



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

janvier 1992

# LA LETTRE

# N° 1

# DE

# CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 84.73.63.00 / 84.73.63.19 TELECOPIE : 84.37.37.81

Rédaction achevée le 27 Janvier 1992

Equipe rédactionnelle :

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

## COMPTE-RENDU DE LA REUNION D'INFORMATION SUR CECALAIT DU 8 OCTOBRE 1991

Une cinquantaine de personnes, venant de toute la France et représentant les laboratoires laitiers, les organismes officiels et les fabricants de matériels et réactifs se sont réunies à cette occasion et ont pu avoir une information détaillée ainsi qu'une réponse aux questions qu'elles pouvaient se poser sur l'origine, le rôle et les travaux de CECALAIT, et sa situation dans le contexte de l'assurance-qualité aux niveaux national et européen.

Après quelques mots de bienvenue dans ses locaux, M ADDA, directeur scientifique des Industries Agricoles et Alimentaires à l'INRA, Messieurs SACHOT et GRAPPIN (président et secrétaire de CECALAIT) ont expliqué comment la discussion et la réflexion autour des besoins croissants des laboratoires d'analyse (volume et développement croissants des analyses, techniques rapides, accréditation des laboratoires...) a abouti à la création en Août 1990 de CECALAIT par l'INRA, le CNIEL et l'ITEB. Les services officiels (DGCCRF, DGAL) étant également partie prenante, font partie du Conseil d'Administration de CECALAIT.

M. LERAY, directeur de CECALAIT, a alors présenté les personnes travaillant à l'association : lui-même, ingénieur physico-chimiste, un ingénieur microbiologiste (P. RINGLE), une technicienne à plein temps (R.M. OLID), une autre à mi-temps (S. BARTHET) et un ingénieur documentaliste à mi-temps (A. BAPTISTE). Une secrétaire à mi-temps (O. VIEILLE) nous a rejoints depuis lors. Il a ensuite présenté les travaux réalisés et en cours. CECALAIT avait, au mois d'Octobre organisé quatre chaînes d'intercomparaison pour le dosage de la matière grasse (Gerber, extraction), des protéines (Noir Amido), de l'azote (Kjeldahl), du lactose (méthode enzymatique et autres méthodes) et du point de congélation du lait.

Depuis se sont mises en place d'autres chaînes d'analyses physico-chimiques pour le dosage de la lipolyse (nous y reviendrons dans ce numéro), de la matière grasse dans la crème et le lait homogénéisé et une chaîne d'analyses microbiologiques : germes totaux et coliformes (sur laquelle nous reviendrons également).

Ces chaînes continueront à être développées cette année. Des projets sur l'analyse chimique du fromage et sur l'estimation des spores butyriques sont également prévus pour 1992. Est également en cours, la mise en place d'une base de données sur les techniques analytiques laitières.

CECALAIT assure également, en collaboration avec le Laboratoire Départemental d'Analyses de Poligny, la fourniture d'échantillons de lait à teneur garantie pour les méthodes Gerber et Noir Amido, et, depuis cette année, pour la méthode Kjeldahl et pour le dosage de la matière grasse par extraction éthéro-ammoniacale ou éthéro-chlorhydrique.

CECALAIT intervient enfin pour du conseil et de la formation en entreprise et participe à des essais d'évaluation des caractéristiques analytiques d'appareils nouveaux (nous avons déjà présenté quelques fiches d'évaluation liées à cette activité et continuerons à le faire).

Mme MATHERAT (DGAL) et M HULAUD (DGCCRF) sont alors intervenus en citant les actions entreprises par les services officiels dans le domaine de l'assurance-qualité (mallette pédagogique pour la formation de formateurs en assurance-qualité, système-expert d'aide à l'évaluation d'un laboratoire) et ont souligné le rôle de CECALAIT dans ce domaine.

M DUPRIEZ (RNE) a ensuite expliqué le déroulement d'une procédure d'accréditation type RNE et précisé le rôle important de CECALAIT dans la mise en place d'un plan d'assurance-qualité et dans l'obtention de l'accréditation.

Enfin Mme LABORDE (INRA DIAA) a insisté sur l'importance de raisonner "européen" en matière d'assurance-qualité, préoccupation de CECALAIT, qui va, en collaboration étroite avec l'INRA de Poligny, animer un réseau européen de laboratoires et reprendre les essais d'intercomparaison européens qui avaient déjà eu lieu l'an passé.

