

EVALUATION : LE FOSSOMATIC 5000

Le Fossomatic 5000 est un appareil automatique de dénombrement des cellules somatiques dans le lait fabriqué par la société FOSS ELECTRIC utilisant la méthode fluoro-opto-électronique. Ses caractéristiques instrumentales et analytiques ont été évaluées par CECALAIT.

Les caractéristiques instrumentales de base sont correctes : stabilité, traçage et contamination. La linéarité de l'appareil est bonne jusqu'à 2200×10^3 cellules/ml. Les valeurs de répétabilité et de justesse sont conformes aux exigences réglementaires. Cet appareil a reçu l'agrément officiel du ministère de l'agriculture pour le paiement du lait après une phase de confirmation en condition de routine dans deux laboratoires interprofessionnels.

Le Fossomatic 5000 est un appareil automatique de dénombrement des cellules somatiques dans le lait fabriqué par la société Foss Electric utilisant la méthode fluoro-opto-électronique. Il a été évalué par CECALAIT au laboratoire de physico-chimie pendant le mois de décembre 1995, à Poligny. Des analyses comparatives avec le Fossomatic 400 ont été réalisées au Laboratoire Départemental du Jura (LDA 39).

DESCRIPTION

Il fonctionne selon le schéma suivant : l'échantillon prélevé automatiquement est dilué dans un mélange réactif, solution tamponnée de triton X100 de manière à en disperser les globules gras et de bromure d'éthidium pour colorer les noyaux des cellules somatiques. Une partie aliquote de la suspension cellulaire colorée est injectée dans un fluide vecteur en écoulement laminaire dans un capillaire. Les cellules séparées par le flux sont exposées au faisceau d'une lampe halogène au niveau d'un objectif microscopique. Les impulsions lumineuses émises par la fluorescence des cellules ayant fixées le colorant sont amplifiées au niveau du photomultiplicateur. Le calcul de la numération cellulaire se fait selon la méthode dite « à seuil variable » : lors de chaque analyse, le système détermine, à partir de la distribution de fréquence des impulsions en fonction de leur intensité, un seuil individuel d'intensité à partir duquel toute impulsion est prise en compte.

L'appareil est asservi à un micro-ordinateur qui assure le pilotage complet de l'instrument et le traitement du signal.

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.

Il n'existe pas encore de norme française (actuellement à l'état de projet), ni de directives officielles (J.O.) pour le paiement du lait et le contrôle laitier en matière de comptage cellulaire, référence sera donc faite aux normes FIL 148A:1995 et FIL 128:1985.

❶ EVALUATION DE LA STABILITE DE L'APPAREIL

Elle a été réalisée par analyse en mode automatique de 2 laits en double, toutes les 20mn, au cours d'une demi-journée de travail

dans les conditions réelles d'un laboratoire interprofessionnel; ceci représentant 12 cycles de mesure.

Afin d'évaluer la stabilité de l'instrument, un calcul de la répétabilité et de la reproductibilité a été effectué selon le procédé utilisé classiquement lors des essais interlaboratoires (FIL 135B).

Les résultats montrent une bonne stabilité de l'instrument sur la période testée, puisque l'écart-type de reproductibilité relatif (SR%) est de l'ordre de 3%, nettement inférieur à 5 %, valeur maximale acceptée dans la norme FIL 148A:1995 comme coefficient de variation des dénombrements du même lait témoin au cours d'une journée.

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 et d'eau distillée, selon la séquence « lait - lait - eau - eau », répétée 10 fois. Ce test a été effectué sur 3 laits de niveaux cellulaires différents, avec des réglages appareil réalisés par la société Foss Electric et un coefficient de traçage fixé à 0. Le taux de contamination a été estimé par la formule :

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

Le système Fossomatic 5000 laisse apparaître des contaminations entre échantillons de l'ordre de 0,2% à 0,3%, quelque soit le niveau moyen des échantillons. Ce taux satisfait pleinement à la limite de 1% fixée aux méthodes rapides pour le détermination de la richesse du lait (TB et TP) utilisée dans le cadre du paiement du lait et du contrôle laitier et applicable également au comptage cellulaire dans ce même contexte.

