



LA LETTRE

N° 0

DE

CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 84.73.63.00 TELECOPIE : 84.37.37.81

Rédaction achevée le 4 Octobre 1991

Equipe rédactionnelle :

O. LERAY, R. GRAPPIN, R.M. OLID, A. BAPTISTE

EDITORIAL

Les entreprises européennes, quelles qu'elles soient, affrontent en cette période pré-européenne le choc de la qualité. A l'ouverture du Marché Unique en 1993, chaque pays et chaque entreprise décidés à prospérer dans les nouvelles règles du marché devront avoir su ajuster leur fonctionnement et leur système de production à des règles strictes d'assurance qualité permettant de garantir aux consommateurs une qualité de produit ou de prestation équivalente en tous points de la CEE.

Les laboratoires laitiers, tout comme les entreprises laitières ne peuvent échapper à ce mouvement et des systèmes de contrôle qualité sont mis en place peu à peu pour vérifier et garantir la validité des résultats d'analyse qu'ils fournissent.

CECALAIT s'est fixé pour mission de participer à la mise en place de l'assurance qualité dans les laboratoires laitiers en proposant aux laboratoires et aux entreprises les outils nécessaires : contrôle de la qualité par des essais inter-laboratoires, aide à l'auto-contrôle ou à l'étalonnage au moyen d'échantillons à teneur garantie, évaluation de matériel pour être à même de bien informer et conseiller les utilisateurs potentiels, information sur les méthodes d'analyse afin de permettre aux laboratoires d'optimiser leur choix de matériel et de méthodes d'utilisation.

Dans cette mission, CECALAIT n'entend pas agir seul, mais compte sur la participation des différents laboratoires laitiers, lesquels sont vivement sollicités pour adhérer à l'association.

C'est un premier objectif de ce numéro 0 de La lettre de CECALAIT que d'inviter organismes, entreprises, laboratoires ... impliqués dans les analyses laitières à s'associer à CECALAIT.

La lettre de CECALAIT se veut un outil d'information à l'usage des adhérents de l'Association. Elle se propose de présenter des fiches méthodologiques, des fiches d'évaluation de la précision des méthodes d'analyse, des informations sur les nouvelles techniques apparaissant sur le marché, de courts compte-rendus de manifestations spécialisées, les rendez-vous importants (formations, salons, congrès...) à retenir... et reste à l'écoute de toutes vos suggestions complémentaires.

Dans ce premier bulletin, vous trouverez la description des procédures de validation de l'AFNOR et d'autorisation d'emploi du Ministère de l'Agriculture (les procédures propres à d'autres organismes vous seront rapportées dans un prochain numéro), des fiches d'évaluation d'appareils récemment autorisés, une information sur une nouvelle méthode de dosage des protéines du lait et la rubrique "Rendez-Vous".

Gageons que La Lettre de CECALAIT saura capter votre intérêt et le garder!

VALIDATION DES METHODES D'ANALYSE PAR L'AFNOR

La validation d'une méthode rapide d'analyse par l'AFNOR est une procédure, initiée en 1988, qui atteste que les résultats obtenus par la méthode validée sont comparables à ceux des méthodes officielles ou normalisées correspondantes.

- Elle donne aux fournisseurs la possibilité de voir leurs produits testés et analysés par des experts reconnus.
- Elle garantit aux utilisateurs que les performances et la fiabilité de la méthode rapide sont conformes aux indications données par le fournisseur.
- Elle favorise une reconnaissance internationale entre organismes concernés.

DEROULEMENT DES OPERATIONS :

- * étude préliminaire faite par un laboratoire expert indépendant choisi par le fabricant, importateur ou distributeur demandeur, et accepté par le Bureau Technique de Validation de l'AFNOR.
- * dossier de demande de validation à l'AFNOR.
- * présentation des conclusions de l'étude préliminaire par le laboratoire expert, devant le Bureau Technique.
- * suivant la décision du Bureau Technique, étude collaborative organisée et suivie par le laboratoire expert.
- * examen du rapport final par les membres du Bureau Technique.
- * décision de validation, ou non, par l'AFNOR.

Cette validation peut être provisoire et doit alors être confirmée après une durée déterminée.

*attribution d'une attestation de validation (disponible à l'AFNOR) au demandeur qui peut en faire état dans ses documents, - publicitaires, en particulier -.

Le titulaire de l'attestation de validation doit cependant garantir en permanence la conformité de la méthode aux critères de validation, ce qui suppose entre autres que le fabricant ait mis en place un système d'assurance qualité. Ces deux points sont régulièrement surveillés :

- par des laboratoires officiels qui comparent les résultats de la méthode officielle et de la méthode rapide

- par des audits du système d'assurance qualité du fabricant organisés par l'AFNOR.

