

Influence du délai d'analyse des échantillons de lait sur le nombre de germes totaux

Gérald Pittet¹, Werner Luginbühl² et Thomas Berger³

¹Suisselab AG, 3052 Zollikofen

²CHEMSTAT, Chemometrik und Statistik 3005 Berne

³Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux, 3003 Berne-Liebefeld

Renseignements: Gérald Pittet, e-mail: gerald.pittet@suisselab.ch, tél. +41 31 919 33 88

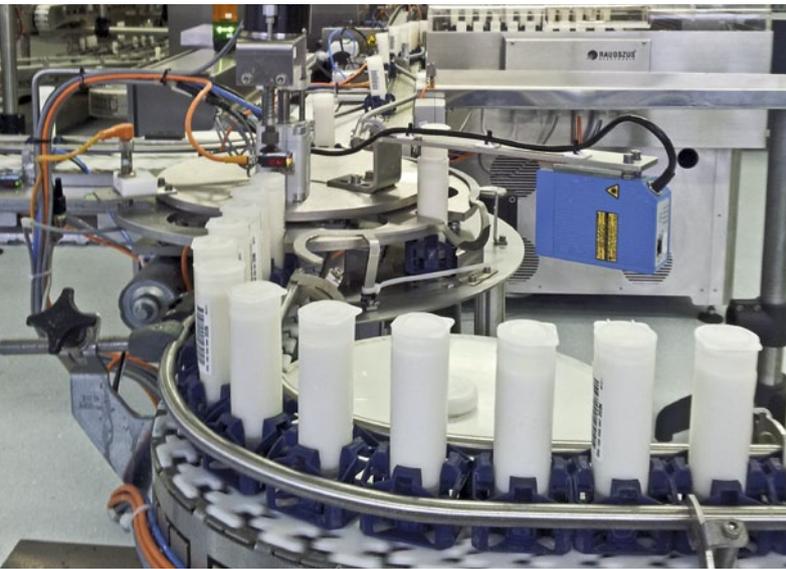


Figure 1 | Enregistrement des échantillons chez Suisselab.

Introduction

Le nombre de producteurs de lait en Suisse ne cesse de diminuer et celui de vaches par exploitation laitière d'augmenter. Pour le contrôle du lait, les changements au niveau des conditions-cadre et la pression sur les coûts ont aussi entraîné la réduction du nombre des laboratoires SICL cantonaux et régionaux à un seul laboratoire pour toute la Suisse (fig. 1; Gerber *et al.* 2007; Glodé *et al.* 2010). Parmi les 27 000 producteurs de lait que la Suisse compte actuellement, environ 47 % livrent leur lait tous les deux jours à partir de la ferme. Le lait est récolté au moyen d'un camion du lait et les échantillons sont prélevés automatiquement. L'autre partie des producteurs de lait, soit environ 53 %, livrent leur lait à une fromagerie artisanale ou à un centre de collecte du lait (ramassage chez le producteur ou aux centres de collecte; Berger, 2010). Dans ce cas, le prélèvement des échantillons est effectué de manière manuelle par une personne préposée (fig. 2). La livraison du lait par les producteurs au centre de collecte a lieu en général une

ou deux fois par jour. Or, le lait des centres de collecte n'est ramassé par le camion de ramassage que tous les deux jours. Pour des raisons pratiques et économiques, une partie des producteurs de lait (env. 10 à 20 %), qui livrent leur lait à un centre de collecte, n'apportent leur lait plus que tous les deux jours, soit le jour même du ramassage du lait par le camion. Cette tendance est à la hausse aussi dans les régions de montagne et les Préalpes, car cet intervalle de livraison permet de faire des économies substantielles.

Selon la «Directive technique concernant l'exécution du contrôle du lait» (OVF 2010), Suisselab, en tant que laboratoire chargé par la Confédération et la branche laitière de l'exécution du contrôle du lait, doit garantir un traitement des échantillons excluant toute modification de leur qualité, ceci dès le prélèvement jusqu'à l'analyse. La conservation des échantillons est uniquement assurée par refroidissement et réfrigération. Par conséquent, l'intervalle entre le prélèvement des échantillons et le début de l'analyse ne doit pas dépasser 30 heures. Afin de respecter ces prescriptions, Suisselab doit coordonner le prélèvement et la collecte des échantillons avec les dates de livraison dans les différents centres de collecte du lait.

