a une probabilité de 95% d'être inférieure à R.

R : reproducibility. In a log scale, it means that the log difference between the same analyses performed in different laboratories has a 95% probability of being lower than R

Tableau 3 : répétabilité et reproductibilité des méthodes ISO 7937 et EN 13401 en utilisant les tests de confirmation « nitrate-mobilité » et milieu lactosé à la gélatine

Table 3 : repeatability and reproducibility of ISO 7937 and EN 13401, using motility-nitrate and lactose-gelatine medium confirmed counts

Echantillons samples	Nombre labos number labs	moyenne (log) mean	r (log)	R (log)
Fromage <i>cheese</i>	13	2.49	0.30	0.35
		3.55	0.20	0.27
		4.49	0.24	0.32
Viande <i>meat</i>	13	2.71	0.33	0.47
		3.61	0.26	0.61
		4.62	0.27	0.47
aliment animaux <i>dried feed</i>	13	2.61	0.15	0.85
		3.87	0.13	0.74
		4.83	0.14	0.58
Référence	13	3.71	0.12	0.29

Les tableaux 2 et 3 montrent que les valeurs de répétabilité et de reproductibilité varient quelque peu en fonction du type d'aliment et du niveau de contamination ; les valeurs les plus faibles étant obtenues logiquement avec le matériau de référence et les plus élevées avec l'aliment pour animaux au niveau de contamination faible. Ces variations peuvent, à vrai dire, s'expliquer aussi bien par des différences de matrice que par les différences de mode de contamination des aliments. Le plus souvent, les valeurs de fidélité les plus élevées sont observées pour le niveau de contamination le plus faible. C'est le cas ici, pour le fromage et l'aliment pour animaux, mais c'est moins net avec la viande.

Le calcul de valeurs moyennes de fidélité reste cependant tout à fait envisageable et le tableau 4 résume les valeurs ainsi obtenues selon chacune des deux techniques de confirmation.

avec / with

LS : milieu lactose-sulfite

lactose-sulfite medium

NM & LG : milieu « nitrate-mobilité » & milieu lactosé à la gélatine
motility nitrate medium & lactose-gelatine medium

tableau 4 : valeurs moyennes de fidélité des méthodes ISO 7937 et EN 13401

table 4 : mean precision of ISO 7937 and EN 13401 methods

aliments food	confirmation LS		confirmation MN & LG	
	r (log)	R (log)	r (log)	R (log)
fromage <i>cheese</i>	0.24	0.26	0.25	0.31
viande <i>meat</i>	0.26	0.55	0.29	0.52
aliment animaux <i>dried feed</i>	0.19	0.65	0.14	0.72
Référence	0.19	0.27	0.12	0.29

De même que les tableaux 2 et 3, le tableau 4 illustre, en outre, la similitude des données de précision obtenues avec les deux techniques de confirmation. Puisqu'elles aboutissent à des performances équivalentes, il n'y a donc pas lieu de privilégier l'une par rapport à l'autre et il semble souhaitable de laisser le choix à l'utilisateur en fonction de ses habitudes.

4) CONCLUSION

A l'issue de cette étude, les méthodes de référence de dénombrement de *Clostridium perfringens*, ISO 7937 et EN 13401 ont été trouvées globalement satisfaisantes à l'issue de cette étude collaborative de grande ampleur. Des recommandations pour l'évolution des normes en ont néanmoins été tirées et seront transmises au CEN et à l'ISO lors des prochaines réunions de ce programme, prévues en juin 2001, à Berne. Il s'agit :

- ♦ d'inclure dans les deux normes les données de fidélité déterminées dans cette étude selon le projet EN ISO 16140.
- ♦ d'accorder dans la norme ISO 7937 le choix entre deux techniques de confirmation des colonies de *C. perfringens* : l'une utilisant le milieu lactose-sulfite, l'autre la combinaison du milieu « nitrate-mobilité » et du milieu lactosé à la gélatine. Cela aboutira, de fait, à l'harmonisation des méthodes ISO 7937 et EN 13401.
- ♦ d'améliorer, dans les deux textes, la description des conditions d'incubation pour le test de confirmation en milieu lactose-sulfite. Il faudra préciser ainsi si les conditions anaérobies sont nécessaires ou facultatives.

Abréviations

AM : arrêté ministériel

CEN : Comité Européen de Normalisation

cfp : colonie formant particule = pfc : particle forming colony

DGAI : Direction Générale de l'Alimentation

ISO : International Standardization Organization

MAFF-CSL : Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Central Science Laboratory

RIVM : Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu

Bibliographie

- ♦ DAGNELIE P. Théorie et méthodes statistiques. Tome 1. Les Presses Agronomiques de Gembloux, 1973, 378 p.
- ♦ DGAI/SDHA Critères microbiologiques applicables aux aliments. Note de service n°2000-8155 du 12/12/2000, 17 pages.
- ♦ SCHULTEN S.M., BENSCHOP E., NAGELKERKE N.J.D. ; MOOIJMAN K.A.. Validation of microbiological methods. Enumeration of *Clostridium perfringens* according to ISO 7937 (second edition, 1997). RIVM report 286555 002, november 2000 [draft], 83 p.
- ♦ THOLOZAN J.L.. ; CARLIN F. ; FACH P. ; POUMEYROL M. Bactéries anaérobies strictes et hygiène des aliments. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 1997, V. 12, N. 1, p. 48-56.
- ♦ US Food & Drug Administration / Center for Food Safety & Applied Nutrition. *Clostridium perfringens* . In Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (Bad Bug Book). <http://vm.cfsan.fda.gov/mow/chap11.ht>