Toute modification matérielle ou technique concernant la méthode et susceptible d'affecter ses performances doit être signalée à l'AFNOR qui juge de la nécessité ou non d'effectuer des expertises complémentaires.

METHODES VALIDEES RECEMMENT

- 3M Petrifilm : flore totale et coliformes pour le lait (Décembre 1989).

Il s'agit d'un film sec rehydratable (double film enduit de produits deshydratés) : le film inférieur est le support du milieu de culture et contient un agent gélifiant soluble dans l'eau froide; le film supérieur contient un agent gélifiant et un indicateur coloré pour repérer la croissance des colonies, il permet aussi le piégeage du gaz dégagé lors de la fermentation du lactose par les coliformes.

(Voir les articles de PITON et RONGVAUX-GAIDA, Lait, 1990, Vol. 70, p. 345-355; PITON et GRAPPIN, J. Ass. Off. Anal. Chem., 1991, Vol. 74, N°1, p. 92-104)

- TRANSIA : test de détection des entérotoxines des staphylocoques (30 Mai 1991).

Il est basé sur une technique immuno-enzymatique ELISA sandwich qui permet grâce à des séries de 6 puits sensibilisés chacun avec un anticorps monoclonal de détecter respectivement les entérotoxines A, B, C1,2,3, D et E.

- UNIPATH : Salmonella Rapid Test (30 Mai 1991)

Il permet la détection des Salmonella mobiles. Les échantillons homogénéisés et préenrichis sur un milieu adapté sont inoculés dans un récipient de culture contenant un milieu spécial pour Salmonella et deux tubes. Ceux-ci contiennent chacun un milieu sélectif dans leur partie basse et un milieu indicateur dans leur partie haute, séparés par un filtre poreux. Les Salmonella migrent activement à travers le milieu sélectif inférieur vers le milieu supérieur où leur présence entraîne un changement de couleur.

AUTORISATION D'EMPLOI DELIVREE PAR LE MINISTERE DE L'AGRICULTURE CONCERNANT LES METHODES RAPIDES DE DOSAGE UTILISEES POUR LE PAIEMENT DU LAIT

L'autorisation d'emploi, à la place des méthodes officielles, de nouvelles méthodes chimiques ou microbiologiques dans le cadre du paiement du lait (concernant donc les MG, MP, flore totale et cellules) est du ressort de la Commission Scientifique et Technique (CST) du Ministère de l'Agriculture. Celle-ci a été créée en application de la loi du 16/11/1970 et de l'arrêté du Ministère de l'Agriculture du 06/01/1971. Elle comprend 6 membres représentant l'Administration et 6 membres nommés par la Profession; la présidence et le secrétariat étant assurés par le Bureau "Maîtrise sanitaire seconde transformation" du Service Vétérinaire d'Hygiène Alimentaire de la DGAL. Sa fonction est de :

- contrôler les conditions d'application de la loi au niveau des laboratoires d'analyse
- définir les conditions d'autorisation d'emploi de nouvelles méthodes

DEROULEMENT DES OPERATIONS :

* Les laboratoires interprofessionnels font une demande auprès de la CST pour utiliser une nouvelle technique dans le cadre du paiement du lait.

* La CST demande des essais d'évaluation auprès de laboratoires experts (CECALAIT et/ou la Station de Recherche en Technologie et Analyses Laitières de l'INRA à Poligny, par exemple).

* Les résultats des essais sont présentés devant la CST qui examine le principe et les caractéristiques analytiques (répétabilité, justesse, limite de détermination de la méthode ou de l'appareil...).

* Si les critères analytiques sont jugés acceptables et si, de plus, la méthode est intéressante au niveau technico-économique pour les laboratoires interprofessionnels, elle devient autorisée dans le cadre du paiement du lait.

* Le fournisseur doit ensuite faire évaluer sa méthode par deux laboratoires interprofessionnels qui en établissent les performances technico-économiques.

* La CST rédige une norme d'utilisation de la technique, méthode ou matériel nouveaux où sont spécifiés les caractéristiques analytiques, le calibrage, le système d'assurance qualité à utiliser...

Les modifications susceptibles d'affecter les performances de la méthode doivent être signalées à la CST qui juge de la nécessité ou non d'effectuer des expertises complémentaires.

AUTORISATIONS RECENTES

APPRECIATION DE LA QUALITE BACTERIOLOGIQUE DU LAIT.