Lors de la planification du prélèvement et de la collecte des échantillons, il faut tenir compte d'un grand nombre de facteurs (capacité du laboratoire d'analyses, irrégularités des semaines et des jours du mois, jours fériés différents selon les cantons, disponibilité des échantillonneurs, coûts de collecte, intervalle entre le premier et le deuxième échantillon mensuel, etc.). Par conséquent, il est très difficile de tenir compte des désirs individuels. Chaque mois, environ 1000 à 1200 fournisseurs de lait ne disposent que d'un seul résultat d'analyse au lieu de deux comme le prévoient les bases légales relatives au contrôle du lait. Or, c'est à partir de ces deux valeurs que l'on calcule une moyenne géométrique déterminante pour le mois en question. Selon le critère d'analyse, le dépassement de celle-ci à trois ou quatre reprises en quatre mois conduit à une interdiction de livraison du lait pour le producteur concerné. La moitié



Figure 2 | Prélèvement manuel des échantillons pour le contrôle du lait.

des résultats manquants provient d'échantillons prélevés manuellement. Parmi ceux-ci, une partie est due au fait que la date de livraison du lait ne correspond pas à la date de l'ordre de prélèvement et donc à la collecte des échantillons.

Pour des raisons de coût, Suisselab ne sillonne en général la région propre à chaque tournée de ramassage des échantillons qu'une fois par campagne d'échantillonnage. Or, vu que dans une même région il y a plusieurs acheteurs de lait, les jours de collecte du lait ne sont pas coordonnés entre les différents acheteurs. Autrement dit, un acheteur de lait ira chercher son lait dans les centres de collecte les jours pairs, alors qu'un autre ira les jours impairs. Ainsi, Suisselab n'a aucune possibilité d'ajuster son plan de prélèvement des échantillons en fonction des dates de livraison du lait. Pour mandater tous les centres de collecte du lait à la même date et pour récolter les échantillons en fonction de cette date, Suisselab devrait sillonner de nombreuses régions à deux reprises, ce qui engendrerait des surcoûts considérables. Ce ne sont pas moins de 650 producteurs de lait, 80 centres de collecte et 38 tournées de ramassage des échantillons qui sont concernés. Selon des estimations, cela occasionnerait mensuellement 89 heures et 4697 km supplémentaires, soit un surcoût de CHF 5681.–, ce qui représente CHF 2600.– par campagne de collecte d'échantillons, soit CHF 62800.– par an (24 campagnes) et CHF 4.– par échantillon (Pittet, 2011).

Résumé ■ Chaque mois, environ 1000 à 1200 fournisseurs de lait ne disposent que d'un seul résultat d'analyse au lieu de deux comme le prévoient les bases légales relatives au contrôle du lait. Parmi les résultats manquants, une bonne partie est due au fait que le lait est parfois livré tous les deux jours dans certains centres de collecte. Si la date de livraison du lait ne correspond pas à la date de l'ordre de prélèvement et donc à la collecte des échantillons, le prélèvement ne peut pas être effectué. La prolongation du délai d'analyse de 30 à 36 heures après le prélèvement des échantillons est la solution la plus simple et la plus économique pour remédier à ce problème. Cette prolongation ne conduit qu'à une augmentation minimale du nombre d'échantillons conduisant à une contestation. Cette augmentation est comprise entre 0,07 et 1,25 %. La proportion de résultats se situant dans le domaine de contestation est de 1,397 % avec un délai de 30 heures et de 1,468 % à 2,648 % avec un délai de 36 heures. Ce désavantage peut être considéré comme acceptable et ne concerne que les résultats déjà relativement proches du seuil de contestation. Le désavantage devrait être encore réduit par l'effet de lissage de la moyenne géométrique, celle-ci étant déterminante pour l'évaluation de la qualité relevant du droit public.

Parmi les membres de la Commission pour le contrôle du lait et du groupe de travail y relatif, on est d'avis que ces coûts supplémentaires ne doivent pas être répercutés sur le financement global du contrôle du lait. Les solutions suivantes ont donc été avancées:

A Dans les cas concernés (et seulement dans ces cas), le délai entre le prélèvement et l'analyse des échantillons est prolongé jusqu'à 36 heures. Le délai de 30 heures avait été fixé sur la base d'un essai de multiplication des germes (Bühlmann *et al.* 1999). En raison de la longue expérience de Suisselab et de Qualitas, on part du principe que, par rapport à 1999, la chaîne du froid (max. 5 °C) est mieux respectée et contrôlée vu les meilleures conditions en vigueur aujourd'hui. Si la réfrigération des échantillons et le maintien de la chaîne du froid pendant le transport sont respectés de façon stricte, il ne devrait pas y avoir d'augmentation importante du nombre de germes totaux (fig. 3). Les autres critères d'analyse officiels et de droit privé ne sont pas influencés par les six heures supplémentaires. ➤



Figure 3 | Maintien de la chaîne du froid pendant le transport des échantillons.

