

LES DISPOSITIONS QUALITE POUR LA PRODUCTION DE MATERIAUX DE REFERENCE SECONDAIRES (ETG) Cecalait®

Actilait (l'institut technique du lait et des produits laitiers) propose depuis un grand nombre d'années des matériaux de référence externes (ETG) avec une finalité d'étalonnage ou de contrôle de méthode en chimie et en microbiologie, sous sa marque Cecalait®.

Dans le cadre du contrôle qualité des méthodes analytiques, les matériaux de référence secondaires sont des outils très complémentaires des essais d'aptitude pour assurer la qualité des déterminations par les laboratoires.

Pour satisfaire à cet objectif, ces matériaux de référence secondaires (ou échantillons à teneur garantie : ETG) doivent avoir été réalisés selon un ensemble de dispositions qualité très strictes :

- Dès le départ, pour les ETG sur la matrice lait, le lait prélevé doit être choisi et subir des traitements pour éviter toute altération physique en vue d'assurer sa qualité et sa bonne conservation.
- La détermination des valeurs assignées est le point clé de ce processus. Elle est réalisée par des laboratoires « experts », rigoureusement suivis par le comité de surveillance qualité (CSQ). De plus, tout un ensemble de dispositions techniques complémentaires permet d'assurer la qualité de la valeur assignée transmise aux laboratoires utilisateurs.
- Enfin, le transport express dans des conditions bien définies permet de finaliser ce processus.

Un matériau de référence se définit comme un matériau (échantillon) dont une ou plusieurs des propriétés sont suffisamment connues et définies.

Plusieurs types de matériaux de référence existent:

- **les matériaux de référence externes (MRE)** dont la valeur assignée par analyte est déterminée par essai interlaboratoire,
- **les matériaux de référence internes (MRI)** dont la valeur assignée est établie par l'utilisateur (comparaison à la valeur du MRE, solutions pures ...).

Les matériaux de référence Cecalait® proposés par Actilait (Echantillons à teneurs garanties ou ETG) sont des matériaux de référence externes (MRE). Deux grands types d'échantillons sont proposés, suivant leur finalité :

① **Etalonnage d'un instrument de mesure** : dans ce cas, les échantillons sont souvent pluri-niveaux couvrant l'ensemble du domaine d'application de la méthode. Ils servent à établir la fonction d'étalonnage (le plus souvent suivant un modèle linéaire) entre l'appareil et la référence. Dans le cadre du contrôle qualité associé à l'ajustage, le laboratoire procédera ensuite à une étape de vérification (à l'aide d'échantillons spécifiques ou non) et à un examen des paramètres statistiques de la fonction d'étalonnage (pente, écart-type des écarts, écart-type résiduel de régression...).

Pour les ETG Cecalait®, c'est le cas des échantillons noir amido cellules somatiques, lipolyse pour la méthode aux savons de cuivre, urée, cryoscopie et infra-rouge gamme médiane et haute (pré-calibrage).

② **Contrôle qualité des mesures** : Les échantillons sont dans ce cas majoritairement mono-niveau. Suite à l'analyse du matériau par le laboratoire, le résultat obtenu est comparé à la valeur de référence et le laboratoire interprète l'écart observé à la tolérance (suivi par des cartes de contrôles type Shewhart, confrontation à une tolérance fixée à priori, calculée selon le principe de la différence critique à 95 %).

Dans le cadre des ETG Cecalait®, on retrouve selon la matrice ou le domaine :

- Lait : méthode chimique (Gerber, Kjeldahl, matière sèche...),
- Beurre et fromage sur des critères de composition (matière sèche / humidité, matière grasse, azote, chlorure...),
- Microbiologie : microorganismes à 30 °C, staphylocoques à coagulase positive et *Escherichia coli*.

La production et la détermination de ces échantillons sont soumises à un ensemble de dispositions tout au long des différentes phases de leur réalisation.

On peut décomposer celle-ci en trois grandes étapes :

- 1- la préparation des échantillons,
- 2- la détermination des valeurs assignées,
- 3- l'envoi aux clients.

1- La préparation des échantillons :

D'un point de vue général, pour la physico-chimie, les échantillons sont préparés en interne soit à partir de lait (préservé avec du bronopol) ou de produits laitiers, soit préparés en externe dans des unités industrielles pilotes. Pour la microbiologie, les échantillons sont préparés à base de lait et ensuite lyophilisés pour assurer leur stabilité .

◆ pour la physico-chimie :

• En ce qui concerne les échantillons préparés avec du lait cru, le lait doit être de bonne qualité bactériologique, d'une part, et d'autre part il ne doit avoir subi aucun traitement physique, susceptible de l'altérer, comme le pompage, le refroidissement, le réchauffage... Dans la pratique, il s'agira donc toujours de lait de petit mélange, d'une seule traite, non refroidi et prélevé directement à la fromagerie lors de la coulée.

De même, toutes les opérations de pré-traitement ne doivent pas altérer le lait ou ses composants. Un matériel adapté permet donc de procéder aux opérations de transfert par soutirage, de séparation des constituants par micro-ou ultra-filtration.

Des traitements de stabilisation supplémentaires peuvent le cas échéant être appliqués sur certains critères (traitement thermique pour les échantillons lipolyse par exemple).

• Pour les autres matrices (beurre, fromage), l'approvisionnement auprès d'ateliers pilotes doit être tel que les échantillons soient réceptionnés dans leur conditionnement final. Les pilotes auront été choisis de façon à assurer l'homogénéité des lots envoyés aux laboratoires (essai réalisé dans la phase de faisabilité des échantillons).

