



Qualification de l'appareil MIRIS-HMATM pour l'analyse du lait maternel

**Réunion de printemps de ADLF
Lyon, les 22 & 23 juin 2017**

Ph Trossat & JR Bondier
ACTALIA CECALAIT



Sommaire

- Présentation du principe infra rouge
- Présentation du matériel
- Présentation du protocole de qualification
- Résultats (Ex MIRIS 1)
- La prochaine étape : le suivi des instruments

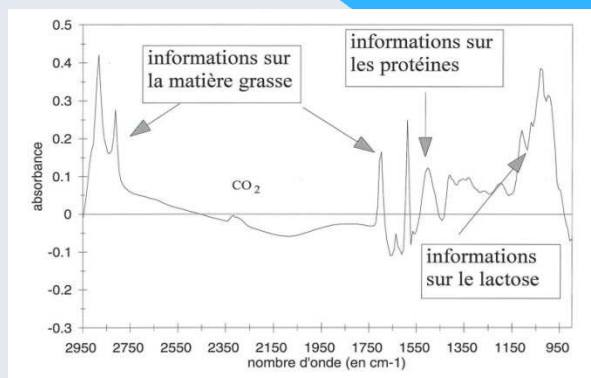


Pourquoi une qualification ?

- Connaitre les performances et la capacité de l'appareil
- Valider les prescriptions constructeurs
- Statuer sur l'aptitude à l'emploi au regard des objectifs d'utilisation de l'appareil et d'interprétation des résultats
- Définir les modalités d'utilisation de l'instrument (validation des conditions analytiques et de suivi)

Principe de fonctionnement

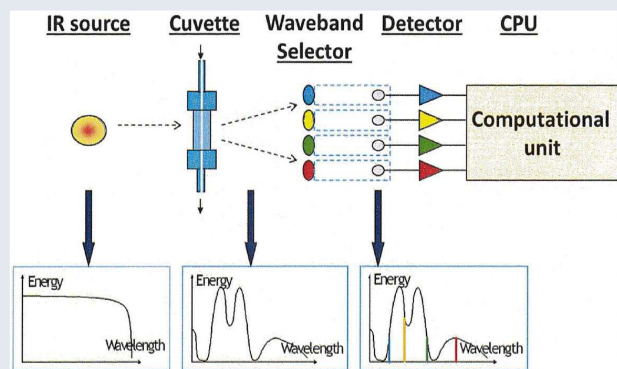
- Basé sur un principe de spectroscopie dans le moyen infra – rouge (2 à 10 μm)
- Absorbance de groupements fonctionnels à des longueurs d'onde spécifiques
- Absorbance proportionnelle à la quantité du groupement « mesuré »



Ex de spectre dans le MIR de lait de ruminant

L'appareil

- Une lumière infra rouge (lampe) va éclairer l'échantillon au travers d'une cuvette (50 μ m) contenant l'échantillon et on va mesurer l'absorbance à 3 longueurs d'onde « spécifiques » : $\lambda=5,7 \mu\text{m}$ (MG), $\lambda=6,5 \mu\text{m}$ (MP) et $\lambda=9,6\mu\text{m}$ (Hydrates de Carbone) et une λ de référence.
- Prédiction via un modèle de calibrage de base (régression multiple) de la teneur en matière grasse, matière protéique, « hydrates de carbone » (matière sèche par calcul).



Son fonctionnement

- Chauffage des échantillons à 40 °C
- Traitement aux ultra sons du lait (à l'aide d'un sonicateur) pour diminuer la taille des globules gras (éliminer les interférences optiques dues à leur taille)
- Analyse de l'échantillon ainsi préparé





Le protocole de qualification

- 2 appareils évalués (MIRIS 1 et 2 du Lactarium de Bordeaux / Marmande)
- Basé sur les documents normatifs relatif à l'évaluation des appareils infra rouge dans le lait de ruminant (ISO 8196-3)
 - Stabilité intra-jour
 - Etude de la linéarité instrumentale
 - Contamination entre échantillons (COE)
 - Répétabilité / Justesse (sur différentes « matrices »)
 - laits crus individuels crus (35)
 - laits pasteurisés individuels (35)
 - laits crus « poolés » (3 donneuses) (35)
 - laits pasteurisés « poolés » (3 donneuses) (35)
 - laits lyophilisés (35) (résultats non présentés)
- Critères : matière grasse (MG), matière protéique (MP) et Carbohydrates (CH) : lactose + oligosaccharides