L'élection des représentants des adhérents de CECALAIT au Conseil d'Administration et Comité Scientifique s'est déroulée à la fin de la réunion.

Rappelons que CECALAIT compte actuellement 41 adhérents.

Ont été élus MM VAN BAAR (Laboratoire Interprofessionnel LABILAIT Amiens) et TROSSAT (ITG Rioz), comme représentants des membres associés au Conseil d'Administration, et Mme IMBERT (FROBEL Vendôme) pour représenter les laboratoires d'entreprise au Comité Scientifique.

### BREF BILAN DES CHAINES D'INTERCOMPARAISON (PHYSICO-CHIMIE) 1990-1991

Un tel bilan est utile alors que CECALAIT vient d'organiser sa 5e série de chaînes d'analyses d'intercomparaisons concernant six dosages physico-chimiques dans le lait : matière grasse (Gerber, extraction), protéines (Noir Amido), azote (Kjeldahl), lactose (méthode enzymatique et autres méthodes), point de congélation.

Le nombre de participants aux différentes chaînes est globalement stable, bien que l'impact des périodes de congés d'été soit perceptible. :

- de 60 à 74 pour le dosage de la matière grasse par la méthode GERBER

- de 10 à 28 pour le dosage de la matière grasse par extraction éthéro-ammoniacale ou éthéro-chlorhydrique
- de 46 à 61 pour le dosage des protéines par la méthode Noir Amido
- de 37 à 51 pour le dosage de l'azote par la méthode Kjeldahl
- de 10 à 21 pour le dosage du lactose par différentes méthodes, dont une enzymatique
- de 28 à 38 pour la cryoscopie.

En ce qui concerne la qualité des résultats, un léger progrès semble se dessiner en ce qui concerne les critères de justesse. Il reste que globalement environ 60% des participants se situent hors des cibles "idéales" de conformité correspondant à la fois

aux possibilités des méthodes et à l'enjeu technico-économique lié aux résultats. Au point de vue répétabilité des résultats, il n'y a pas de tendance nette : de bonnes et de moins bonnes répétabilités se côtoient !

Des progrès dans la maîtrise des techniques analytiques apparaissent donc nécessaires. Toutefois, en nous basant sur les demandes de conseils et d'information qui nous sont faites, il nous semble qu'il y a globalement une prise de conscience de la nécessité d'appliquer rigoureusement les modes opératoires et de se référer à des textes normalisés; ceci débouchera à terme sur une meilleure maîtrise des méthodes. Les chaînes d'analyse doivent donc être utilisées comme un outil d'alerte et de recadrage, à relier à la méthodologie suivie. Rappelons que l'équipe de CECALAIT est à votre disposition pour tout conseil et recherche d'anomalies !

## COMMENTAIRES SUR NOS NOUVELLES CHAINES

### LA CHAINE "LIPOLYSE"

La lipolyse, dégradation enzymatique de la matière grasse du lait favorisée, en particulier, par l'agitation mécanique en présence d'air et des cycles de refroidissement et de réchauffement successifs du lait, provoque des défauts, parfois inacceptables, de goût dans le lait et les produits laitiers. Son incidence a tendance à augmenter depuis une vingtaine d'années, en liaison avec l'intensification de la production laitière. Actuellement, son impact financier est loin d'être négligeable puisque dans certaines régions, un taux de 0,9 meq d'acides gras libres pour 100 g de matière grasse (0,9 meq AGL/100 g MG), dans le lait entraîne une baisse de 2 cts sur le prix du litre de lait.

Afin de disposer d'outils de dosage adéquats, une chaîne d'intercomparaison a été organisée en collaboration avec l'URCIL (Carhaix 29), qui s'intéresse depuis longtemps à ce problème.

A cet effet, l'URCIL a préparé, à partir de laits de tanks, éventuellement maturés, des échantillons de lait, contenant entre 0,3 et 2 meq d'AGL/100 g MG, qui ont été envoyés aux 24 participants au mois de novembre 1991.

Les participants avaient le choix entre deux méthodes de dosage : la méthode BDI et la méthode aux savons de cuivre.

Les résultats ont été traités, ensemble ou séparément pour les deux méthodes.

