



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

avril 1992

LA LETTRE

N° 2

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 Avril 1992

Equipe rédactionnelle :

O. LERAY, R. GRAPPIN, D. LEFIER, P. RINGLE, A. BAPTISTE

SOMMAIRE

Agrément des méthodes d'analyse par l'AOAC

p. 1

Evaluations :

- dosage de l'azote par la méthode Dumas avec l'appareil Leco FP 428

p. 2

- dénombrement de la flore totale et des coliformes du lait cru à l'aide des Petrifilm® SM et VRB

p. 3

Précision de la méthode de dosage du lactose du lait par voie enzymatique

p. 4 - 5

AGREMENT DES METHODES D'ANALYSE PAR L'AOAC

Une instance de normalisation

AOAC International (Association of Official Analytical Chemists) est une association professionnelle américaine, existant depuis plus de 100 ans, dont le but est de promouvoir la qualité des mesures et la validation des méthodes d'analyses chimiques et biologiques, en particulier dans le domaine agro-alimentaire. Une section européenne, basée aux Pays-Bas, existe depuis quelques années.

Les méthodes approuvées par l'AOAC, après une large étude collaborative, sont publiées dans le "Official Methods of Analysis" et ont valeur officielle aux Etats-Unis et au Canada. Depuis une quinzaine d'années, la FIL, l'ISO et l'AOAC ont constitué des groupes communs d'experts pour élaboration de normes internationales.

Un agrément pour les méthodes rapides

Dans le domaine des méthodes alternatives commerciales (méthodes rapides), pour répondre aux demandes d'une validation externe (moins poussée et moins longue que les habituelles procédures de normalisation) formulées par les utilisateurs, l'AOAC a développé depuis 1991 une procédure appelée "Certified Test Kit Program". Celle-ci est mise en oeuvre par une filiale de l'AOAC : AOAC Research Institute Inc. Elle a pour but :

- d'améliorer la standardisation et la fiabilité des méthodes rapides
- de mettre à la disposition des clients et utilisateurs de ces méthodes les résultats de l'évaluation
- de rechercher une reconnaissance internationale entre les différents organismes de normalisation et /ou de validation.

Ainsi, les travaux réalisés dans le cadre de l'AOAC sont pris en compte par l'AFNOR, mais des essais complémentaires peuvent être demandés dans le cas où les méthodes de référence ou les domaines d'application sont différents de ceux de la France.

DEROULEMENT DES OPERATIONS

Il est proposé sur 90 jours.

* demande d'agrément d'une méthode faite par le fabricant auprès de l'AOAC Research Institute Inc., avec fourniture du kit, d'informations et de données sur :

- les conditions d'emploi et les applications prévues
- les performances analytiques (calibration, matrice, fidélité, justesse, réactivité croisée, test de robustesse, stabilité, sensibilité, faux positifs/faux négatifs...)
- les critères d'interprétation des résultats de la méthode
- une description du système d'assurance-qualité à la fabrication

- des suggestions pour le protocole d'évaluation que devrait suivre le laboratoire expert indépendant, désigné par la suite (voir ci-dessous).

* premier examen des données fournies par un Administrateur du Programme.

* si tous les éléments de la demande sont complets, désignation de deux experts.

* contrat entre l'Administrateur et un laboratoire expert indépendant pour vérifier les performances annoncées par le fabricant. Celui-ci doit fournir au laboratoire le matériel et les fournitures nécessaires à la procédure d'évaluation et au besoin assurer une formation à l'utilisation de sa méthode.

* Le protocole d'évaluation conduit par le laboratoire est conçu par AOAC Research Institute Inc. (en liaison avec les deux experts et le fabricant).

* L'ensemble des données et des résultats est soumis aux deux experts, qui recommandent ou non l'agrément à l'Administrateur.

- En cas de décision négative, une note détaillée comportant les raisons du refus doit être communiquée au fabricant.

- Si les résultats obtenus correspondent aux performances annoncées par le fabricant, un agrément est accordé pour un an. Il donne droit à l'utilisation d'un logo "Performance Tested" de l'AOAC Research Institute Inc. sur les kits.

Par la suite, les critiques des utilisateurs sont transmises au fabricant par l'Administrateur.