❸ INFLUENCE DU CONSERVATEUR ET DU REFROIDISSEMENT

5 modes de conservation ont été comparés sur 24 laits individuels de vache provenant d'un élevage du Jura :

- Lait sans colorant stocké 24H à 4°C
- Lait + bronopol liquide (0.02%) stocké 24H à 4°C
- Lait + bronopol liquide (0.02%) stocké 24H à 20°C
- Lait + dichromate de potassium (0.1%) stocké 24H à 4°C
- Lait + dichromate de potassium (0.1%) stocké 24H à 20°C.

Les échantillons ont été préparés conformément aux dispositions ci-dessus dès le retour au laboratoire (1-2 heures après la traite) et conservés 24H avant d'être analysés.

Aucune différence significative n'est observée entre les laits sans conservateur et ceux additionnés de bronopol.

Une différence significative apparaît entre lait conservé avec du bronopol et celui conservé avec du dichromate de potassium, indépendamment de la température de stockage. Cet effet semble proportionnel aux taux cellulaires mais reste faible, ne dépassant pas 3% avec les laits additionnés de dichromate.

Dans le cadre de cet essai, la température de stockage pendant 24H n'a pas d'influence significative sur la numération des cellules somatiques.

④ EVALUATION DE LA LINEARITE

Une gamme de 21 laits a été réalisée par dilution Poids/Volume à partir d'un concentré cellulaire à 2200×10^3 cellules/ml et d'un filtrat exempt de cellules obtenu par microfiltration. Cette gamme de lait (0 à 2200×10^3 cellules/ml) a été analysée en mode automatique dans l'ordre croissant et décroissant des teneurs (mode répétabilité : 3 répétitions/échantillons).

Les résultats de la régression entre 0 et 2200×10^3 cellules/ml donne un écart type résiduel avoisinant 11000 cellules somatiques/ml, avec une distribution aléatoire régulière des écarts autour de la droite de régression, sans courbure apparente, ni rupture significative d'alignement.

La linéarité apparaît satisfaisante sur l'ensemble de la plage testée de 0 et 2200×10^3 cellules/ml.

⑤ EVALUATION DE LA REPETABILITE

La répétabilité a été testée en mode d'analyse automatique (précision standard) à partir de 130 laits individuels de vache, conservés avec du bronopol à 0,02%, provenant de 8 élevages et de teneurs réparties entre 0 et 3000×10^3 cellules/ml. Chaque élevage a été analysé en double selon la séquence spécifiée par la norme FIL 128 :

Ele1Rép1 / Ele1Rép2 / Ele2Rép1 / Ele8Rép1 / Ele8Rép2

A titre de comparaison, les valeurs de répétabilité ont été mesurées sur le Fossomatic 400 (Appareil LDA 39) selon des conditions opératoires identiques et sur la même population. Le tableau 1 regroupe l'ensemble des résultats obtenus.

Le Fossomatic 5000 montre une répétabilité conforme aux indications de la norme FIL 148A, avec un écart type de répétabilité relatif moyen inférieur aux 5% recommandés.

Le Fossomatic 5000 et le Fossomatic 400 présentent des valeurs de répétabilité équivalente.

Etendue (*10 ³)	FOSSOMATIC 5000					FOSSOMATIC 400				
	n	Moyenne	Sr	Sr %	r	n	Moyenne	Sr	Sr %	r
0 - 100	67	47	4.4	9.33	12.2	60	48	4.2	8.76	11.7
100 - 300	29	181	8.8	4.81	24.3	36	174	8.32	4.79	23.0
300 - 800	27	518	10.8	2.1	29.9	27	537	9.4	1.75	26
800 - 1500	4	1119	25.1	2.24	69.5	4	1050	19.5	1.85	54.1
1500 - 3000	3	1821	26.8	1.48	74.2	3	1866	8.8	0.48	24.5
0 - 3000	130	249	9.4	3.76	25.9	130	259	7.9	3.04	21.8

TABLEAU 1 : Répétabilité sur l'ensemble des laits collectés

avec \bar{n} : nombre d'échantillons
Sr % : Sr en pourcentage

Sr : écart-type de répétabilité
r : estimation de la répétabilité

⑥ EVALUATION DE LA JUSTESSE

La procédure d'évaluation est la suivante : 100 laits individuels de vache prélevés dans 8 élevages du Jura ont été analysés en double sur le Fossomatic 5000, préalablement calibré entre 0 et 800000 à l'aide de 5 échantillons commerciaux produits par CECALAIT. Ils ont ensuite été analysés en simple par la méthode de référence (FIL 148A). En cas de résidus trop important après régression, un deuxième comptage a été effectué.