En ce qui concerne la répétabilité et la justesse, les résultats obtenus par les laboratoires utilisant la méthode BDI sont assez satisfaisants. Il en est de même pour la répétabilité de la méthode aux savons de cuivre. En revanche, pour cette méthode, on constate une hétérogénéité des résultats. Deux "cibles de conformité" ont ainsi été définies : l'une, relativement tolérante, tient compte des performances des participants et englobe donc une proportion satisfaisante des laboratoires (47% restant cependant hors cible !), l'autre représente l'objectif que doivent se fixer les laboratoires et qui correspond aussi bien aux possibilités

de la méthode qu'à des critères économiquement valables. Dans ce cas, 71% des participants sont hors-cible. Cette méthode est donc imparfaitement maîtrisée, vraisemblablement pour des problèmes de prise d'essai et d'étalonnage des photomètres.

Nous espérons que la seconde chaîne verra des améliorations. De toutes façons, l'équipe est à votre disposition pour tout conseil.

### LA CHAINE "MICROBIOLOGIE"

Cette première chaîne a eu lieu en Novembre 1991 et concernait la numération des germes totaux et/ou des coliformes totaux, qui sont des critères importants en termes de santé publique et de paiement du lait. Ont participé à cette première chaîne, respectivement 37 et 45 laboratoires pour le dénombrement des germes totaux et des coliformes. Les laboratoires ont pu utiliser la méthode de leur choix.

Les données d'analyses microbiologiques imposent une transformation des résultats en logarithmes (décimaux) pour permettre un traitement statistique classique. Les écarts de justesse ainsi obtenus peuvent également être exprimés dans les données d'origine en écarts relatifs par rapport aux valeurs de référence. Les deux types de résultats ont été présentés aux participants.

Les critères de répétabilité et de justesse à satisfaire ont été définis d'après des valeurs trouvées dans la littérature récente pour les méthodes de référence, Spiral et Petrifilm.

Les résultats montrent une répétabilité et une justesse globalement assez satisfaisantes, avec 59% et 67% des participants en conformité avec les limites fixées (respectivement en numération des germes totaux et en numération des coliformes).

La multiplicité des méthodes ou des variantes contribue à la dispersion des écarts de justesse. Les participants ont pour l'essentiel utilisé des comptages sur boîtes de Petri, mais les milieux de culture varient (ce ne sont pas toujours ceux qui sont prévus par les normes). Dans quelques cas, un ensemencement Spiral est utilisé. Quelques participants ont également utilisé des Petrifilm ou un Bactoscan (8000).

Les sources principales d'erreur semblent cependant liées au non-respect des modes opératoires, en particulier en ce qui

concerne la constitution d'une gamme de dilution, le temps et la température d'incubation. Cependant, les sources "classiques" d'erreur : température de la gélose, incertitudes sur le volume délivré par les pipettes, agitation insuffisante, incertitude sur le diamètre minimum des colonies à compter... interviennent probablement aussi.

Rappelons une fois encore que l'équipe est à votre disposition pour tout conseil.

## POLITIQUE TARIFAIRE

Pour que CECALAIT continue à proposer et développer des services pour les laboratoires, notre Conseil d'Administration a décidé de rendre l'adhésion à CECALAIT plus attractive en modifiant la politique tarifaire pour 1992.

Pour les adhérents, les frais de participation aux chaînes restent pratiquement inchangés (au classique réajustement annuel de +5% près). Pour les participants non-adhérents, en revanche, les

tarifs sont majorés de 50% par rapport aux tarifs "adhérents". Sur le même principe, le tarif d'une prestation documentaire simple : recherche et fourniture de documents disponibles à CECALAIT (dans la limite de 25 photocopies) est fixé à 300F pour les non-adhérents et 200F pour les adhérents.

## VALIDATIONS NOUVELLES

L'AFNOR vient de valider (9 Janvier 1992) une méthode rapide pour la détection de *Clostridium tyrobutyricum*. Il s'agit du test ELISA de TRANSIA-DIFFCHAMB, qui permet l'estimation d'un seuil de contamination en spores viables au bout de 3j.