Le renouvellement de l'agrément n'est pas automatique au bout d'un an. La demande doit en être refaite, les critiques d'utilisateurs sont prises en compte et des études complémentaires sont éventuellement menées.

Toute modification doit être signalée à l'Administrateur du Programme qui juge de la nécessité d'effectuer des expertises complémentaires.

Une information sur les méthodes agréées, en cours d'agrément ou qui ne sont plus agréées est publiée dans les journaux de l'AOAC.

METHODES AGREEES

Une trentaine de méthodes ont été agréées en 1991. Quelques unes concernent le domaine laitier.

Il s'agit notamment des Petrifilm® pour le dénombrement de la flore totale et des coliformes, d'une méthode de dénombrement des coliformes en gel de pectine et de la méthode enzymatique de dosage du lactose (Boehringer Mannheim). Plusieurs méthodes (tests immuno-enzymatiques, immunofluorescence, conductance-métrie, sonde nucléique, membrane hydrophobe) pour la détection de salmonelles dans tout type d'aliments ont également été agréées.

EVALUATIONS

chimie

DOSAGE DE L'AZOTE PAR LA METHODE DUMAS

Cette méthode de dosage de l'azote a été automatisée par divers fabricants de matériel et commence à être utilisée dans le domaine laitier.

CECALAIT a pu ainsi tester (en 1990) deux appareils : le MACRO-N d'HERAEUS, commercialisé par la société FOSS ELECTRIC, et le FP 428 de la société LECO.

RAPPEL DU PRINCIPE

Ces appareils sont basés sur le même principe. Rappelons qu'il s'agit de 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.

Mais ils diffèrent au point de vue des cadences analytiques, des modalités de prise d'échantillon et de mesure de l'azote (mesure de la totalité de l'azote présent / mesure de l'azote présent dans une partie aliquote).

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES

Nous vous avons présenté, dans notre précédent numéro, les caractéristiques de précision de l'appareil MACRO-N d'HERAEUS.

Dans ce numéro, nous vous proposons l'évaluation du FP 428, pour les mêmes produits que le MACRO-N, à l'exception de la poudre de lait.

Avec cet appareil, le dosage de fraction azotée en milieu très acide s'est avéré possible. Le cas de l'azote du fromage soluble dans l'acide phosphotungstique (NPT) en est l'illustration.

produit	composant	répétabilité Sr	Kjeldahl		FP 428 X	équation observée $y = b.x + a$	écart-type résiduel Syx
			Sy	Y			
LAIT n=10	NT x 6,38 g MAT/kg	0,37	2,70	34,89	42,99	$y = 0,769x + 1,81$ (20 résultats)	0,40
	NS g N/l	0,009	0,015	0,135	0,135	$y = 0,815x + 0,025$ (30 résultats)	0,0071
FROMAGE n = 12	NT g N/100g	0,027	0,09	4,486	4,585	non significative	0,040
	NS mg N/100ml	2,22	59,7	93,90	85,74	$y = 1,185x - 7,66$ (36 résultats)	2,56
	NPT mg N/100ml	1,129	14,5	17,41	19,34	$y = 0,991x - 1,76$ (24 résultats)	1,51
SERUM n = 10	NT x 6,38 g MAT/l	0,111	1,12	10,68	12,67	$y = 0,829x + 0,18$ (30 résultats)	0,11

Sr : écart-type de répétabilité

y : résultat obtenu par la méthode de Kjeldahl

Sy : écart-type de la population

Y : moyenne des y

x : résultat donné par l'appareil

X : moyenne des x

NT : azote total

MAT : matière azotée totale

NS : azote soluble

NPT : azote soluble dans l'acide phosphotungstique

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.

Microbiologie

NUMERATION DE LA FLORE TOTALE ET DES COLIFORMES DU LAIT CRU A L'AIDE DES PETRIFILM® SM ET VRB

Il s'agit de films secs rehydratables, mis au point par la société 3M.

Cette technique se développe depuis quelques années pour remplacer les méthodes de dénombrement en boîtes de Petri de la flore aérobie mésophile (ou flore totale) et des coliformes. Elle évite en effet la préparation fastidieuse de milieux, n'occasionne qu'un faible encombrement et facilite le stockage.

