



**CENTRE D'ETUDES ET DE CONTROLE
DES ANALYSES EN INDUSTRIE LAITIERE**

octobre 1996

N°20

LA LETTRE DE CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 03.84.73.63.20 TELECOPIE : 03.84.37.37.81
E-mail : bapt@poligny.inra.fr ou trossat@poligny.inra.fr

Rédaction achevée le 7 novembre 1996

Equipe rédactionnelle : A. BAPTISTE; O. LERAY; P. ROLLIER; Ph. TROSSAT

Relecture par : les auteurs

SOMMAIRE

Evaluation : le Milkoscan 4000

Validations AFNOR

Normes et projets de normes parus récemment

Erratum

Rendez-vous

Estimation de la fidélité des méthodes de numération de *Staphylococcus aureus*

Nouveautés dans la réglementation

Du côté de la biblio...

EVALUATION : LE MILKOSCAN 4000

L'analyseur moyen Infra-rouge Milkoscan 4000 de la Société Foss Electric (Danemark) permet la détermination des teneurs en matière grasse, protéines, lactose, urée et acide citrique et d'un équivalent point de congélation dans le lait. Il propose en outre deux types de calculs de calibration, une régression multilinéaire classique pour la matière grasse, les protéines et le lactose, une régression des moindres carrés partiels (PLS) pour les autres critères, mais pouvant s'appliquer aussi aux trois premiers critères. Ses caractéristiques instrumentales et analytiques ont été évaluées par CECALAIT. Les caractéristiques instrumentales de base : stabilité et traçage apparaissent très satisfaisantes. Dans l'ensemble des résultats obtenus, nous ne nous intéresserons ici qu'à ceux qui concernent la détermination des taux de matière grasse et de protéines. La linéarité de l'appareil est correcte pour les plages de taux usuels et peut être ajustée si nécessaire. Les valeurs de répétabilité et de justesse sont conformes aux exigences réglementaires et normatives. De façon plus fine, la précision la meilleure pour la matière grasse s'observe avec le filtre B, puis avec un calibrage PLS de Foss Electric, ajusté aux laits régionaux. Les résultats obtenus avec le filtre A apparaissent sensiblement en retrait. Pour la teneur en protéines, les deux modes de calibrage, MLR et PLS, donnent un degré de précision quasi équivalent.

Le Milkoscan 4000 (MS 4000) est un appareil automatique d'analyse du lait par spectrométrie moyen infra-rouge (MIR), fabriqué et commercialisé par la société FOSS ELECTRIC. Il permet de mesurer les concentrations des principaux composants du lait et permet en outre le dosage de paramètres annexes tels que la teneur en urée, en acide citrique, un équivalent du point de congélation et un index d'homogénéisation. Il a été évalué par CECALAIT entre début juin et fin septembre 1995, à Poligny.

DESCRIPTION

L'appareil dispose d'un système infrarouge monofaisceau comprenant une roue filtre, composée de 11 filtres et un système de mesure de la conductivité du lait, utilisé pour la détermination de l'équivalent point de congélation.

L'appareil est entièrement piloté par logiciel sous environnement Windows et sa cadence analytique varie de 200 à 450 échantillons par heure suivant les modèles. Il dispose de deux types de calculs de calibrations pour déterminer les valeurs des paramètres recherchés, à partir du signal primaire :

- ♦ la régression linéaire multiple (MLR) pour la matière grasse, les protéines et le lactose,
- ♦ la régression des moindres carrés partiels (PLS) qui s'applique à l'urée, à l'acide citrique, à l'équivalent point de congélation et à l'index d'homogénéisation. Ce mode de calcul peut toutefois être utilisé également pour la matière grasse, les protéines et le lactose.

LES ESSAIS

Ils ont porté sur les points suivants :

- ♦ évaluation de la stabilité de l'appareil,
- ♦ évaluation de la contamination entre échantillons,
- ♦ évaluation de la linéarité,
- ♦ évaluation de la répétabilité,
- ♦ évaluation de la justesse.

Les critères d'appréciation de ces paramètres sont issus soit de la norme FIL 141A:1990 « guide pour l'utilisation des appareils de

dosage par absorption dans le moyen infrarouge », qui était alors en vigueur, soit de la « norme d'utilisation des appareils infrarouge dans le cadre du paiement du lait en France ».

Nous ne présenterons ici dans un premier temps que les résultats concernant les paramètres relevant du paiement du lait, à savoir la matière grasse et les protéines.

❶ EVALUATION DE LA STABILITE DE L'APPAREIL

Elle a été réalisée par analyse en mode automatique de 3 laits en double, toutes les 20mn, au cours d'une demi-journée de travail dans les conditions réelles d'un laboratoire interprofessionnel.

Les résultats montrent que les valeurs moyennes journalières d'écart-type de reproductibilité observées sont conformes à celles déduites de la norme FIL 141A:1990.