La réaction immuno-enzymatique de type sandwich utilise un mélange d'anticorps monoclonaux et polyclonaux. L'échantillon de lait à tester est incubé en milieu nutritif liquide qui permet la germination des spores, ainsi que la croissance et l'enrichissement du milieu en cellules végétatives. Après un choc thermique permettant la mise en évidence d'antigènes

spécifiques, celles-ci sont ensuite révélées par la réaction immunoenzymatique.

CECALAIT a participé en même temps que 12 autres laboratoires à l'étude collaborative de ce kit de détection, organisée par le laboratoire de microbiologie de l'ENILBIO Poligny. CECALAIT a effectué le traitement statistique final des résultats, présentés à la Commission de Validation par M BRANGER (ENILBIO). Nous vous donnerons de plus amples informations dès que des éléments chiffrés seront officiellement disponibles.

## EVALUATIONS

### NUMERATION DES BACTERIES DU LAIT CRU A L'AIDE DU COBRA 2024L

Le COBRA 2024L est né du besoin d'automatiser la technique DEFT dont le principe, mis au point en 1980, consiste à effectuer un comptage microscopique des bactéries retenues sur une membrane.

Le matériel "COBRA", conçu et commercialisé par la Société française Biocom, se décompose en trois modules : un poste de distribution-dilution, un système de filtration-coloration, un système de microscopie automatique et d'analyse d'images.

Après une première série d'essais à Poligny en Juin 1990, ce nouvel appareil a subi des modifications au niveau du matériel et

du protocole de traitement des échantillons afin d'améliorer ses performances. Une deuxième étude a permis d'évaluer les principales caractéristiques analytiques du COBRA 2024L.

Il est autorisé d'emploi par la Commission Scientifique et Technique du Ministère de l'Agriculture dans le cadre du paiement du lait depuis Avril 1991.

### Rappel du principe :

Le COBRA effectue un dénombrement des bactéries colorées à l'acridine orange, à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé d'un analyseur d'images.

## Caractéristiques analytiques :

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

\* Justesse :

équation de calibrage :

$$\log(\text{REF}) = 0,9742 \times \log(\text{COBRA}) + 0,1086$$

écart-type résiduel  $S_{y,x} = 0,398$  log UFC/ml

\* Répétabilité :

(GRSD : écart-type relatif géométrique de répétabilité)

| Niveau en UFC/ml $\times 10^3$ | GRSD % UFC/ml |
|--------------------------------|---------------|
| 10-15                          | 71            |
| 15-25                          | 74            |
| 25-50                          | 43            |
| 50-100                         | 40            |
| 100-250                        | 22            |
| >250                           | 15            |

## DOSAGE DE L'AZOTE PAR LA METHODE DUMAS

La méthode DUMAS est basée sur l'oxydation totale de l'azote par combustion en présence d'oxygène en excès suivie du dosage catharométrique de l'azote sous forme gazeuse après élimination des autres oxydes (de soufre et de carbone) et après réduction des oxydes d'azote en azote gazeux. Elle a été automatisée par divers fabricants de matériel et commence à être utilisée dans le domaine laitier.

CECALAIT a pu tester deux appareils : le MACRON d'HERAEUS, commercialisé par la société FOSS ELECTRIC, et le FP 428 de la société LECO.

Nous vous proposons, dans ce numéro 1 les caractéristiques de précision de l'appareil MACRON d'HERAEUS, mesurées sur différents produits.

L'évaluation du FP 428 vous sera proposée dans un prochain numéro

| produit           | composant             | répétabilité $S_r$ | moyennes       |       |         | équation observée<br>Kjel. = (Instr.).b + a | écart-type résiduel $S_{y,x}$ |
|-------------------|-----------------------|--------------------|----------------|-------|---------|---------------------------------------------|-------------------------------|
|                   |                       |                    | Kjeldahl $S_y$ | y     | Heraeus |                                             |                               |
| LAIT<br>n=10      | NT x 6,38<br>g MAT/kg | 0,096              | 2,73           | 34,89 | 35,48   | $y = 0,984x - 0,005$<br>(20 résultats)      | 0,18                          |
|                   | NS<br>g NI            | 0,009              | 0,015          | 0,135 | 0,217   | $y = 0,669x - 0,010$<br>(20 résultats)      | 0,01                          |
| POUDRE<br>n = 10  | NT<br>g N/100g        | 0,059              | 3,00           | 5,288 | 5,340   | $y = 1,0025x - 0,06$<br>(30 résultats)      | 0,05                          |
| FROMAGE<br>n = 12 | NT<br>g N/100g        | 0,035              | 0,09           | 4,486 | 4,696   | non significative                           | 0,06                          |
|                   | NS<br>mg N/100ml      | 1,50               | 59,4           | 97,62 | 99,01   | $y = 1,048x - 6,12$<br>(34 résultats)       | 2,56                          |
| SERUM<br>n = 10   | NT x 6,38<br>g MAT/l  | 0,149              | 1,12           | 10,68 | 11,07   | $y = 1,019x - 0,60$<br>(30 résultats)       | 0,18                          |