• Le principe de la distribution en flacons est d'assurer la qualité du lait (et notamment de la matière grasse) tout en garantissant l'homogénéité du lot produit. Pour le lait, les mélanges initiaux sont distribués en flacons, sous agitation magnétique constante, sans interruption et en l'absence de toute incorporation d'air, par soutirage naturel par gravité. Les flacons utilisés dans ce cadre sont équipés de bouchons jointés (tri-seal) pour assurer une étanchéité et sont remplis en ne laissant qu'une bulle d'air pour éviter les phénomènes de barratage pouvant se produire.

◆ pour la microbiologie :

• Pour les échantillons en microbiologie, le traitement choisi doit répondre à 2 objectifs : garantir l'homogénéité entre flacons d'une part, et obtenir des échantillons représentatifs d'un échantillon naturel d'autre part (la diversité des flores notamment) pour assurer une transférabilité des résultats obtenus sur les échantillons de routine.

• Pour la préparation des ETG pour la numération des microorganismes à 30°C, du lait cru provenant de différents producteurs, donc contenant une flore naturelle et variée, est utilisé. Pour la numération des Staphylocoques et *E. coli* les ETG sont préparés à partir de lait stérilisé contaminé par ces 2 types de souches et des flores associées, toutes isolées à partir de produits laitiers.

• Le diagramme de lyophilisation ainsi que le protocole de réhydratation ont été étudiés afin de ne pas altérer les bactéries et de permettre leur revivification avant analyse.

- Les contrôles d'homogénéité

Des tests d'homogénéité sont réalisés à l'aide d'analyseurs de routine : Analyseur infra rouge pour le lait (sur le critère matière grasse), compteur de germes en cytométrie de flux pour les critères microbiologiques, compteur cellulaire pour les cellules somatiques. Ces contrôles ne sont pas réalisés systématiquement sur tous les lots produits.

2- La détermination des valeurs assignées

Les valeurs assignées (de référence) sont obtenues par un essai interlaboratoire spécifique à cet usage et intégrant de 4 à 5 laboratoires experts (suivant les critères).

Ces laboratoires experts ont été choisis au départ au regard de leur accréditation ISO 17025 pour les critères considérés (quand ceci est possible) puis sont suivis annuellement selon un cahier des charges très précis :

- Participation minimale à deux essais d'aptitude par an (dont 1 Cecalait® au minimum) avec un niveau de performance minimum de 75 % (3 essais sur 4 dans les tolérances admises).
- Prise en compte des résultats du laboratoire dans le calcul de la valeur assignée dans 75 % des cas au minimum.

Tous les ans, le comité de surveillance qualité de l'activité Cecalait® de Actilait (CSQ) statue sur la reconduction ou la non reconduction des laboratoires experts sur la base des résultats de 2 années « glissantes » au regard du cahier des charges.

En cas de non reconduction, le laboratoire est informé et un nouveau laboratoire expert est recherché sur le critère considéré.

Dans le cadre de la détermination de la valeur assignée, les laboratoires experts du critère considéré reçoivent les échantillons pour analyse. Un ensemble de dispositions qualité sont intégrées suivant les critères et les matrices :

- Analyse en double (Gerber, matière sèche, azote...),
- Analyse d'un lot du mois M-1 (avec codification en aveugle des échantillons du mois M et du mois M-1),
- Analyse d'un témoin de stabilité (matière grasse par extraction),
- Analyse de solutions pures (Kjeldahl...),
- Vérification instrumentale des résultats (lipolyse, cellules somatiques...).

Pour chaque disposition, les tolérances sont précisément formalisées (écart entre double maximum, tolérance par rapport aux échantillons M-1, % de recouvrement des solutions pures...).

Une sélection des laboratoires est tout d'abord réalisée sur la base des contrôles qualité ci-dessus. La moyenne des résultats des laboratoires retenus est réalisée (après élimination le cas échéant des résultats « nuisant à la symétrie »).

Dans le cas de certains échantillons d'étalonnage (lipolyse, urée, cellules somatiques), une linéarisation des teneurs des différents niveaux est réalisée en fonction des facteurs de dilution utilisés (mélange d'une base « riche » et d'une base « pauvre »).

Pour être validée comme étant la valeur assignée, la moyenne ainsi calculée doit répondre à deux critères supplémentaires : un nombre minimum de résultats pris en compte et une étendue maximale des résultats (sous la forme d'un écart type de série). Ces dispositions de « nombre minimum de résultats » et « d'écart type maximal » sont formalisées pour chaque ETG dans la documentation qualité.

Dans le cas contraire (non satisfaction d'une ou l'autre des dispositions), les échantillons sont renvoyés pour analyse aux laboratoires experts (2^{ème} série analytique).

Le calcul de la valeur assignée est ensuite repris comme ci-dessus en intégrant les résultats des deux séries analytiques.

A l'issue de cette détermination, un certificat est émis pour ce matériau indiquant la ou les valeur(s) assignée(s), l'incertitude associée (dans la majorité des cas) et la date limite d'utilisation.

3- L'envoi aux clients :

Suivant les matrices et les critères, les ETG présentent des modalités d'emballage spécifiques :

- Cartons,
- Boîtes polystyrène munies ou non de glace.

Ces dispositions sont établies très précisément (type de contenant, présence ou non de glace et nombre de packs en fonction du contenant) pour chaque type d'ETG.

Les échantillons sont ensuite envoyés en « express » pour livraison le lendemain avant 12 H pour la France, le lendemain en journée pour la majorité des pays de l'UE et enfin avec des délais de 2 à 3 jours pour les pays hors UE (suivant les pays).

Seul le respect de l'ensemble de ces dispositions permet de garantir la qualité des échantillons et des valeurs assignées associées transmises aux laboratoires. Ainsi, leur utilisation permettra de contribuer avec efficacité au processus de maîtrise de la qualité des résultats.