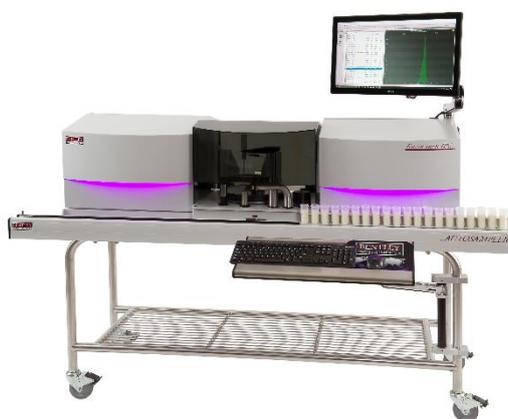


VALIDATION MICROVAL DE L'APPAREIL BACTOCOUNT™ IBC3.0 POUR LE DENOMBREMENT DES CELLULES SOMATIQUES ET DE LA FLORE TOTALE DANS LE LAIT CRU DE VACHE (2021LR97)

Le BactoCount™ IBC3.0 est un instrument automatique qui utilise la cytométrie en flux pour le dénombrement rapide, précis et fiable de la flore totale (TBC) et des cellules somatiques (SCC) dans le lait cru. Il a été développé par la société BENTLEY Instruments (États-Unis) et distribué en Europe occidentale par Bentley Instruments SARL (www.bentleyinstruments.eu). Le BactoCount™ IBC3.0 a été développé pour les laboratoires centraux d'analyse du lait et les grandes usines laitières pour le paiement du lait.

La numération de la flore totale et des cellules somatiques peut être effectuée de manière combinée ou individuelle. **Dans le cadre de la validation, les SCC et les TBC ont été testés séparément.**

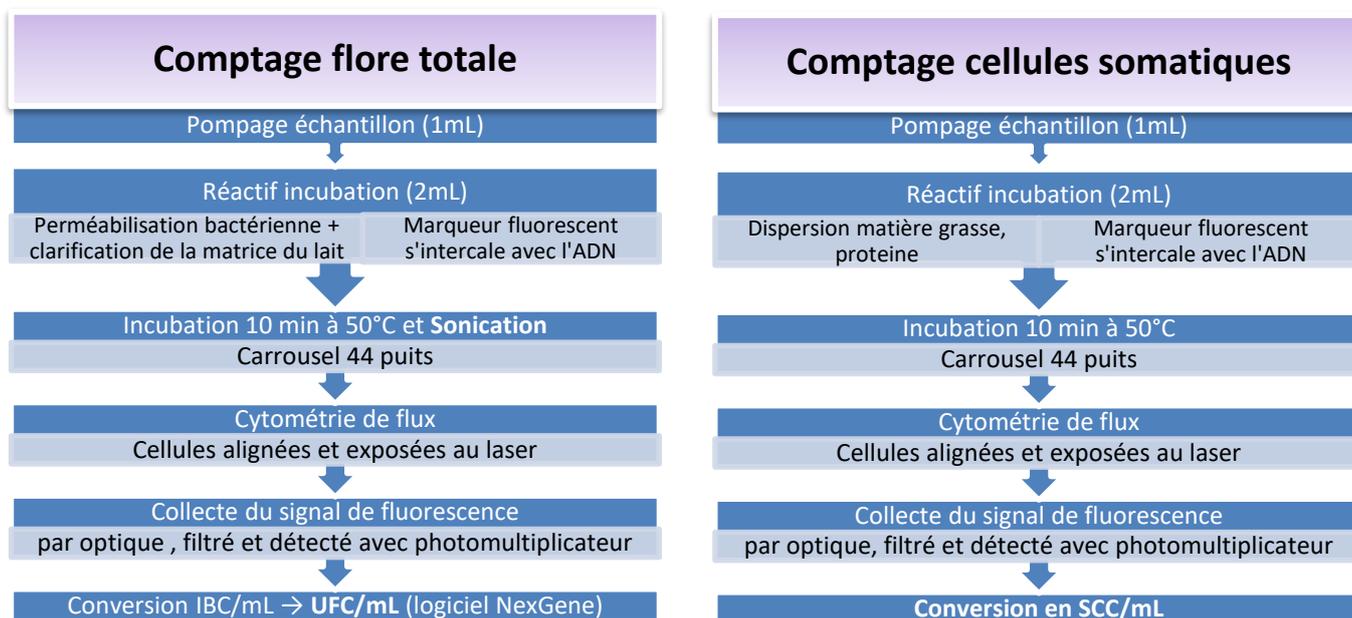
ACTALIA Cecalait a été choisi comme laboratoire expert pour mener l'étude de validation MicroVal sur cet appareil (Numéro de validation 2021LR97). Ce document est une synthèse des résultats obtenus lors de l'étude de validation.