- **BACTOSCAN 8000 de la Société FOSS ELECTRIC** : autorisation d'emploi confirmée pour cette version du Bactoscan en Août 1990.

Il remplace l'ancienne version du Bactoscan, commercialisé en France depuis 1983 par la Société Foss Electric et autorisé d'emploi pour le paiement du lait depuis Août 1985. Si le principe de comptage est resté inchangé (microscopie épifluorescente), les améliorations techniques, comme l'équipement informatique, la simplification des circuits, la réduction des consommables, ont permis une augmentation de la cadence de passage des échantillons (80 éch/h), et une diminution du seuil de détermination.

Le Bactoscan 8000 a été testé par l'INRA au laboratoire de Ceyzériat (Ain), afin d'évaluer ses nouvelles caractéristiques analytiques.

L'évaluation des caractéristiques analytiques de cet appareil vous est présentée dans ce numéro.

- **COBRA 2024L de la société BIOCOM** : autorisé en plusieurs étapes de Juin 1990 à Avril 1991.

Il s'agit d'une automatisation de la technique DEFT, consistant à effectuer un comptage microscopique (microscopie à épifluorescence) des bactéries retenues sur une membrane. Ses caractéristiques analytiques vous seront présentées dans le prochain numéro de notre Lettre.

METHODES DE DOSAGE DES PRINCIPAUX COMPOSANTS DU LAIT

- **GALAXY MI 600 de la société AEGYS** : autorisé d'emploi depuis le 4 Juillet 1991.

Le Galaxy MI 600, développé par la Société Aegys au cours des années 1989-1991, est un analyseur automatique destiné à déterminer en routine la composition chimique du lait, par le biais d'une technologie nouvelle : la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). La méthode d'analyse reste néanmoins identique à celle qui est utilisée par les appareils actuels Milko-Scan et Multispec, à savoir, mesure de la différence d'absorbance aux 4 longueurs d'onde caractéristiques de la

matière grasse (3,4 et 5,7 μm), des protéines (6,5 μm) et du lactose (9,6 μm), par rapport à des longueurs d'onde de référence. Son originalité réside en fait dans la mise en oeuvre d'une optique interférométrique par opposition aux optiques dispersives utilisées jusqu'à présent.

L'appareil a fait l'objet de 3 séries d'essais par CECALAIT, afin d'évaluer ses caractéristiques analytiques, uniquement pour le dosage de la matière grasse et des protéines.

L'évaluation des caractéristiques analytiques de cet appareil vous est présentée dans ce numéro.

EVALUATIONS

NUMERATION AUTOMATIQUE ET RAPIDE DES BACTERIES DU LAIT CRU A L'AIDE DU BACTOSCAN 8000

Rappel du principe :

les échantillons de lait subissent un traitement chimique de façon à isoler la flore microbienne des autres éléments du lait et à la concentrer; les bactéries sont alors colorées à l'acridine orange, et comptées à l'aide d'un microscope à épifluorescence fonctionnant en continu.

Caractéristiques analytiques :

* Contamination d'un échantillon par l'autre : 0,16%.

* Seuil de détermination : 10^4 UFC/ml.

* Justesse :

équation de calibrage :

$$\log(\text{REF}) = -0,1619 \times (\log(\text{BS}))^2 + 2,3921 \times \log(\text{BS}) - 3,2313$$

écart-type résiduel $S_{y,x} = 0,2765 \log \text{UFC/ml}$

$r = 0,84$ (pour des échantillons compris entre 10^4 et 5.10^5 UFC/ml)

* Répétabilité :

(GRSD : écart-type relatif géométrique de répétabilité)

Niveau en UFC/ml $\times 10^3$	GRSD % UFC/ml
<10	35,5
10-15	23,6
15-25	19,7
25-50	12,4
50-100	8,4
100-250	3,5
>250	1,2

* Stabilité de l'appareil au cours du temps :
GRSD de reproductibilité < 20 % UFC/ml

(voir aussi l'article de DASEN et al. à paraître dans Lait, 1991, Vol. 71, N°6)

DOSAGE DES PRINCIPAUX COMPOSANTS DU LAIT EN MOYEN INFRA-ROUGE A L'AIDE DU GALAXY MI 600

Rappel du principe :

Les appareils de dosage en moyen infra-rouge dosent la matière grasse, les protéines et le lactose par absorption de la lumière à des longueurs d'onde spécifiques de liaisons ou de groupements caractéristiques des composants dosés. La perte d'énergie, mesurée lors de la traversée du lait par un faisceau d'une longueur d'onde donnée est liée au nombre de ces liaisons, lui-même proportionnel à la quantité de la substance dosée.