❷ EVALUATION DE LA CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS

Ce paramètre a été évalué en mode d'analyse automatique, par le passage d'un même lait individuel de vache et d'eau distillée, selon la séquence « lait - lait - eau - eau », répétée 20 fois. La mesure a porté sur les critères habituels : matière grasse par filtre A et B, protéines et lactose. Le taux de contamination a été estimé par la formule :

$$Tc = [(S(eau1) - S(eau2)) / (S(lait2) - S(eau2))] \times 100$$

Dans ces conditions, le système MS 4000 laisse apparaître des contaminations entre échantillons de l'ordre de 0,4% à 0,7%. Ces valeurs restent très inférieures à la limite d'acceptabilité de 1% établie dans le cadre du paiement du lait et du contrôle laitier.

❸ EVALUATION DE LA LINEARITE

Ce paramètre a été testé pour chacun des canaux analytiques à l'aide de gammes de 10 laits aux teneurs variant de :

- ♦ 10 à 100 g/kg de matière grasse, obtenues par mélange proportionnel (poids/volume) à partir de crème et de lait écrémé;

- ♦ 5 à 50 g/kg de protéines, obtenues par mélange proportionnel (poids/volume) d'une solution de caséinate de sodium et d'eau.

Ces gammes ont été analysées sur le MS 4000 en mode manuel, sans agitateur et en données brutes, non corrigées des interactions entre composants. Les analyses ont été effectuées en double dans l'ordre croissant, puis décroissant des différents taux.

Les résultats montrent que l'ajustement de la linéarité proposé par le constructeur convient pour les laits de vache de teneurs classiques puisqu'on observe une plage linéaire de l'appareil entre 5 et 50 g/kg de protéines et entre 20 et 50g/kg de matière grasse, aussi bien sur le filtre A que le filtre B.

Cependant, pour l'analyse des laits à taux élevés : contrôle laitier, fin de lactation, laits de vaches jersiaises ou de brebis, qui se situent en dehors de cette plage, il peut apparaître souhaitable d'optimiser l'ajustement de la linéarité sur une plage plus étendue. Le logiciel de traitement du signal de l'appareil autorise cette modification (polynôme d'ordre 2).

	CALIBRAGE MLR 214 échantillons			CALIBRAGE PLS 214 échantillons	
	MATIERE GRASSE FILTRE A (g/kg)	MATIERE GRASSE FILTRE B (g/kg)	PROTEINES (g/kg)	MATIERE GRASSE (g/kg)	PROTEINES (g/kg)
\bar{X}	38,060	38,123	32,017	36,230	31,323
Sx	7,0545	7,0971	2,9091	6,5378	3,0220
Sr	0,0916	0,0926	0,0855	0,0738	0,0761
Sr %	0,24	0,24	0,27	0,20	0,24
r	0,254	0,257	0,237	0,204	0,211

TABLEAU 1

avec \bar{X} : moyenne
Sr % : Sr en pourcentage
Sx : écart-type de série
r : estimation de la répétabilité
Sr : écart-type de répétabilité

Ce tableau permet de conclure que, pour la matière grasse, comme pour les protéines, et quel que soit le calibrage utilisé, le Milkoscan 4000 offre des valeurs de répétabilité conforme aux prescriptions de la norme FIL 141A:1990 :

$$Sr = 0,14 \text{ g/kg et } r = 0,4 \text{ g/kg}$$

● EVALUATION DE LA JUSTESSE

La justesse de l'appareil a été évaluée sur la base des valeurs des moyennes, \bar{d} , et des écarts-types des écarts à la référence, Sd :

- ♦ d'une part au moyen de 150 laits individuels de vache, provenant de 8 élevages du Jura et conservés avec du bronopol à 0,02%, pour l'étude de la conformité pour le contrôle laitier,

● EVALUATION DE LA REPETABILITE

La répétabilité du MS 4000 a été testée en mode d'analyse automatique, à partir de 150 laits individuels et de 64 laits de troupeaux conservés avec du bronopol à 0,02%. Cet ensemble couvrirait une plage de taux allant de 21 à 62 g/kg de matière grasse et de 26 à 44 g/kg de protéines.

L'analyse de chaque série d'environ 30 échantillons a été doublée, après contrôle de la stabilité de la réponse de l'appareil par analyse d'un lait témoin entre les répétitions de séries.

La répétabilité a été évaluée selon les différentes possibilités de calibration de l'appareil, donc en MLR (avec filtre A ou B pour la matière grasse) et en PLS.

Le tableau 1 regroupe l'ensemble des résultats obtenus.

- ♦ d'autre part au moyen de 64 laits de troupeaux provenant de la Franche-Comté, également additionnés de bronopol, pour l'étude de la conformité pour le paiement du lait.