PRINCIPE DE LA METHODE ALTERNATIVE

Le protocole de la méthode alternative est basé sur le **principe de cytométrie en flux**, où le contenu en ADN des cellules (cellules somatiques ou bactéries) est coloré avec un marqueur fluorescent, puis détecté par un signal de fluorescence. Ce signal est finalement converti en unité universelle grâce au logiciel NexGen de Bentley.

Le BactoCount™ IBC3.0 peut analyser jusqu'à 200 échantillons/heure en utilisant un carrousel de **44 puits** et un **échantillonneur à rack**.



PRINCIPE ET CONDITIONS DE LA VALIDATION

L'étude de validation a été réalisée conformément aux normes ISO 16140-2, ISO 16297, ISO 21187 pour les TBC et aux normes ISO 16140-2, ISO 8196-3, ISO 13366-2 pour les SCC. Les critères définis dans les documents EU-RL MMP ont également été pris en compte.

L'étude comparative des méthodes menée pour la validation MicroVal était divisée en deux parties principales :

- **L'évaluation des performances préliminaires** de l'appareil (stabilité, effet de contamination entre échantillons, linéarité et limite de quantification);

- **L'évaluation de la répétabilité et de la justesse** de l'appareil.

Les caractéristiques de performance de la méthode alternative ont été évaluées à partir d'échantillons de lait calibrés :

- Pour les TBC, un lait cru de vache a été contaminé avec une souche de *Lactococcus lactis* pour obtenir des concentrations spécifiques de la flore totale. Chaque échantillon de lait a été utilisé dans la journée et n'a pas été conservé pour une utilisation ultérieure. Les échantillons de lait ont été placés entre 0 et +4°C avant la mesure ;

- Pour les SCC, un lait cru de vache a été écrémé et microfiltré pour obtenir 2 suspensions : une avec une concentration élevée (concentré) et une avec une concentration faible (filtrat) en cellules somatiques (selon ISO 13366-2). Une gamme d'échantillons a été préparée pour avoir une concentration spécifique de cellules somatiques. Chaque échantillon de lait a été utilisé dans la journée et n'a pas été conservé pour une utilisation ultérieure. Les échantillons de lait ont été placés dans un bain-marie à $40 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 20 minutes avant la mesure.

La répétabilité et la justesse de l'instrument ont été évaluées sur des échantillons de lait cru de vache de troupeau pour les TBC et en utilisant des échantillons de lait de vache cru individuels et de troupeau pour les SCC.

Concernant les tests de justesse, les résultats obtenus avec la méthode alternative ont été comparés aux résultats obtenus avec les appareils Bentley déjà validés :

- BactoCount™ IBC2.0 pour les TBC (certifié MicroVal ; certificat n°2013 LR 44);
- SomaCount™ FC pour les SCC (certifié ICAR selon ISO 8196-3 ; certificat n°2020/7).

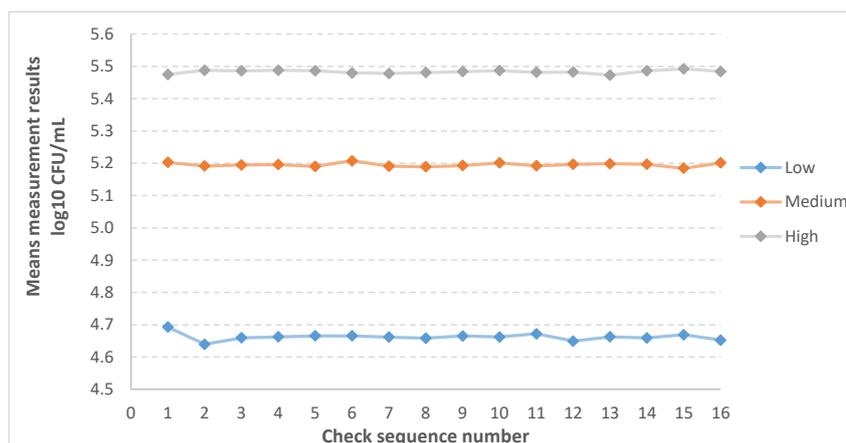
1. EVALUATION DE LA STABILITE, DE L'EFFET DE CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS, DE LA LINEARITE ET DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION

1.1 – Stabilité

La stabilité de la méthode alternative a été vérifiée en imitant les conditions de tests de routine tout au long d'une journée de travail. Pour évaluer la stabilité de l'instrument, des échantillons de lait calibrés ont été analysés toutes les 15 à 20 minutes au cours d'une journée de travail. Les concentrations des échantillons calibrés utilisés dans l'étude de stabilité sont répertoriées dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Niveaux de TBC et de SCC des échantillons utilisés pour l'évaluation de la stabilité