B Suissselab organise des tournées séparées de collecte d'échantillons et facture les coûts supplémentaires aux acheteurs de lait par le biais d'un tarif kilométrique et d'un tarif horaire.

Les membres de la Commission pour le contrôle du lait ont privilégié la solution A. Toutefois, avant une décision définitive, l'influence de la prolongation du délai d'analyse sur la multiplication des germes et ainsi le préjudice pour les producteurs de lait concernés devaient être évaluée au moyen d'un essai.

Méthode

Pour cet essai, on a utilisé des échantillons prélevés de manière automatisée et régulière dans le cadre de la collecte du lait, ceci dans un périmètre suffisamment grand. De cette façon, la présence de lait provenant de quatre traites et une variabilité suffisante de la flore du lait dans les échantillons était garantie. Il a été possible de renoncer à étendre le prélèvement à toutes les régions de la Suisse étant donné que l'essai n'avait pas pour objectif de mettre en évidence une différence géographique ou structurelle, mais seule la dynamique de la multiplication des germes faisait l'objet de cette étude. Une éventuelle augmentation des contestations de la qualité du lait étant au centre du problème, il fallait disposer dans cet essai d'un nombre suffisant d'échantillons comprenant entre 30 000 et 79 000 germes/ml susceptibles de dépasser la limite de 80 000 germes/ml après un entreposage prolongé de six heures. Dans le système de paiement selon la qualité relevant du droit privé de la branche laitière, la limite se situe aussi à 80 000 germes/ml pour la fixation des déductions et à 10 000 germes/ml pour le paiement de suppléments. La conversion du nombre d'impulsions mesuré par le BactoScan en nombre de germes totaux se base sur la conversion de 2006.

Structure de l'essai

Le prélèvement a été organisé sur la base d'un échantillonnage aléatoire de $n = \text{env. } 500$ afin que des échantillons avec des nombres de germes «proches des valeurs limites» et élevés soient inclus dans l'échantillonnage. Les échantillons ont été prélevés sur des livraisons de lait effectuées tous les 2 jours, composées donc de quatre traites. La dernière traite était toujours celle du matin. Pour des raisons de capacité, l'essai a été effectué sur six jours, en juillet et août 2011. Les échantillons ont été acheminés chez Emmi à Ostermundigen et à Suhr de même que chez Hochdorf Nutritec à Sulgen. Le mandat de prélèvement des échantillons a été confié directement aux entreprises de transport participant à l'essai (TGL AG, Rolli Transporte AG, Meyer Transport AG et AS milch-logistik GmbH). Après réception des échantillons par le laboratoire d'analyses, ceux-ci ont été divisés en deux moitiés. Chaque moitié d'échantillon a été munie d'un code-barres afin de garantir la traçabilité jusqu'à l'échantillon initial et au producteur de lait. Les échantillons ont été conservés à une température de 1 à 5 °C jusqu'à leur analyse. Ils ont été analysés le jour suivant à 12 h 00 (1^{re} moitié de l'échantillon) et à 18 h 00 (2^e moitié de l'échantillon; fig. 4). Cela correspond à une durée de conservation des échantillons de 30 et de 36 heures à partir de la dernière traite. Les traites les plus anciennes remontaient donc à respectivement 66 et 72 heures.



Figure 4 | Détermination du nombre de germes totaux avec le BactoScan.