Les méthodes de référence utilisées sont les méthodes officielles de paiement du lait, donc :

- ♦ la méthode Gerber pour la matière grasse, avec analyses en simple, mais confirmation en cas de résidu trop important,
- ♦ la méthode au Noir Amido pour les protéines, avec analyses en double

➤ CALIBRAGE DE L'APPAREIL

L'évaluation de la justesse a porté sur les valeurs obtenues selon un calibrage MLR et selon un calibrage PLS.

Le calibrage MLR a été réalisé, au moyen d'une gamme de 13 échantillons de laits reconstitués en réseau orthogonal de TB TP selon la technique décrite par O. LERAY en 1989.

Pour le calibrage PLS, les équations de calibrage, avec des coefficients affectés aux 11 filtres suivant des combinaisons propres à la prédiction de chaque critère ont été établies par la société Foss Electric au Danemark. Les équations de calibrage

finales ont été ajustées par régression linéaire simple à l'aide d'une gamme de 13 laits reconstitués. On a ainsi obtenu des valeurs dites de **calibrage PLS ajusté** plus représentatives des laits de la région.

Les tableaux 2 et 3 permettent d'évaluer la justesse pour la matière grasse, puis pour les protéines.

Légendes des tableaux

\bar{X} : moyenne appareil

S_y : écart de série

$\bar{d} = \bar{X} - \bar{Y}$: moyenne des écarts appareil-référence

n : nombre d'échantillons

\bar{Y} : moyenne référence

Sd : écart-type des écarts

$S_{y,x}$: écart-type résiduel de régression

* : significatif au seuil de 5%

NS : non significatif

NB : Les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent aux résultats obtenus après élimination des données « anormales », au sens où elles contribuent individuellement de manière trop importante à l'erreur résiduelle.

TABLEAU 2 : justesse du MS 4000 pour la teneur en matière grasse

critères analytiques	LAITS INDIVIDUELS			LAITS DE TROUPEAUX		
	MG FILTRE A MLR	MG FILTRE B MLR	MG PLS ajusté	MG FILTRE A MLR	MG FILTRE B MLR	MG PLS ajusté
\bar{Y}	39,758 (39,584)	39,758 (39,607)	39,758	35,740	35,740	35,740
\bar{X}	39,350 (39,241)	39,339 (39,200)	39,179	35,100	35,339	35,212
S_y	8,01919 (8,0619)	8,01919 (7,9039)	8,0919	1,7014	1,7014	1,7014
$\bar{d} = \bar{X} - \bar{Y}$	- 0,409 (- 0,342)	- 0,420 (- 0,407)	- 0,380	- 0,641	- 0,401	- 0,528
Sd	0,9487 (0,8303)	0,4746 (0,4509)	0,6871	0,3842	0,2820	0,3382
$S_{y,x}$	0,9518 (0,8327)	0,4749 (0,4472)	0,6823	0,3752	0,2838	0,3409
n	150 (147)	150 (149)	150	64	64	64

Le tableau 2 montre que pour le critère matière grasse, les biais moyens sont proches, pour tous les calibrages et tous les types de laits : de - 0,38 à 0,64g/kg. Ces valeurs de biais sortent légèrement de la tolérance de $\pm 0,15$ g/kg pour le critère matière grasse. Toutefois, le décalage de près d'un mois entre la préparation de la gamme d'étalonnage et le prélèvement des laits de troupeaux est une explication plausible à ces écarts, lesquels restent dès lors dans des limites admissibles.

Du point de vue de la précision (écarts types des écarts), les meilleurs résultats sont obtenus avec le filtre B, puis avec la calibration PLS ajustée. Le filtre A est sensiblement moins précis, tout en restant conforme aux normes. Rappelons qu'il s'agit là d'une caractéristique de la méthode et non pas d'une constatation propre à l'appareil.

TABLEAU 3 : justesse du MS 4000 pour la teneur en protéines

critères analytiques	LAITS INDIVIDUELS		LAITS DE TROUPEAUX	
	PROTEINES MLR	PROTEINES PLS ajusté	PROTEINES MLR	PROTEINES PLS ajusté
\bar{Y}	32,267 (32,264)	32,267	31,352	31,532
\bar{X}	32,241 (32,238)	32,213	31,570	31,464
Sy	3,5421 (3,5510)	3,5421	1,4019	1,4019
$\bar{d} = \bar{X} - \bar{Y}$	- 0,027 (- 0,026)	- 0,054	+ 0,038	- 0,068
Sd	0,4203 (0,4013)	0,4470	0,1335	0,2313
Sy,x	0,3777 (0,3595)	0,4457	0,1320	0,1946
n	150 (148)	150	64	64

Le tableau 3 montre que pour les protéines, les biais moyens sont systématiquement voisins de 0 pour tous les types de laits et tous les types de calibrage.