Caractéristiques analytiques :

* Justesse :

Etalonnage sur 4 canaux : FatA, FatB, Protéines, Lactose.

Ecarts-types (g/kg) de la précision d'estimation du TB et du TP

ESSAIS	Laits	n	MG	MP
CECALAIT (Mars 1991)	Individuels troupeaux calibrage (*)	30	0,49	0,39
		17	0,24	0,28
		11	0,21	0,13
AEGYS	Individuels	39	0,50	0,37

(échantillons reconstitués selon la méthode O. Leray 1989)

* répétabilité :

(S_r : écart-type de répétabilité en g/kg)

Laits	n	MG	MP
Troupeaux	40	0,088	0,112
	40	0,106	0,111
Individuels	40	0,135	0,115
	35	0,150	0,095

LU POUR VOUS

BARBANO, D.M., LYNCH, J.M. and FLEMING, J.R. Direct and indirect determination of true protein content of milk by Kjeldahl analysis : collaborative study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1991, Vol. 74, N°2, p. 281-288

Dans tous les pays laitiers, sauf en France, les protéines du lait sont définies par la teneur en azote total (NT), obtenue après minéralisation Kjeldahl, multipliée par 6,38. Les résultats obtenus ainsi surestiment le contenu protéique réel, puisqu'ils prennent en compte la fraction azotée non protéique (NPN) du lait.

Dans cette étude, Barbano et al. ont testé une procédure standardisée par l'AOAC pour la mesure du NPN et pour celle des protéines vraies par différence entre NT et NPN (x 6,38). Cette dernière utilisant la méthode de Rowland (1938) est identique à celle décrite par le JO du 27/10/1983. Elle est relativement longue car elle nécessite deux dosages d'azote (NT et NPN). Pour simplifier la détermination du taux de protéines (protéines vraies), les auteurs ont développé une technique originale de dosage direct.

La préparation des échantillons repose sur un fractionnement des composés azotés du lait par le TCA avant le dosage de l'azote de ces fractions par la méthode Kjeldahl. Pour la méthode directe, ce fractionnement a lieu directement dans le matras utilisé pour l'analyse Kjeldahl, au lieu de se faire dans une fiole jaugée comme dans la méthode classique. Le précipité trichloracétique est lavé puis récupéré sur filtre sans azote; le tout étant réintroduit dans le matras pour être minéralisé.

La précipitation dans le matras permet de récupérer la totalité des protéines, car il reste toujours quelques traces de précipité adhérent aux parois du récipient. De ce fait, on obtient, par un seul dosage d'azote la teneur en protéines vraies du lait.

Les auteurs ont comparé cette technique directe à la technique indirecte (NT - NPN x 6,38).

Les caractéristiques analytiques de ces méthodes ont été évaluées au cours d'essais interlaboratoires entre 10 laboratoires recevant chacun 9 échantillons en double aveugle.

résultats

dosage	NPN	protéines méthode indirecte	protéines méthode directe
r	0,016	0,040	0,024
S _r	0,006	0,014	0,008
RSD _r	2,817%	0,483%	0,285%
R	0,033	0,088	0,059
S _R	0,012	0,031	0,021
RSD _R	5,707%	1,051%	0,702%

résultats exprimés en (g d'azote/100 g) x 6,38, dans le lait

r : répétabilité

S_r : écart-type de répétabilité

RSD_r : valeur relative de l'écart-type de répétabilité

R : reproductibilité

S_R : écart-type de reproductibilité

RSD_R : valeur relative de l'écart-type de reproductibilité

Méthodes indirecte et directe sont bien corrélées. Cependant, reproductibilité et répétabilité sont meilleures pour la méthode directe et celle-ci demande environ moitié moins de travail d'analyse au laboratoire que la méthode indirecte.

L'AOAC a adopté (first action approval) les 3 méthodes décrites (la méthode indirecte constituant une alternative à la méthode directe, lorsque, par exemple un dosage de l'azote NPN est expressément demandé).

Cette technique directe devrait être étudiée et reprise par la FIL.

RENDEZ-VOUS

18-20 MAI 1992 à SONTHOFEN ALLEMAGNE

Séminaire international sur "L'assurance Qualité Analyses" et les "Bonnes Pratiques de Laboratoire" dans les laboratoires laitiers.

organisé par la FIL, l'AOAC, la Commission des Communautés Européennes, le Comité National Allemand de la FIL.