RAPPEL DU PRINCIPE

Ces milieux sont constitués de deux films enduits de produits deshydratés. Le film inférieur est le support du milieu de culture et contient un agent gélifiant soluble dans l'eau froide. Dans le cas du Petrifilm® SM (flore totale), le milieu de culture est du PCA (Plate Count Agar); pour le Petrifilm® VRB (coliformes), il s'agit de VRBL (Violet Red Bile Lactose). Le film supérieur est enduit de l'agent gélifiant et d'un indicateur au tétrazolium pour repérer la croissance des colonies (coloration rouge). Il permet aussi le piégeage et l'accumulation autour des colonies, du gaz dégagé lors de la fermentation du lactose par les coliformes.

VALIDATION(S)

Cette méthode a été validée par l'AFNOR en Décembre 1989, pour le lait cru.

Des études sont en cours actuellement en vue de la validation des Petrifilm® SM et VRB pour les dénombrements dans le beurre et dans le lait pasteurisé, et dans le fromage -pâtes molles- pour le Petrifilm® VRB.

Il existe également un Petrifilm® pour le dénombrement des *Escherichia coli*, comprenant du milieu VRBL et un indicateur coloré BCIG, réagissant à la présence de β -D-glucuronidase, produite spécifiquement par les colonies d'*E. coli*. Elles apparaissent alors en bleu, entourées de gaz. Il est actuellement étudié, en vue de la validation pour les dénombrements d'*E. coli* dans le beurre, le lait pasteurisé et le fromage.

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES

Les chiffres donnés ici ont été extraits des articles de PITON et RONGVAUX-GAIDA, Lait, 1990, Vol. 70, p. 345-355 et PITON et GRAPPIN, J. Ass. Off. Anal. Chem., 1991, Vol. 74, N°1, p. 92-104.

L'étude de la justesse de la méthode a été effectuée sur des échantillons de lait cru de citernes de ramassage contenant entre 10^4 et $6,6 \cdot 10^7$ UFC/ml. Les résultats obtenus avec les Petrifilm® ont été comparés à ceux des méthodes de référence; l'ensemencement étant cependant réalisé à l'aide de l'appareil Spiral dans ce cas.

L'étude de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode a été effectuée sur des échantillons de lait cru contenant entre $6,5 \cdot 10^3$ et $2,9 \cdot 10^5$ UFC/ml; les méthodes de référence utilisées correspondant aux normes FIL 100A et 73A, alors en vigueur.

flore étudiée	flore aérobie mésophile	coliformes
	JUSTESSE	
nombre d'échantillons	138	137
équation de calibrage	$y = 0,991x + 0,021$	$y = 0,891x + 0,471$
r	0,985	0,934
S _{yx} en log UFC/ml	0,128	0,250
X - Y en log UFC/ml	0,028	-0,123
X - Y en % par rapport à Y (UFC/ml)	46,7	-32,7
	REPETABILITE	
nombre d'échantillons	40	40
S _r en log UFC/ml	0,089	0,171
GRSD _r en % UFC/ml	22,7	48,3
RD _{r95} en % UFC/ml	77,5	201,2
	REPRODUCTIBILITE	
nombre d'échantillons	40	40
nombre de laboratoires	14	14
S _R en log UFC/ml	0,167	0,199
GRSD _R en % UFC/ml	46,9	58,1
RD _{R95} en % UFC/ml	193,5	260,7

y : log (UFC/ml) méthode de référence, enseigneur Spiral

x : log (UFC/ml) Petrifilm® SM ou VRB selon le cas

r : coefficient de corrélation

S_{yx} : écart-type résiduel

X - Y : différence moyenne entre les résultats des deux techniques

S_r : écart-type de répétabilité

GRSD_r : écart-type relatif géométrique de répétabilité

RD_{r95} : répétabilité : écart maximum observé dans 95% des cas par rapport à la valeur la plus faible.

SR : écart-type de reproductibilité

GRSD_R : écart-type relatif géométrique de reproductibilité

RD_{R95} : reproductibilité : écart maximum observé dans 95% des cas par rapport à la valeur la plus faible.

PRECISION DE LA METHODE DE DOSAGE DU LACTOSE DU LAIT PAR VOIE ENZYMATIQUE

Des difficultés dans l'utilisation de la méthode

La méthode enzymatique est, par principe, la méthode la plus appropriée pour doser la teneur réelle en lactose d'une solution, du fait de la spécificité des réactions enzymatiques.