La réalisation des essais

- La configuration des appareils était la suivante :
 - Logiciel version 2.87
 - Calibrage « Lait homogénéisé »
 - Avant analyse, chauffage au bain marie des échantillons (40 °C – 20 min) et sonication (1,5 sec/ml).
 - Analyse en double consécutif 4 ml de lait (3 + 1)
- Les essais ont été réalisés de fin 2016 à mars 2017 (par « matrice » pour l'étude de répétabilité et justesse)

Résultats des essais - Stabilité

- Objectif : Vérifier la stabilité intra-jour
- Protocole : Analyse de 3 échantillons en double à différents niveaux toutes les 15 min sur une période de 5 h (20 séquences environ)

Paramètre	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
MG	0,98	4,70	8,54
MP	1,13	2,53	3,86
HC	5,33	6,45	7,52

- Calcul de la répétabilité (Sr) et de la reproductibilité intra jour (SR_{intra}) de l'instrument

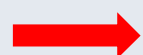
SR	MG	MP	CH
Niveau 1	0,0487	0,0606	0,0555
Niveau 2	0,0628	0,0618	0,0618
Niveau 3	0,0589	0,0629	0,0522

➔ Stabilité intra jour du même ordre que les prescriptions MIRIS (<005 pour MG et MP et < 0,08 pour CH (équivalent à $\pm 0,1$ pour MG et MP et $\pm 0,16$ g/100 ml pour CH au cours d'une journée)

Résultats des essais - COE

- Objectif : Vérifier l'absence de contamination de l'échantillon par l'échantillon n-1 (contamination fluide)
- Protocole : Analyse d'une séquence LL1-LL2-LH1-LH2 , 20 fois sur 3 niveaux de composition – analyse en simple volume de 3ml de lait
- Calcul du taux de contamination ($C_{H/L}$ Haut vs Bas)

NIVEAU	$C_{H/L}(\%)$ MG	$C_{H/L}(\%)$ MP	$C_{H/L}(\%)$ HC
1	1,18	0,84	1,52
2	0,83	1,06	1,00
3	0,94	0,77	1,24



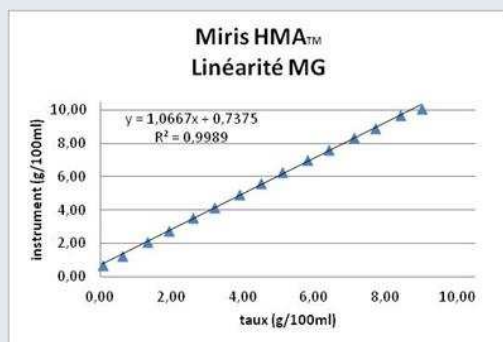
$C_{H/L} < 2 \%$ pour tous les paramètres et les niveaux (valide le volume initial de 3 ml de lait)

Résultats des essais - Linéarité

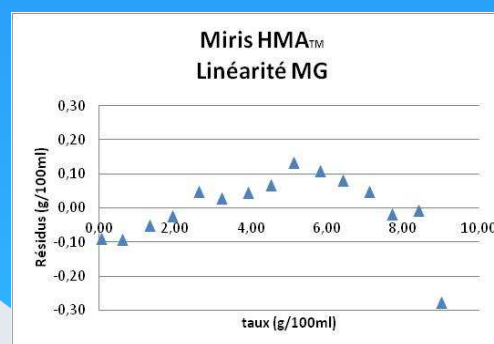
- Objectif : Vérifier la proportionnalité entre le résultat de l'appareil et la concentration du composant mesuré (nécessaire car le calibrage est effectué par le biais d'une régression linéaire)
- Protocole : Analyse de 15 laits à concentrations différentes (dilutions réalisées par pesées) pour les 3 composants majeurs (MG, MP et CH)
- Calcul par régression linéaire simple (résultats appareils et % de dilution théorique) du ratio A_r/A_t : amplitude des résidus / amplitude des taux