NT : azote total

MAT : matière azotée totale

NS : azote soluble

Kjel. : résultat obtenu par la méthode de Kjeldahl

(Instr.) : résultat donné par l'appareil

NB : les étalonnages ont été réalisés à partir d'acides aminés purs, cristallisés pour les produits solides, en solution pour les produits liquides, et aux teneurs attendues des produits.

## ASSURANCE-QUALITE EN ESPAGNE

Le 12 Décembre à Madrid s'est tenue une journée sur "l'évaluation externe de la qualité des laboratoires. Signification des essais inter-laboratoires", organisée par le Ministère de la Santé et de la Consommation espagnol. Outre des exposés généraux sur l'assurance-qualité réalisés par des représentants de différentes organisations espagnoles et communautaires (BCR), les organisateurs avaient souhaité que leur soient présentés, à titre d'exemple, les systèmes d'assurance-qualité

utilisés aux Pays-Bas, en Grande-Bretagne et France. A cette occasion, l'organisation de CECALAIT a été présentée aux participants à la Journée. A souligner que les laboratoires laitiers espagnols sont très demandeurs et que plusieurs d'entre eux adhèrent déjà à, ou sont clients de CECALAIT.

## HARMONISATION DES PROTOCOLES D'ESSAIS INTER-LABORATOIRES POUR L'EVALUATION DES LABORATOIRES

En Décembre 1991, l'IUPAC, l'ISO et l'AOAC ont proposé un projet commun de protocole pour l'organisation d'essais inter-laboratoires. Ces essais fournissent aux laboratoires qui sont engagés dans une politique d'assurance-qualité ou qui souhaitent le faire, une appréciation extérieure de leurs performances analytiques. Ce projet détaille le schéma d'organisation de chaînes d'analyse et fournit une procédure statistique pour l'exploitation des résultats. Il insiste tout particulièrement sur :

- les précautions d'homogénéité et de stabilité à prendre pour les échantillons fournis pour analyses
- les fréquences souhaitables (entre 2 semaines et 4 mois)
- l'utilisation préférentielle de méthodes validées
- l'estimation des valeurs de référence (les participants devraient être informés à ce sujet)

- l'envoi de tous les résultats à tous les participants avec une présentation claire, permettant de vérifier d'éventuelles erreurs au moment de l'envoi des résultats

- les relations à établir entre participants au moyen de bulletins ou rapports annuels ainsi que de réunions ouvertes périodiques

- les conseils à donner sur demande aux participants ayant eu des difficultés

Au niveau national, des projets comparables sont en discussion avec des partenaires comme l'AFNOR et la DGAL qui ont créé un groupe de travail auquel participe CECALAIT avec des représentants de la plupart des réseaux d'intercomparaison de laboratoires de l'agroalimentaire. Le résultat sera soumis à l'ISO pour l'élaboration d'un projet de norme dans ce domaine.

## RENDEZ-VOUS

Nous venons de recevoir le programme détaillé du Séminaire international sur "L'Assurance Qualité Analyses" et les "Bonnes Pratiques de Laboratoire" dans les laboratoires (18-20 MAI 1992, à SONTHOFEN, ALLEMAGNE)

Un programme détaillé devrait vous être envoyé dans les semaines qui viennent. Nous restons à votre disposition pour toute information complémentaire.

Ce Séminaire comportera des visites techniques, une session de posters et plusieurs sessions d'exposés consacrés aux concepts et besoins de base en matière d'assurance-qualité ainsi qu'aux aspects intra et inter-laboratoires pour tous les types de laboratoires concernés. La plupart de ces sessions feront l'objet d'une traduction simultanée (français, anglais, allemand).