Du point de vue de la précision, les deux calibrages sont quasi équivalents, avec d'excellents écarts-types des écarts, de l'ordre de 0,4 - 0,45 g/kg sur laits individuels et de 0,13 - 0,23 g/kg sur laits de troupeaux.

➤ **En conclusion**, l'appareil Milkoscan 4000 est conforme aux exigences de la norme FIL 141A:1990 qui fixe les valeurs d'écarts types résiduels de régression à 1,0 g/kg pour les laits individuels et à 0,7 g/kg pour les laits de troupeaux. Les biais moyens sont de même conformes pour les protéines et pour la matière grasse.

⑥ CONCLUSION GENERALE

L'appareil MS 4000 présente des caractéristiques de précision de très bon niveau et en tous points conformes aux besoins des laboratoires d'analyse de laits en grande série. A la conformité aux exigences normatives et réglementaires s'ajoute une convivialité et une facilité d'utilisation -conduite et contrôle- qui sont autant d'atouts supplémentaires pour assurer à l'utilisateur de résultats une qualité analytique régulière.

(par O. Leray et Ph. Trossat)

VALIDATIONS AFNOR

Mme Gomy de l'AFNOR nous informe de la validation par l'AFNOR de quatre nouvelles méthodes microbiologiques. Il s'agit de :

➤ VIDAS *Listeria monocytogenes*, test de détection de *Listeria monocytogenes*, de la société Biomérieux (validation en mars 1996)

➤ PROBELIA *Salmonella* sp. , test de détection des salmonelles, de la société SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR (validation en juin 1996)

Nous n'avons pas encore reçu d'informations détaillées sur ces deux méthodes rapides. Nous vous tiendrons au courant dès que possible.

➤ DYNABEADS anti *Salmonella*, test de détection des salmonelles. La norme NF ISO 6579 (V 08-013) pour la recherche des salmonelles se décompose en une étape de préenrichissement en milieu non sélectif liquide, suivie d'un enrichissement en milieux sélectifs liquides, puis d'isolement en milieux sélectifs solides. Les Dynabeads anti *Salmonella* sont utilisées après la phase de pré-enrichissement pour remplacer ou compléter les deux étapes sélectives. Elles permettent en effet un enrichissement sélectif rapide par capture immunomagnétique

des salmonelles. Elles sont applicables à tous les types d'aliments et détectent les échantillons négatifs en 2 jours pour les aliments traités thermiquement, 3 jours pour les produits naturels et matières premières, 1 jour pour les oeufs. En revanche, la détection des positifs demande 5 jours car les échantillons présumés positifs doivent être confirmés selon la méthode de référence.

L'attestation de validation (n° DYN -16/1 -06/96, de juin 1996) informe en outre sur les limites de détection, la spécificité, la justesse et la fidélité de la méthode.

➤ DYNABEADS anti *Escherichia coli* O157, test de détection d'*E. coli* O157. Pour tous les produits d'alimentation humaine, les dynabeads permettent la capture immunomagnétique sélective des *E. coli* O157, à partir d'échantillons pré-enrichis. Un étalement sur milieu sélectif solide des complexes billes-bactéries permet ensuite de repérer les colonies sorbitol-négatives suspectes, qui doivent être confirmées. Dans tous les cas, les résultats sont obtenus en une journée contre deux avec la méthode de référence.

L'étude de justesse fait apparaître une mauvaise corrélation entre la méthode de référence et la méthode rapide ; en particulier les faux négatifs de l'une et l'autre méthode ne sont pas associés aux mêmes types d'échantillons. Ainsi, il peut être judicieux de diluer la prise d'essai avant l'immunocapture pour les produits gras et visqueux, qui constituent principalement les faux négatifs de la méthode rapide. En revanche, pour les produits à forte flore associée, source de faux négatifs dans la méthode de référence,

l'utilisation des Dynabeads permet d'améliorer très sensiblement la détection des *E. coli* O157.

Des informations complémentaires sur les caractéristiques analytiques de la méthode sont fournies par l'attestation de validation n° DYN -16/2 -06/96, de juin 1996.

Ces deux méthodes rapides sont distribuées par la société DYNAL France.

Signalons également que le kit TECRA de détection des salmonelles, distribué par la société 3M voit sa validation prolongée jusqu'en janvier 1997.

Enfin, pour un certain nombre de méthodes rapides en fin de validation cette année, il n'y pas eu de demande de renouvellement. C'est le cas de :

- ◆ Tests Transia de détection des entérotoxines de staphylococoques et de détection de *Clostridium tyrobutyricum*,
- ◆ Gélose Rambach pour l'isolement des *Salmonella* (Merck),
- ◆ Appareil Leco FP-428 pour la détermination de l'azote selon la méthode Dumas,
- ◆ Appareil Maxidigest MX350 de Prolabo pour la minéralisation rapide des échantillons.