Résultats des essais – Linéarité

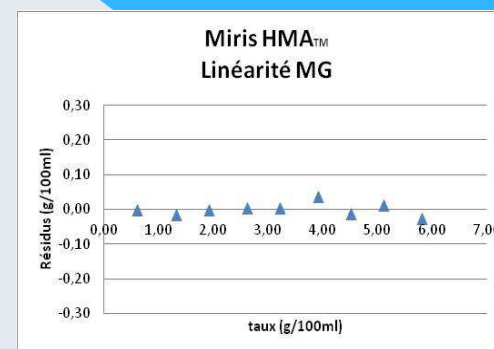
Exemple de la MG



Régression sur toute la gamme
de 0 à 10 g/100 ml



Résidus à la
régression de 0
à 10 g/100 ml



Résidus à la
régression de 0
à 6 g/100 ml

➔ Appareil linéaire de 0 à 6 g / 100 ml (vs plage de mesure MIRIS 0 à 5,9)



Résultats des essais – Linéarité

- Plage de linéarité en MP

➡ Appareil linéaire de 0,6 à 2,4 g / 100 ml (vs plage de mesure MIRIS 0,6 à 2,4)

- Plage de linéarité en CH

➡ Appareil linéaire de 5,0 à 7,4 g / 100 ml (vs plage de mesure MIRIS 4,0 à 8,0)



Résultats des essais - Répétabilité

- Objectif : Qualifier la répétabilité de l'instrument sur les 3 critères
- Protocole : Analyse en double consécutif des 5 séries de laits (matrices)
- Calcul de l'écart type de répétabilité S_r et r (écart maximum entre double) par « matrice » et en global

Résultats des essais – Répétabilité

Exemple du lait « poolé cru »

MIRIS 1	N	Min	max	M	S _r	S _{r%}	r
MG (g/100ml)	35 (34)	1,82 (1,82)	4,26 (4,26)	2,93 (2,95)	0,064 (0,026)	2,18% (0,87%)	0,18 (0,07)
MP (g/100ml)	35 (31)	0,82 (0,88)	1,43 (1,43)	1,05 (1,07)	0,015 (0,005)	1,45% (0,46%)	0,04 (0,01)
HC (g/100ml)	35 (34)	6,97 (6,97)	7,47 (7,47)	7,24 (7,24)	0,016 (0,013)	0,22% (0,19%)	0,04 (0,04)



**Pour tous les paramètres, confirmation des prescriptions MIRIS
Satisfaction aux valeurs annoncées par le constructeur ($S_r < 0,05$
pour MG et MP et $< 0,08$ pour CH) (avec élimination statistique de
résultats « aberrants »)**

Résultats des essais – Répétabilité

Résultats toutes matrices confondues

MIRIS 1	MG	MP	CH
n	127	117	127
min	0,6100	0,6300	6,7450
max	4,8900	1,5350	7,5600
M	2,9209	0,9997	7,2232
Sr	0,018	0,005	0,014
Sr(%)	0,63%	0,50%	0,19%
r	0,05	0,01	0,04

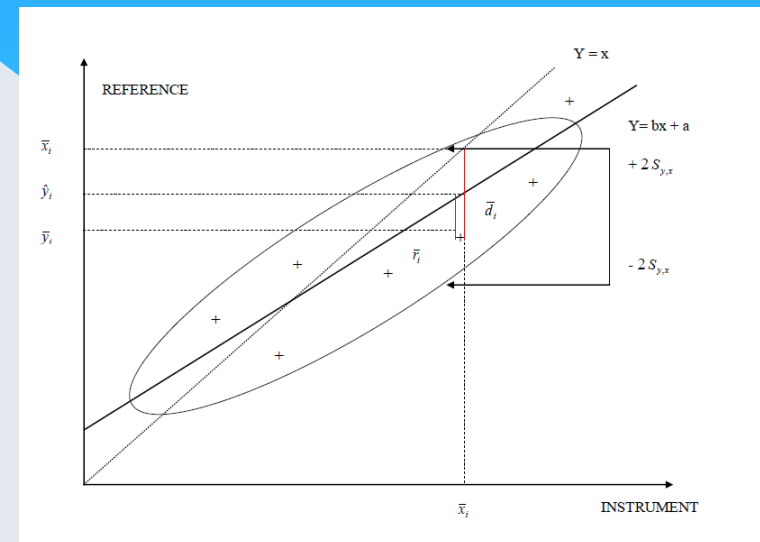


- Pas d'effet significatif « matrice » et calcul des performances de répétabilité tous échantillons confondus
- Confirmation des prescriptions MIRIS (avec élimination statistique de valeurs aberrantes)