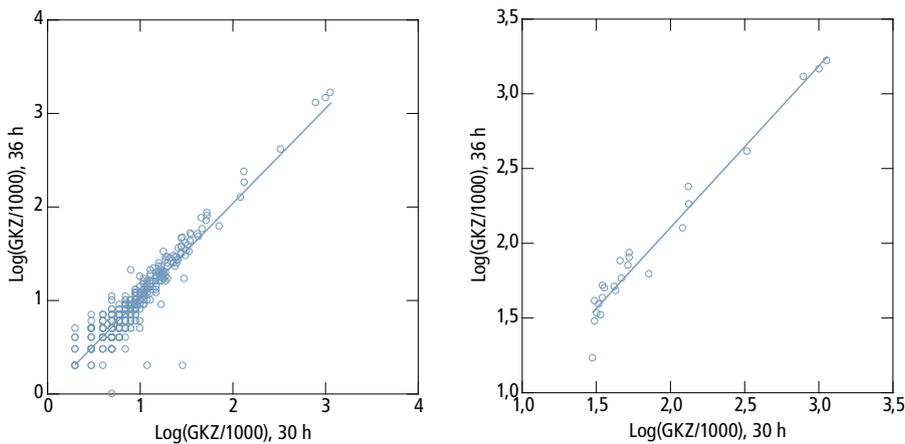


Figure 5 | Diagramme de dispersion des données logarithmiques après 30 et 36 heures de l'ensemble de l'échantillonnage (A) et des échantillons avec un nombre de $\geq 30\,000$ germes/ml (B).

Appareils et logiciel utilisés

Suiselab a mis à disposition des flacons du type BRV1, d'une contenance d'env. 45 ml.

Appareil d'analyse: BactoScan FC (Foss Instruments, Slangerupgade 69 DK-3400 Hillerød)

Logiciel: SYSTAT 13, Systat Software, Inc., 225 W Washington St., Suite 425, Chicago, IL 60606; R version 2.13.1 (2011-07-08); Copyright (C) 2011 The R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0.

Résultats

503 échantillons, dont 501 utilisables, ont été prélevés pendant six jours entre le 7 juillet et le 19 août 2011. Il ressort des données logarithmiques de l'ensemble de l'échantillonnage et des échantillons, qui présentaient lors de la première mesure un nombre de $\geq 30\,000$ germes/ml, une dispersion typique non normale (fig. 5). L'évaluation du nombre de germes totaux des échantillons présentant moins de 30 000 germes/ml démontre des augmentations minimales des valeurs moyennes. L'augmentation s'élève en moyenne à 300 germes/ml pour le groupe de $< 8\,000$ germes/ml et à 1200 germes/ml pour celui de 8000 à 29 000 germes/ml. Pour cette raison,

une évaluation détaillée de ces deux groupes n'a pas été nécessaire. L'évaluation des fréquences des deux groupes les plus significatifs démontre dans les deux cas une augmentation des germes totaux au cours des 6 heures de stockage supplémentaires. Le nombre de résultats compris entre 30 000 et 79 000 germes/ml augmente de 6 et de 2 pour ceux se situant dans la plage de contestation, soit $\geq 80\,000$ germes/ml (tabl. 1). Exprimée en relation de l'ensemble des échantillons, soit 501 résultats, la hausse des résultats se situant dans la plage de contestation s'élève à 0,4 %. Calculée en relation des 7 échantillons ayant déjà $\geq 80\,000$ germes/ml après 30 heures de stockage, la hausse est de 28,6 %. Aucun échantillon, qui se trouvait après 30 heures dans la plage de contestation, n'avait un résultat inférieur à 80 000 germes/ml après 36 heures de stockage.

Au moyen de diverses analyses statistiques, il a été déterminé dans quelle mesure les deux moitiés d'échantillons sont corrélées et comparables et si l'augmentation des résultats se situant dans la plage de contestation est significative.

Corrélations et comparaisons par paires: le coefficient de corrélation des rangs de Spearman est certes significativement différent de 1,0, mais pas de respectivement 0,995 et 0,9987. Le test exact ne montre pour l'intervalle de confiance de 99 % aucun écart par rapport à la valeur 1. Dans le test de Wilcoxon, les deux moitiés d'échantillons appariés sont différentes. On peut aussi utiliser pour des mesures répétées les modèles mixtes linéaires. La différence des valeurs moyennes des moindres carrés des logarithmes des groupes de nombre de germes totaux après respectivement 30 et 36 heures est significative dans ce modèle. Les résidus montrent cependant un écart considérable de la distribution normale, de sorte que le test ne doit être interprété qu'avec

Tableau 1 | Fréquences des groupes en fonction du nombre de germes totaux

Nombre de germes totaux [germes/ml]	30 heures		36 heures	
	Nombre de résultats [n]	Proportion [%]	Nombre de résultats [n]	Proportion [%]
30 000 à 79 000	17	3,4	23	4,6
$\geq 80\,000$	7	1,4	9	1,8