L'adéquation de l'étalonnage effectué est mesurée par les paramètres de régression linéaire moyenne des écarts, pente,

écart type des écarts. La droite de régression linéaire calculée selon les moindres carrés (FIL 128) entre 0 et 3000×10^3 cellules somatiques/ml indique un bon ajustement de l'étalonnage. L'équation est la suivante :

$$\text{REF} = 0.998 * (\text{Fossomatic}) + 7.9$$

$$\text{Sx,y} = 22257 \text{ et } d = -7200$$

La justesse est estimée par les moyennes et l'écart type des écarts (appareil-référence) pour chaque tranche de taux cellulaires. Les paramètres de justesse sont définis dans le tableau 2 :

Etendue de la mesure(*1000)	n	Moyenne	d	Sd	+/- I
0 - 500	76	154	-7.2 (*)	20.2	+/- 40.4
500 - 1000	16	654	-9.1 (NS)	19.4	+/- 38.8
1000 - 2000	5	1395	-9.0 (NS)	52.2	+/- 104.4
1000 - 3000	7	1643	- 2.1 (NS)	44.8	+/- 89.6
0 - 3000	99	340	-7.2 (*)	22.3	+/- 44.6

TABLEAU 2 : Justesse du Fossomatic 5000

n : nombre d'échantillons

\bar{d} : moyenne des écarts appareil-référence

Sd : écart-type des écarts

+/- I : Intervalle de confiance pour 95% des résultats

* : significatif au seuil de 5% NS : non significatif

Le biais moyen mesuré de -7200 cellules/ml ne représente que - 2% en valeur relative et reste dans l'incertitude liée à la méthode de référence et à la précision du calibrage. La précision d'estimation de la méthode apparaît relativement constante entre 0 et 1 000 000 cellules/ml, environ +/- 40 000 cellules/ml. Elle tend à augmenter au delà, mais reste de l'ordre de +/- 100 000 entre 1 et 2 millions cellules/ml. L'écart type relatif (ou Sd%) est d'environ 3% dans les deux tranches et du même ordre que la répétabilité de l'appareil.

La comparaison des résultats de 135 échantillons individuels de vache analysés dans les mêmes conditions sur le Fossomatic 5000 et 400 (calibré avec les mêmes échantillons commerciaux CECALAIT) montre une étroite concordance avec un écart type résiduel de 15 000 sur l'ensemble de la plage testée.

Le Fossomatic 5000 présente des performances de justesse (ajustement moyen et précision d'estimation) satisfaisant aux besoins du paiement du lait et du contrôle laitier comparable aux appareils déjà utilisés dans ce contexte.

🔗 CONCLUSION GENERALE

L'appareil Fossomatic 5000 a été évalué dans le cadre d'un agrément pour le paiement du lait et du contrôle laitier. Il s'est montré conforme aux normes existantes sur les différents points testés : stabilité, traçage, linéarité, répétabilité et justesse. Ses performances de précision générales et mesurées le rendent apte à être utilisé dans un laboratoire interprofessionnel et de contrôle laitier après une étape de confirmation dans les conditions réelles d'analyses dans un laboratoire de routine.

N.B. : Depuis cette évaluation, le Fossomatic 5000 a reçu l'agrément officiel du Ministère de l'Agriculture dans le cadre du paiement du lait.

Références

FIL 128 : 1985. LAIT. Définition et évaluation de la précision globale des méthodes indirectes d'analyse du lait - Application au calibrage et au contrôle de qualité.

FIL 135B : 1991. LAIT ET PRODUITS LAITIERS. Caractéristiques de fidélité des méthodes analytiques - Schéma de conduite d'une étude collaborative.

FIL 148A :1995. LAIT. Numération des cellules somatiques du lait.

(O par. Leray et Ph. Trossat)