NORMES ET PROJETS DE NORMES PARUS RECEMMENT (reçus entre Juillet et Octobre 1996)

NORMES AFNOR

V 04-294 Août 1996 (ICS 67.020 ; 67.100.10) LAIT Lactosérum liquide : détermination de la matière sèche

V 04-295 Août 1996 (ICS 67.020 ; 67.100.10) LAIT Lactosérum concentré : détermination de la matière sèche

Dans les deux cas, le principe de la méthode repose sur un préséchage de l'échantillon sur un bain d'eau bouillante suivi de l'évaporation de l'eau dans une étuve à $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en présence de sable pour le lactosérum concentré.

PROJETS DE NORMES AFNOR

Projet V 08-052 Microbiologie des aliments : Recherche des *Salmonella*. Méthode de routine. Par rapport à la version précédente, tous les exemples de milieux d'isolement solides sélectifs sont supprimés.

Projet NF ISO 1738, V 04-314 Beurre : détermination de la teneur en sel. Il s'agit d'une reprise intégrale de la nouvelle version de la norme ISO 1738. La méthode reste la même.

NORMES ISO

Rectificatif technique 1 à la norme ISO 10272:1995. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche de *Campylobacter* thermotolérants.

Rappelons que la norme AFNOR NF ISO 10272 (V 08-026) de janvier 1996 de même titre reproduit intégralement la norme ISO 10272.

Ce rectificatif concerne la composition de la solution d'antibiotiques décrite en B.7.3.1. (page 13 de la norme). Les unités exprimées en « mg » doivent être remplacées par des « g ».

Vu les petites quantités de produits à peser, les utilisateurs de la norme auront sans doute rectifié d'eux-mêmes !

NORMES FIL

141B:1996 LAIT ENTIER. Détermination de la teneur en matière grasse laitière, protéines et lactose. Guide pour l'utilisation des appareils de dosage dans le moyen infra-rouge.

Par rapport à l'édition précédente de 1990, le texte a été complété par plusieurs paragraphes et annexes.

On y précise d'emblée que ces appareils permettent d'analyser le lait d'autres espèces, sous réserve d'un calibrage spécifique. Puis dans le paragraphe consacré aux principales caractéristiques des appareils IR, la production des longueurs d'onde par interférogramme modifié de Fourier se rajoute au réseau de diffraction et aux filtres interférentiels.

La partie 6, qui traite des facteurs instrumentaux affectant la précision des mesures s'étoffe notablement. Le point consacré à la linéarité souligne la nécessité de distinguer les évaluations sur une base masse/masse et sur une base masse/volume, selon que l'appareil soit calibré pour délivrer des résultats en masse/masse ou masse/volume. Ce dernier point est renvoyé en annexe. Quant à la procédure de réglage masse/masse, elle est plus détaillée qu'avant, avec notamment des éléments de calcul supplémentaires.

Pour la vérification de l'homogénéisation, le texte met maintenant en garde contre les résultats parfois trompeurs du test de routine

habituel et présente une méthode alternative, plus sûre, mais plus laborieuse.

La partie 10 qui traite de la vérification journalière de la stabilité à court terme de l'appareil est de même complétée par plusieurs paragraphes permettant de mieux cerner la période où l'appareil reste stable. On y donne également des précisions supplémentaires sur la procédure de réajustement du calibrage.

Les annexes, enfin, diffèrent largement entre les deux versions de la norme. L'ancienne annexe A, qui donnait une liste des appareils IR disparaît au profit d'une procédure de détermination de la linéarité sur une base masse/volume. L'annexe B fait le point sur le contrôle et l'ajustement des facteurs de correction en présentant 4 types de méthodes de détermination de ces facteurs: par additions indépendantes de composants du lait, par dilution de composants purs, par échantillons de laits recombinaisonnés, par échantillons de laits naturels.

L'annexe C, enfin, reprend l'ancienne annexe B, consacrée à la méthode de calibrage des appareils à l'aide d'échantillons de lait modifiés.

ERRATUM

Une erreur s'est glissée dans La Lettre de CECALAIT N° 19 de juillet 1996 dans le texte concernant les méthodes de détermination de la teneur en urée dans le lait.

Dans la partie consacrée à la méthode IR, à la fin du 1er paragraphe, il faut remplacer la phrase « la zone la plus utilisable

se situe finalement autour de 1600 cm⁻¹ - 1610 cm⁻¹ » par « **la zone la plus exploitable se situe finalement autour de 1477 cm⁻¹** ».

Nous vous prions de nous excuser pour cette erreur.