Tableau 2 | Résultats des tests statistiques

Test	Hypothèse nulle	Valeur p*	Commentaire
Test binomial pour l'hypothèse de mêmes proportions des résultats $\geq 80\,000$ germes/ml après 30 et 36 heures (test pour échantillons indépendants), test bilatéral.	Egalité de la proportion des deux groupes (30 et 36 heures)	0,6142	Avec l'abandon de la connexité des deux séries de données, les deux proportions ne sont, avec 1,3972 % et 1,7964 %, statistiquement pas différentes.
Test binomial pour l'hypothèse de mêmes proportions des résultats $\geq 80\,000$ germes/ml après 30 et 36 heures (test pour échantillons indépendants), test unilatéral.		0,3071	
Test de signification de l'augmentation des résultats $\geq 80\,000$ germes/ml (intervalle de confiance d'une probabilité inconnue, distribution binomiale, estimation de Clopper-Pearson et Blyth-Still-Casella).	Pas d'augmentation, $\pi = 0$	$< 0,001$	L'augmentation est significative (l'augmentation observée de la proportion de 0,004 (0,3992 %, différence de 1,3972 % et 1,7964 %) se situe certes dans les limites estimées à 95 %, mais elle est quand même significative étant donné que les limites de confiance pour des paramètres binomiaux proches de zéro ne peuvent pas être estimées de manière fiable).

*Valeur p du test; les valeurs $< 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives dans cette évaluation.

réserve. Selon le procédé, l'augmentation du nombre de germes totaux dans un intervalle de 6 heures est donc significative. D'autres tests ont été effectués pour voir si l'augmentation est tout aussi significative dans le domaine de contestation (tabl. 2).

Sur la base de ce qui précède, on peut se poser la question suivante: avec quelle probabilité maximale et minimale l'augmentation observée est-elle statistiquement conforme? Si l'on varie l'hypothèse nulle, on obtient en fin de compte pour une valeur maximale un $p_0 = 0,01251$ et pour une valeur minimale un $p_0 = 0,00071$. La probabilité maximale conforme du point de vue statistique avec une augmentation de 2 résultats $\geq 80\,000$ germes/ml sur 501 échantillons s'élève ainsi à 1,251 %. La probabilité minimale conforme du point de vue statistique avec une augmentation de 2 résultats $\geq 80\,000$ germes/ml sur 501 échantillons n'est que de 0,071 %. En d'autres termes, dans la plage de contestation, l'augmentation des résultats causée par la prolongation de 6 heures du temps de stockage s'élève au minimum de 0,071 et au maximum de 1,251 %. Dans le présent échantillonnage, la proportion passe donc de 1,397 % après 30 heures et à 1,468 - 2,648 % après 36 heures.

Discussion

En dépit des meilleures conditions de transport par rapport à 1999 et d'un respect strict de la chaîne du froid, le nombre de germes totaux a augmenté pendant le stockage des échantillons. Cependant, le présent essai a démontré que la prolongation de 30 à 36 heures du délai entre le prélèvement et l'analyse des échantillons n'a entraîné qu'une augmentation minimale des résultats conduisant à une contestation, cette augmentation se situant entre 0,07 et 1,25 %. Une estimation plus précise de cette augmentation n'aurait été possible qu'avec un

échantillonnage plus important d'environ 850 échantillons. Ce nombre a été estimé sur la base des résultats du contrôle du lait de 2010 (Berger et Luginbühl 2011). Or, en raison du travail et des frais importants que cela représente, un tel essai n'a pas été entrepris. Pour les membres représentant la branche laitière au sein de la Commission pour le contrôle du lait, les résultats du présent essai sont suffisants et les conséquences de la différence de traitement pour les producteurs concernés sont acceptables. Un essai parallèle au moyen de la méthode de référence sur boîtes de Pétri n'a pas été réalisé, car le dénombrement des germes totaux s'effectue dans la pratique exclusivement par la méthode automatisée de cytométrie en flux.