Résultats des essais - Justesse

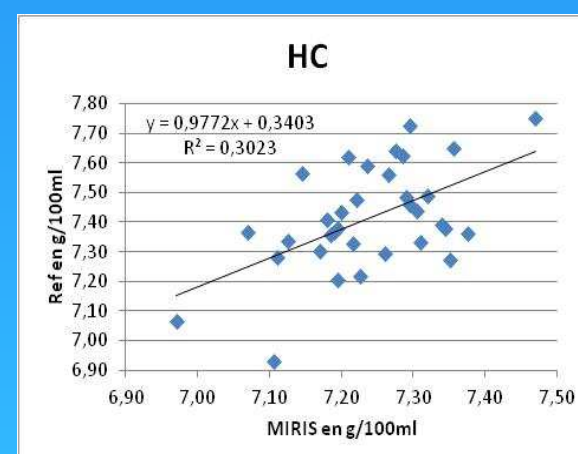
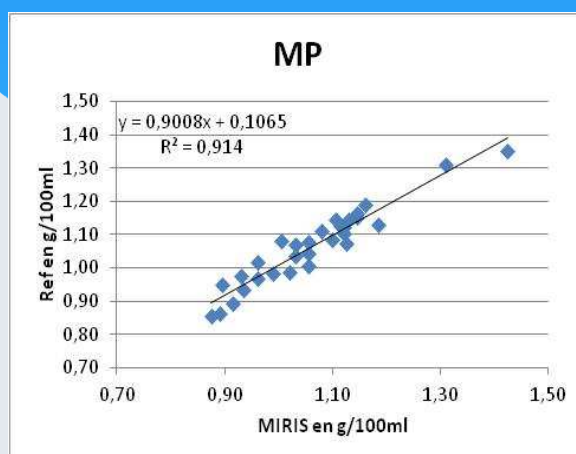
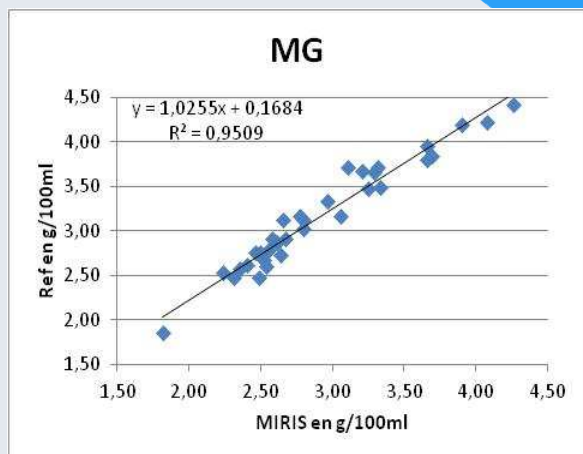
- Objectif : Comparaison de la valeur instrumentale (moyenne des doubles) à la valeur obtenue par la méthode de référence:
 - MG : NF EN ISO 1211 (méthode Rose Gottlieb)
 - MP : NF ISO 8968-1 et -4 (méthode Kjeldahl)
 - CH : méthode par calcul : MS-MG-MAT- M minérales (cendres)

- Calcul par régression linéaire simple de la pente et l'ordonnée à l'origine de régression (**b et a**), de l'écart type résiduel (**S_{y,x}**) et de la précision d'estimation (**PE**) de la méthode instrumentale (**± 2.S_{y,x}**)



Résultats des essais – Justesse

Lait cru « poolés »