RENDEZ-VOUS

➡ **RAPPEL : 9 - 10 DECEMBRE 1996 A ANAND (INDE) : SYMPOSIUM SUR LES LAITS POUR LE SEVRAGE ET LES ALIMENTS POUR NOURRISSONS**

25-27 FEVRIER 1997 : SEMINAIRE SUR LE POLYMORPHISME DES PROTEINES LAITIERES A PALMERSTON (NOUVELLE-ZELANDE)

14-18 AVRIL 1997 : SEMAINE ANALYTIQUE FIL-AOAC ET SYMPOSIUM A LISBONNE (PORTUGAL)

➡ Dates non définies encore

début 1997 : semaine législative de la FIL à Bruxelles (Belgique)

mars 1997 : semaine nutrition de la FIL à Zürich (Suisse)

Pour tout renseignement, prendre contact avec les organismes suivants.

FIL
C. Brooks
41, square Vergote
B 1040 BRUXELLES
BELGIQUE
TEL : +32.2.733.98.88
FAX : +32.2.733.04.13
E-mail : fil-idf@mail.interpac.be

ALF
34, rue de Saint Petersburg
75382 PARIS CEDEX
TEL : 01.49.70.71.11
FAX : 01.42.80.63.45

ESTIMATION DE LA FIDELITE DES METHODES DE NUMERATION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Les méthodes normalisées récentes de dénombrement de *Staphylococcus aureus* proposent deux techniques. L'une est un dénombrement par étalement sur milieu de Baird Parker suivi d'une confirmation des colonies par le test de la coagulase; l'autre regroupe ces deux étapes grâce à un ensemencement dans la masse du milieu Baird Parker, supplémenté de plasma de lapin et de fibrinogène (RPF). L'utilisation des résultats obtenus au cours de plusieurs campagnes d'essais interlaboratoires CECALAIT permet d'estimer les valeurs de fidélité des deux méthodes. Ces valeurs sont plus fortes pour la méthode avec confirmation que pour la méthode RPF. Ces conclusions apparaissent cependant moins liées aux caractéristiques intrinsèques de chaque méthode qu'à des « allègements » systématiques des protocoles expérimentaux décrits dans les normes, pour la méthode avec confirmation. Ses caractéristiques de fidélité en souffrent inévitablement. Dans le même temps, la méthode RPF, d'une pratique plus aisée, est suivie plus scrupuleusement. Ainsi, l'une des deux méthodes se retrouve systématiquement défavorisée par rapport à l'autre.

Staphylococcus aureus est un germe indicateur de défaut d'hygiène dont la teneur ne doit pas dépasser la valeur seuil de 500/ml dans le lait cru, destiné à des fabrications sans étape de thermisation. Les méthodes normalisées les plus récentes de comptage des colonies coagulase positives (FIL 145:1990 et AFNOR V 08-057, 1 & 2 de 1994) proposent deux techniques de dénombrement : l'une en une seule étape sans confirmation de colonies, l'autre fractionnée en deux étapes, avec confirmation. La méthode en une seule étape est d'utilisation relativement récente; mais les laboratoires sont de plus en plus nombreux à la pratiquer. Il semble donc opportun de comparer les caractéristiques de fidélité de ces deux méthodes. Or, depuis 1993, les essais interlaboratoires de CECALAIT comprennent la numération des staphylocoques. Nous disposons donc d'un ensemble de résultats suffisamment conséquent pour pouvoir estimer de façon fiable la répétabilité et la reproductibilité des deux méthodes.

RAPPEL DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les essais interlaboratoires de CECALAIT comportent une gamme de 5 échantillons de lait cru additionnés de conservateur, avec des teneurs en staphylocoques allant de 0 à 10000/ml. Les échantillons sont envoyés le jour de leur préparation en boîte isotherme à 4°C. Ils arrivent à destination le lendemain et doivent être analysés le jour même. Les résultats servent à estimer la répétabilité -quoique les doubles ne soient pas analysés en aveugle- et la justesse.

Pour pouvoir mener cette étude sur les caractéristiques de fidélité des deux techniques normalisées, il nous a fallu procéder à une sélection supplémentaire d'après les renseignements obtenus dans les feuilles de résultats. Seuls ont donc été retenus les résultats provenant de laboratoires :

- ★ ayant pratiqué l'analyse le lendemain de la préparation des échantillons,
- ★ ayant utilisé, même approximativement, l'une des deux techniques décrites dans la norme FIL 145:1990, à savoir schématiquement :

- ◆ un dénombrement après étalement sur milieu de Baird Parker, puis une confirmation des colonies présumées de *Staphylococcus aureus* par le test de la coagulase (elles doivent avoir une activité coagulase +);

- ◆ un dénombrement direct par ensemencement dans la masse de milieu Baird Parker, additionné de supplément RPF (plasma de lapin et fibrinogène). En effet, ce supplément RPF permet la détection visuelle directe des colonies ayant une activité coagulase +, il n'est plus nécessaire alors de pratiquer un test de confirmation.