Le dosage du lactose par méthode enzymatique a été normalisé par la Fédération Internationale de Laiterie dans la norme **FIL-IDF 79A:1989**. (La version définitive de cette norme -79B:1991- vient d'être publiée en anglais, mais n'a pas encore été diffusée; elle prévoit l'extension de la méthode au dosage du lactose dans le fromage fondu).

La norme 79A ne prend malheureusement en compte que le dosage du lactose dans les laits secs et l'on n'y trouve pas d'adaptation concernant le lait cru. Aussi doit-on généralement se référer au protocole proposé par la firme Boehringer Mannheim avec les kits enzymatiques qu'elle commercialise.

Si le principe des réactions reste le même, des variantes peuvent apparaître au niveau de la préparation des défécats de lait et /ou des volumes de prise d'essai.

PRECISION DE LA METHODE

La norme **FIL 79A:1989** fournit des valeurs de fidélité mesurées dans le cadre d'essais interlaboratoires de normalisation :

répétabilité : écart relatif maximal entre doubles : $r\% = 3\%$

reproductibilité : écart relatif maximal entre deux laboratoires: $R\% = 6\%$

Soit des écarts maximaux absolus de $r = 1,5\text{g/l}$ et $R = 3\text{g/l}$ à un niveau de 50g/l .

En ce qui concerne le lait liquide, nous pouvons nous référer aux valeurs observées au cours d'essais interlaboratoires réussis organisés en 1990-1991 par CECALAIT et qui confirment les faibles performances de l'ensemble "méthodes-laboratoire" : écarts systématiques des laboratoires variant entre + et -3 g/l par rapport à la valeur moyenne soit des écarts -type entre laboratoires d'environ $1,5\text{g/l}$.

La répétabilité observée, équivalente ou supérieure à celle de la norme **FIL 79A:1989** ($r\% \geq 3,5\%$) dans les premiers essais, s'est améliorée pour atteindre une valeur de l'ordre de $1,5\%$; la reproductibilité est de l'ordre de $4,5\text{g/l}$ ($R\% = 9\%$) et ne montre pas d'amélioration sensible au cours du temps.

Vu l'absence de procédure générale uniforme (défécation + dosage) on peut s'attendre à ce que de tels résultats puissent être améliorés. De même, en reprenant point par point les différentes étapes de la procédure il doit être possible de resserrer les valeurs fournies par la norme.

CAUSES D'IMPRECISION

1) LES PRISES D'ESSAI ET LES VOLUMES DE REACTIFS.

La faiblesse des méthodes enzymatiques reste la petitesse des quantités mises en oeuvre.

Si une prise d'essai de 1ml peut être réalisée avec une erreur relative maximale de $\pm 0,1\%$ avec une seringue Cornwall, $\pm 0,6\%$ avec une pipette de classe A, $100\mu\text{l}$ ne pourront être prélevés qu'avec une erreur de ± 1 à $\pm 1,5\%$; soit $\pm 0,5$ à $\pm 0,75\text{g/l}$ au niveau de 50g/l (au lieu de respectivement $\pm 0,05$ et $\pm 0,3\text{g/l}$ pour 1ml de prise d'essai).

De même, la répétabilité d'une prise d'essai de 1ml ne dépassera pas, respectivement $r\% = 0,014\%$ et $0,03\%$ ($r < 0,2\text{g/l}$), avec les mêmes instruments, alors qu'avec une micro-pipette l'écart de répétabilité relatif $r\%$ restera de l'ordre de 1 à 2% (soit $r = 0,5$ à 1g/l à 50g/l)

2) LA SENSIBILITE

Pour observer le maximum de variation de DO, on doit ajuster les préparations de manière à se trouver juste en deçà du maximum conseillé de $100\mu\text{g}$ de lactose dans la cuve pour les plus fortes concentrations supposées.

Des améliorations sont possibles

MAITRISER LA PRECISION DE LA METHODE

1) MAITRISE DE LA JUSTESSE

a) On utilisera des micropipettes réglables, réglées à la balance de précision avec de l'eau distillée à 20°C ($1\text{ml H}_2\text{O}$ à 20°C : $0,997\text{g}$).