Conclusions

- La prolongation de 30 à 36 heures du délai maximal entre le prélèvement et l'analyse des échantillons est la solution la plus simple et la meilleure marché pour remédier au problème des échantillons prélevés dans des centres de collecte lorsque les livraisons de lait se font tous les deux jours.
- L'augmentation du nombre de résultats conduisant à une contestation résultant de la prolongation de ce délai s'élève de 0,07 à 1,25 % et peut être considérée comme acceptable. Elle ne concerne que très peu de producteurs de lait et seulement ceux dont le résultat du nombre de germes est proche du seuil de contestation.
- Le préjudice devrait être infime, étant donné que dans la plupart des cas seul un résultat sur deux échantillonnages du même mois est concerné. Après lissage dû au calcul de la moyenne géométrique, la prolongation du délai d'analyse ne devrait pas entraîner une augmentation significative de contestations. ■

Riassunto**Influenza della durata dell'intervallo tra prelievo di campioni e analisi sulla carica batterica del latte**

Ogni mese, circa 1000–1200 fornitori di latte dispongono soltanto di un unico risultato d'analisi anziché di due, come prevedono le basi legali relative al controllo del latte. L'assenza di una parte dei valori è da associare al fatto che in alcuni centri di raccolta la fornitura di latte avviene a volte ogni due giorni. Se la data di consegna non corrisponde alla data dell'ordine di prelievo e quindi alla raccolta di campioni, il prelievo non può essere effettuato. Abbiamo constatato che con l'incremento dell'intervallo massimo tra prelievo di campioni e inizio delle analisi da 30 a 36 ore si può risolvere il problema in maniera semplice ed economica. Ciò comporta soltanto un lieve incremento, compreso tra il 0,07 e l'1,25 per cento, dei campioni per i quali vengono pronunciate contestazioni. La proporzione di risultati che portano ad una contestazione è infatti di 1,397 % con un intervallo di 30 ore e di 1,468–2,648 % con un intervallo di 36 ore. Tale svantaggio può essere considerato accettabile e si riferisce solo ai risultati già relativamente vicini alla soglia di contestazione. Dovrebbe essere ulteriormente ridotto dall'effetto d'appiattimento della media geometrica, la quale è determinante per la valutazione della qualità disciplinato dal diritto pubblico.

Summary**Influence of the storage period between sampling and analysis on total bacterial count in milk**

Every month, only one official milk-testing result is available from between 1000 and 1200 milk producers instead of the two required. Of the missing results, one part originates from milk-collection centers where milk delivery takes place every other day and sampling is performed manually, and is therefore attributable to the time delay between sampling notification and milk delivery. Extending the maximum time allowed between sampling and commencement of the analysis from 30 to 36 hours would provide an easy and cost-effective method to solve this problem. The increase in the number of samples with results above the maximum permitted limit would be slight: In the present study, the percentage increased from 1,397 % at 30 hours to 1,468 – 2,648 % at 36 hours, representing a rise of 0,07 – 1,25 %. This can be accepted as a justifiable drawback as it would affect very few producers and only those whose milk at 30 hours contains bacterial counts close to the official limit. The overall discrimination would probably be even lower as the increased time span would not necessarily affect both monthly samples and therefore, after calculation of the monthly geometric mean as required by the public-law milk quality control, the results may well remain within the limits set.

Key words: total bacteria count, milk, sampling, extension of storage period.

Bibliographie

- Berger T., 2010. Questionnaire on the Determination of total bacterial count in raw milk in European Member States. EU Reference Laboratory on Milk and Milk Products, 4 p.
- Berger T. & Luginbühl W., 2011. Qualitätskontrolldaten Rohmilch (Dezember 2010) – Données du contrôle de la qualité du lait cru (décembre 2010). Mail vom 03.02.2011.
- Bühlmann G., Aebi R. & Glättli H., 1999. Wie PetriFoss und BactoScan 8000 die Keimbelastung von Hofabfuhr-Milch je nach Lagerungszeit und Temperatur beurteilen. Interner Bericht 37/1999, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft FAM, 50 p.
- BVET, 2010. Technische Weisung für die Durchführung der Milchprüfung. 14. März 2011, 13 p.
- Gerber D., Bühlmann G., Seelhofer N., Thürlemann P., Berger T. & Jakob E., 2007. Der MIBD - Rückblick auf eine zehnjährige Pionierleistung. *Agrarforschung* 14 (10), 496–501.
- Glodé M., Gehrig P. & Falk M., 2011. Milchprüfung ändert auf 2011. Information BVET, 20.10.2010, 2 p.
- Pittet G., 2011. Kostenschätzung zusätzlicher separater Sammeltouren bei Sammelstellen mit zweitägiger Anlieferung. Information Suisse lab, Sitzung Milchprüfungskommission, 9. September 2011, 2 p.