Les tests de Cochran (1%) et de Grubbs (1%) ont permis d'éliminer les valeurs anormales (hors population).

RESULTATS

TABLEAU 1	BAIRD PARKER + COAGULASE (7 essais interlaboratoires)				BAIRD PARKER + RPF (6 essais interlaboratoires)			
	REPETABILITE		REPRODUCTIBILITE		REPETABILITE		REPRODUCTIBILITE	
	S _r en log	nbre de doubles	S _R en log	nbre de valeurs	S _r en log	nbre de doubles	S _R en log	nbre de valeurs
100 à 1000/ml	0,221	89	0,458	135	0,065	123	0,155	171
1000 à 10 000/ml	0,158	154	0,36	240	0,066	122	0,149	159
100 à 10 000/ml	0,183	243	0,398	375	0,066	245	0,152	330

Le tableau 1 ci-dessus regroupe l'ensemble des résultats obtenus selon les deux techniques

Les résultats de répétabilité et de reproductibilité apparaissent beaucoup plus élevés dans la méthode avec confirmation que dans la méthode RPF. Ce constat doit cependant être nuancé. En effet, les protocoles expérimentaux généralement utilisés dans les laboratoires peuvent parfois s'éloigner notablement des prescriptions de la norme.

Ainsi dans la méthode avec confirmation, la norme préconise :

★ d'étaler 1 ml de chaque dilution sur deux boîtes de 140 mm de diamètre, contenant du milieu Baird Parker,

★ de sélectionner ensuite sur chaque boîte, 5 colonies de chaque type observé, c'est à dire 5 colonies typiques et/ou atypiques, pour confirmation par le test de la coagulase.

Ce protocole se révèle lourd et long dans la pratique. C'est pourquoi, les déviations observées sont nombreuses. On constate ainsi que souvent 0,1 ml de chaque dilution est étalé et que le nombre de confirmations peut-être inférieur à 5 par type de colonies. Ces habitudes permettent certes de rendre la méthode plus rapide, mais aboutissent inévitablement à en diminuer la fidélité. Elle est donc défavorisée d'office par rapport à la méthode RPF.

C'est d'autant plus vrai qu'on constate, dans le même temps, que pour la méthode RPF, les laboratoires utilisent souvent deux boîtes par dilution, alors que la norme FIL se contente d'une seule.

Les résultats concernant la justesse des deux méthodes n'apparaissent pas ici. En fait, le calcul des moyennes des différences sur 3 essais interlaboratoires n'a pas permis d'observer de différence significative entre les deux méthodes.

BILAN ET PERSPECTIVES

Il est certain que les valeurs de répétabilité et de reproductibilité qui seraient obtenues en appliquant strictement la norme seraient différentes.

Une petite étude menée de cette façon au laboratoire CECALAIT sur 5 doubles va d'ailleurs en ce sens. Elle montre que les répétabilités des deux méthodes se rapprochent nettement, avec cependant toujours un léger avantage pour la méthode RPF. A vrai dire seule une étude de plus grande envergure, avec plus de résultats et plus de laboratoires impliqués, mais toujours en suivant scrupuleusement la norme, permettrait d'aboutir à une meilleure estimation des répétabilités des deux méthodes.

Cependant les valeurs présentées ici peuvent d'ores et déjà être utilement comparées aux limites définies jusqu'alors dans nos essais interlaboratoires. Le tableau 2 rappelle l'ensemble de ces valeurs :

TABLEAU 2

METHODE	S_r	S_r chaîne	S_R	limite \bar{d} calculée	limite \bar{d} chaîne
BP + COAGULASE	0,183	0,25	0,398	$\pm 0,71$	$\pm 0,4$
RPF	0,066		0,152	$\pm 0,27$	

La limite S_r proposée jusqu'alors apparaît donc très favorable aux laboratoires, en particulier avec la méthode RPF. En revanche, si la limite de \bar{d} , adoptée dans les chaînes, apparaît bien ajustée pour les laboratoires pratiquant la méthode RPF, elle peut sembler un peu sévère pour ceux qui utilisent la méthode avec confirmation, dans l'état de leur pratique actuelle. Néanmoins la limite de \bar{d} ($\pm 0,4$ log) reste un objectif raisonnable pour une méthode avec confirmation menée en bonne conformité à la norme.

(par P. Rollier)

NOUVEAUTES DANS LA REGLEMENTATION

FRANCE

Avis du 9/08/1996, relatif à la production de laits de consommation et de produits à base de lait en vue de leur mise sur le marché communautaire.

Le 24 mars 1996 est parue une nouvelle liste des établissements préparant des laits de consommation ou des produits à base de lait, titulaires de la marque de salubrité, définie en mars 1995. Cet avis en fait la mise à jour en donnant la liste des nouveaux agréments et des radiations, ainsi que la liste des modifications de raison sociale ou de produits.