En l'absence de réglage possible, on évaluera les volumes délivrés (étalonnage) afin d'en répercuter les valeurs dans les calculs finals (10 pesées par pipette).

b) On préparera une solution aqueuse de référence à 50g/l de lactose (sécher le lactose selon la norme **FIL 79A**). Cette solution sera déféquée comme le lait et le filtrat et permettra de vérifier la justesse finale des résultats.

c) On déféquera au maximum 2ml de lait ou légèrement moins ($1,8\text{ml}$) pour des laits enrichis en lactose (à des fins d'étalonnage d'appareil, par exemple), afin de rester dans les limites de concentration recommandées ($< 100\mu\text{g}$) (utiliser une seringue réglable), et on pèsera la prise de lait.

2) MAÎTRISE DE LA REPETABILITE.

Elle passe par la maîtrise des quantités mises en oeuvre.

a) prises d'essai

- Peser :

- * les cuves vides
- * les cuves + la prise d'essai
- * les cuves + le volume final.

Après les mélanges intermédiaires, bien lisser les morceaux de parafilm contre les bords des cuvettes afin d'éviter les pertes de poids accidentelles

- Calculer les masses des prises d'essai m_i et des volumes finals M_i pour les i échantillons analysés et les moyennes m et M des m_i et M_i .

- Modifier la formule de calcul finale du protocole de la firme Boehringer Mannheim comme suit :

Si

$$v_i = m_i / \rho_m \quad \rho_m = m / 0,1$$

et

$$V_i = M_i / \rho_M \quad \rho_M = M / 3,3$$

alors

$$\frac{V_i}{v_i} = \frac{M_i \times m \times 3,3}{m_i \times M \times 0,1}$$

et

$$C = \frac{M_i \times m \times 0,033 \times PM \times \Delta A_{\text{lactose}}}{m_i \times M \times \epsilon}$$

C étant exprimé en g de lactose par litre de solution d'essai

avec

v_i : volume de filtrat ou de sa dilution ajouté dans la cellule du spectromètre

V_i : volume total de liquide contenu dans la cellule du spectromètre

ρ_m et ρ_M : masses volumiques des prises d'essai et des volumes finals.

ϵ : coefficient d'absorption molaire du NADPH à 340 nm

PM : masse moléculaire du lactose ou du lactose monohydraté

$\Delta A_{\text{lactose}}$: différence des absorbances

Si les micro-pipettes ne sont pas justes, il convient de remplacer les volumes théoriques $V = 3,3$ ml et $v = 0,1$ ml par les volumes véritables établis sur la base de l'étalonnage initial des micro-pipettes (moyenne de 10 pesées sur les différents volumes à délivrer).

b) Réactifs :

Pour simplifier les manipulations et accroître la régularité, on procédera aux mélange des réactifs (hors échantillon) avant la distribution dans les cuves; les mélanges n'en seront que plus homogènes (cas des solution 1 + suspension 2, de la solution 3 + eau)

REMARQUE

la norme FIL 79A prend bien en compte l'importance de la prise d'essai et la difficulté d'être bien répétable avec de faibles volumes. Aussi détermine t-on à la défécation le niveau de dilution dans le filtrat à 1/10 de celui requis dans la procédure Boehringer Mannheim sur le lait liquide.

Cela permet d'effectuer une prise d'essai de 1 ml dans la cuve de mesure.

Le même procédé peut être envisagé en lait liquide en déféquant 200 μ l de lait au lieu de 2 ml (pesée précise à 10^{-4} g dans un bécher et transvasage avec rinçage) dans une fiole jaugée de 100 ml.

En maîtrisant tous ces points, nous sommes assurés de résultats fiables. Aussi nous vous donnons rendez-vous pour la prochaine chaîne d'analyses lactose de CECALAIT qui aura lieu dans la semaine 26 (22-28 Juin) !

NB : DANS LA NORME FIL 79A:1989, ON LIRA :

- p. 3 et 7 : la quantité de lactose présente être comprise entre 50 et 100 μ g.

- p. 4 et 7, paragraphe 8.5.3 (à rajouter) Une dilution au 1/10 doit être appliquée au filtrat après défécation dans le cas du lait sec (renvoi au paragraphe 8.3.2 manquant)