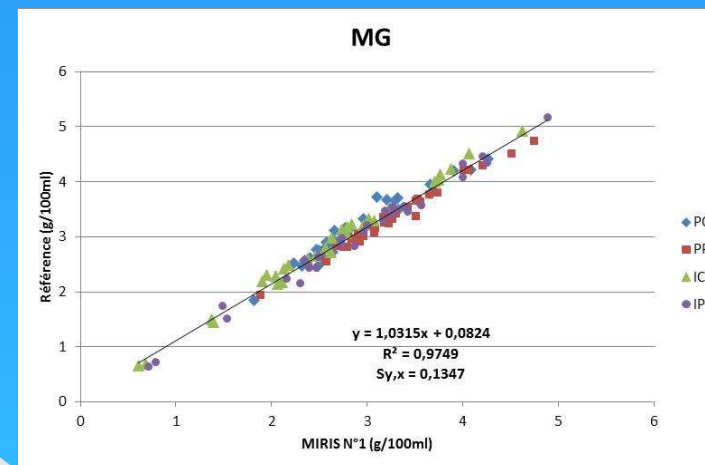


- ➔
- MG : PE $\pm 0,27$ g/100 ml ($\pm 9,2$ %) vs prescriptions MIRIS ± 12 %
 - MP: PE $\pm 0,07$ g/100 ml ($\pm 6,5$ %) vs prescriptions MIRIS ± 12 %
 - CH: PE $\pm 0,30$ g/100 ml ($\pm 4,2$ %) vs prescriptions MIRIS ± 15 %

Résultats des essais – Justesse

MG toutes matrices

Paramètre	Matrice	Sr	d	Sy,x	b	a
MG	PC	0,064 (0,026)	-0,248 (-0,243)	0,192 (0,137)	1,0255	0,1684
	PP	0,018	-0,081 (-0,082)	0,122 (0,070)	1,0012	0,0783
	IC	0,021	-0,252	0,091	1,0862	0,0276
	IP	0,023 (0,012)	-0,130 (-0,120)	0,119 (0,111)	1,0656	-0,677
	Globale			0,1347	1,0315	0,0824

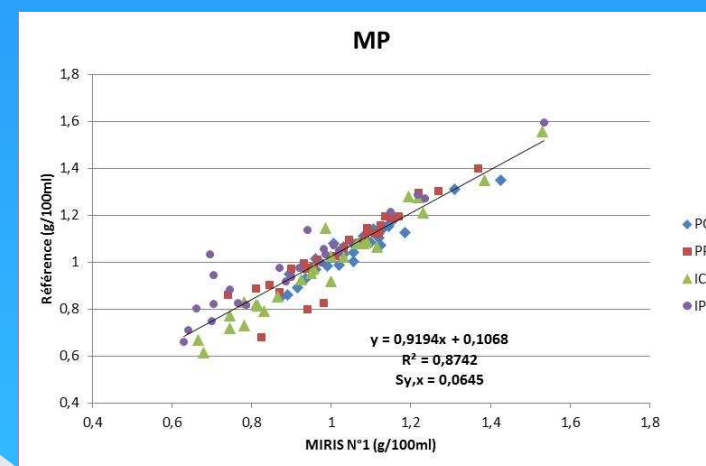


- Possibilité d'analyser toutes les matrices sur le même calibrage (déprécie légèrement la performance mais cela reste correct)
- Modèle proposé est correctement ajusté (peu différent de 1 et 0)
- PE globale $\pm 0,27$ g / 100 ml ($\pm 9,2$ %) vs prescriptions MIRIS ± 12 %

Résultats des essais – Justesse

MP toutes matrices

Paramètre	Matrice	Sr	d	Sy,x	b	a
MP	PC	0,015 (0,005)	-0,015 (-0,001)	0,052 (0,034)	0,9008	0,1065
	PP	0,026 (0,008)	-0,025 (-0,021)	0,093 (0,063)	1,0369	-0,0163
	IC	0,005	0,057 (-0,003)	0,167 (0,049)	1,0364	-0,0322
	IP	0,062 (0,007)	-0,082 (-0,089)	0,099 (0,074)	0,8826	0,1949
	Globale			0,0645	0,9194	0,1068

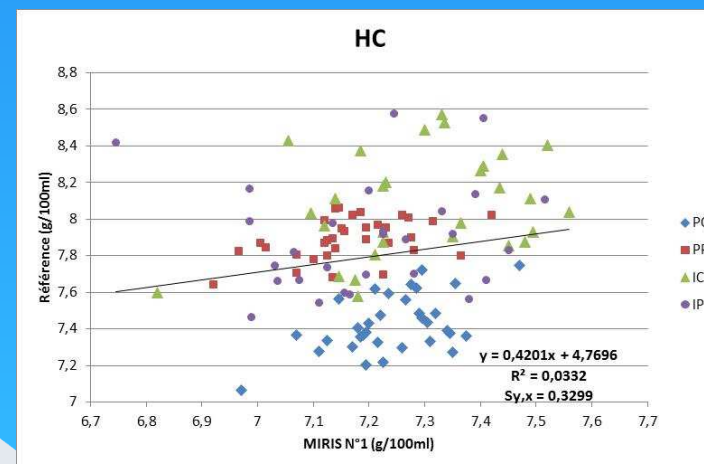


- ➔
- Possibilité d'analyser toutes les matrices sur le même calibrage (déprécie légèrement la performance mais cela reste correct)
 - Le modèle de base proposé nécessite d'être ajusté ($b = 0,92$)
 - PE globale $\pm 0,13$ g / 100 ml ($\pm 12,9$ %) vs prescriptions MIRIS ± 12 %