Arrêté du 2/08/1996 (JO du 12/08/1996), modifiant l'arrêté du 30/12/1993, relatif aux conditions d'installation, d'équipement et de fonctionnement des centres de collecte ou de standardisation du lait et des établissements de traitement et de transformation du lait et des produits à base de lait.

Ce texte modifie principalement le paragraphe 23 de l'arrêté initial. Il autorise les établissements transformant moins de 2 000 000 l de lait, à un certain nombre de dérogations par rapport aux prescriptions communes. Celles-ci concernent notamment la configuration et l'équipement des locaux de travail et de stockage, les équipements de manutention, la présence de sanitaires. Des revêtements de locaux non lisses et des outils de

travail en bois, cuivre ou toile végétale sont également acceptables par dérogation sous réserve d'un entretien et d'un nettoyage corrects.

En plus de ces dispositions, les établissements transformant moins de 500 000 l par an sont autorisés à adapter leurs mesures d'autocontrôle et à se dispenser de programme spécifique de formation, sauf en cas de manquements évidents et répétés aux règles d'hygiène.

Recueil « Hygiène Alimentaire : lait et produits laitiers » (N° 1488 - VI, Journal Officiel de la République Française). Ce fascicule de plus de 300 pages présente l'état actuel de l'ensemble des textes réglementaires français qui concernent la production et la transformation du lait ainsi que l'exportation et l'importation des produits laitiers. Il regroupe donc l'ensemble des arrêtés, décrets et avis parus au Journal Officiel, ainsi que les notes de service de la Direction Qualité des Services Vétérinaires d'Hygiène Alimentaire.

(disponible auprès de la Direction des Journaux Officiels ; 26, rue Desaix ; 75727 PARIS CEDEX 15 ; 3616 JOEL, au prix de 110F)

EUROPE COMMUNAUTAIRE

Règlement CEE n° 1854/96 de la Commission établissant une liste des méthodes de référence à appliquer à l'analyse et à l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers conformément à l'organisation commune des marchés (JO CE L 246 du 27/9/1996)

Ce texte complète le règlement n°2721/95 de la Commission du 24/11/1995 (cf La Lettre de CECALAIT n°17 de janvier 1996). Celui-ci stipule qu'une analyse physico-chimique ou microbiologique sur le lait ou sur un produit laitier, effectuée dans le cadre du marché communautaire doit utiliser une méthode figurant sur cette liste. La plupart des méthodes répertoriées ici sont donc, logiquement, des méthodes FIL ou ISO. Certaines se réfèrent à des règlements européens. Enfin, pour certaines analyses très particulières (lécithine dans le beurre concentré,

lactosérum acide dans le lait écrémé en poudre, par ex.), le texte renvoie à une « méthode approuvée par l'autorité compétente »

Règlements n° 1798/96 du 17.9.1996 et n° 1742/96 du 6/9/1996 de la Commission, modifiant respectivement l'annexe III et les annexes I, II et III du règlement n° 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus (LMRs) de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. (JO CE L 236 du 18/9/1996 et L 226 du 7/9/1996)

Ces textes complètent la liste des substances organiques non soumises à un limite maximale de résidus (annexe II). Ils complètent également la liste des LMRs avec différents agents antiparasitaires, à savoir l'amebazine, l'albendazole et l'oxibendazole avec des LMRs respectivement de 10 µg, 100 µg et 50 µg/kg de lait.

Décision du 29/7/1996 de la Commission établissant la liste des produits à base de lait pour lesquels les Etats membres sont autorisés à accorder des dérogations individuelles ou générales au titre de l'article 8, paragraphe 2 de la directive 92/46/CEE, ainsi que la nature des dérogations applicables à la fabrication de ces produits.

Ce texte précise la notion de produit à base de lait présentant des caractéristiques traditionnelles. Il s'agit soit de produits reconnus historiquement, soit fabriqués traditionnellement selon des méthodes référencées dans l'Etat membre d'où ils sont originaires, soit protégés par une loi nationale, régionale ou locale dans leur Etat d'origine.

Pour les établissements fabriquant ce type de produits, les états membres sont autorisés à accorder des dérogations à titre individuel ou général. Ces dérogations concernent la nature des matériaux composant les équipements de préparation, de conditionnement ou d'emballage. Dans le cas des fromages présentant des caractéristiques traditionnelles, ces dispositions s'étendent de plus à la nature des revêtements des salles de maturation et des caves d'affinage.

DU COTE DE LA BIBLIO

Cette fois encore, nous vous fournissons en annexe la liste complète des références intégrées dans notre base de données sur les techniques analytiques laitières au cours du dernier trimestre.

Si vous souhaitez obtenir des précisions sur ces références, ou la copie d'un document signalé, n'hésitez pas à prendre contact avec nous...