Résultats des essais – Justesse

CH toutes matrices

Paramètre	Matrice	Sr	d	Sy,x	b	a
HC	PC	0,016 (0,013)	-0,176 (-0,175)	0,148 (0,150)	0,9772	0,3403
	PP	0,029	-0,733 (-0,717)	0,148 (0,107)	0,3603	5,3045
	IC	0,010	-0,816 (-0,786)	0,315 (0,273)	0,5230	4,2632
	IP	0,042 (0,017)	-0,683 (-0,700)	0,291 (0,300)	0,1243	7,0008
	Globale			0,3299	0,4201	4,7696



- Globalisation des différentes matrices dans le même calibrage déprécie fortement la performance (PE globale $\pm 0,66$ g/100 ml ($\pm 9,1$ %) vs prescriptions MIRIS ± 15 %)
- ➔ - Erreur du même ordre que la variabilité naturelle
- Effet matrice significatif (lien avec le traitement)
- Méthode de référence par calcul présentant une performance médiocre

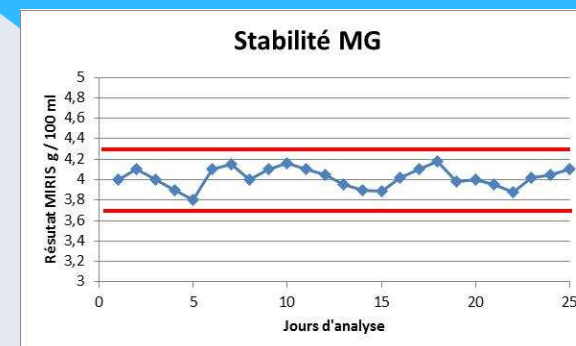
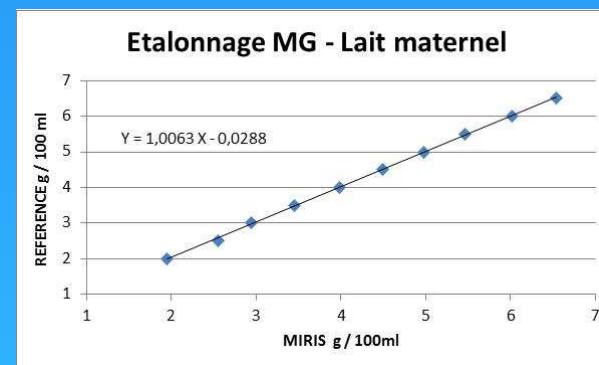
La qualification est une 1^{ère} étape

- La qualification est nécessaire mais pas suffisante pour assurer la qualité des déterminations en routine
- Un suivi de l'instrument est absolument nécessaire en routine (système d'étalonnage et de vérification)



Un suivi type

- Etalonnage de l'instrument à l'aide d'une gamme de lait « étalon » (6 à 8 échantillons) : calculer les paramètres de calibrage en externe (Excel) et ajuster si nécessaire,
- Suivi de stabilité : analyser un lait pilote quotidien pour suivre la réponse instrumentale, comparer la valeur observée à la valeur cible (carte de contrôle avec limites établies)



Conclusions

- Confirmation des prescriptions MIRIS sur la stabilité et la linéarité (sauf pour les CH pour ce dernier point)
- Répétabilité conforme aux spécifications MIRIS mais analyse en double nécessaire (avec fixation d'une limite de répétabilité entre double)
- Justesse MG et MP satisfaisante au regard des objectifs recherchés
- Justesse CH du même ordre que la variabilité naturelle rencontrée (résultat à titre indicatif)
- Nécessité d'ajuster le modèle de base pour MP et à moindre mesure pour MG
- Performances globales des 2 instruments testés en accord avec néanmoins des différences d'ajustement (équation finale de calibrage)



à D Lamireau, MC Beauvieux
et J Gonzalez



**Merci de votre
attention**