Niveau	TBC (Log ₁₀ UFC/ml)	SCC (x10 ³ /ml)
Bas	4.7	73
Moyen 1	5.2	492
Moyen 2	-	996
Haut	5.5	1439



A

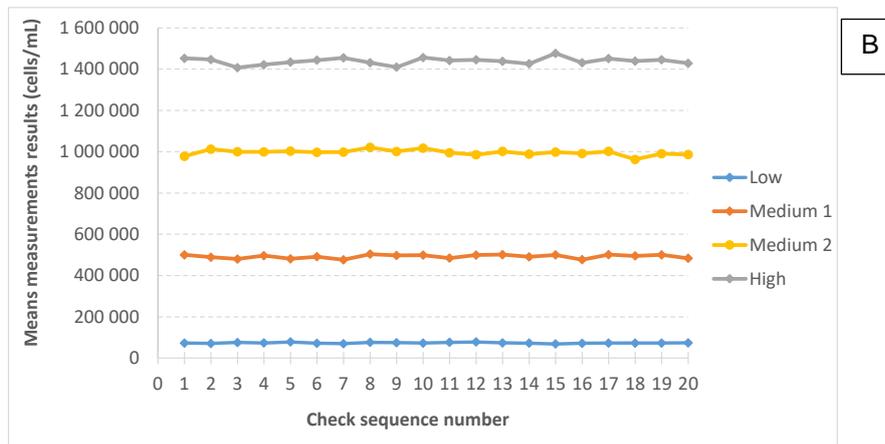


Figure 1 : Stabilité du BactoCount™ IBC3.0 pour les TBC (A) et les SCC (B) tout au long de la journée de travail

Pour chaque niveau, l'écart type de répétabilité (S_r) et l'écart type de reproductibilité journalier ($S_{R,jour}$) ont été déterminés (**Tableau 2**). Tous les résultats étaient inférieurs aux limites d'acceptabilité définies dans la norme ISO 16297 et le document EU-RL MMP pour les TBC et aux limites définies dans la norme ISO 8196-3 pour les SCC.

Tableau 2 : Résultats de stabilité du BactoCount™ IBC3.0 pour les TBC et les SCC

		S_r	$S_{R,jour}$
TBC (Log_{10} UFC/ml)	Niveau bas	0.03	0.03
	Niveau moyen	0.01	0.01
	Niveau haut	0.01	0.01
SCC ($\times 10^3$ cells/ml)	Niveau bas	4.8	4.8
	Niveau moyen 1	11.9	13.2
	Niveau moyen 2	18.9	20.3
	Niveau haut	22.3	24.4

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de la stabilité montrent que le BactoCount™ IBC3.0 est stable pendant la journée de travail pour le comptage de la flore totale et des cellules somatiques dans le lait cru de vache.

1.2 – Effet de contamination entre échantillons

De fortes différences dans les niveaux de bactéries ou de cellules entre deux échantillons analysés successivement peuvent influencer le résultat du deuxième. Un effet de transfert peut se produire dans les instruments dotés de systèmes à flux continu. Il est lié au transfert d'une certaine partie d'un échantillon vers l'échantillon suivant ou ultérieur.

Pour évaluer l'effet de transfert de l'instrument, des échantillons de lait calibrés ont été préparés : 4 niveaux pour les TBC (proche de 50/150/300 et $1\ 500 \times 10^3$ UFC/mL) et 3 niveaux pour les SCC (proche de 500/1 000 et $1\ 500 \times 10^3$ cellules/mL). Ces laits ont été analysés alternativement avec des échantillons de lait « blanc ». L'effet de contamination déterminé reflète la contamination du lait élevé sur le lait blanc mesuré juste après. Il a été évalué et calculé selon la norme ISO 8196-3 (**Tableau 3**). L'effet de contamination entre échantillons calculé est inférieur à la limite de 1 % pour les TBC et inférieur à la limite de 2 % pour les SCC.

Tableau 3 : Effet de contamination d'échantillons de lait élevés (3 ou 4 niveaux de concentration) sur des échantillons de lait « blanc » déterminés pour les TBC et les SCC

	Effet de transfert (%)	
	TBC	SCC
Niveau 1	0.91 %	0.69%
Niveau 2	0.74 %	0.59%
Niveau 3	0.65 %	0.44%
Niveau 4	0.45 %	-
Total	0.69 %	0.53%

Les résultats de l'évaluation de l'effet de contamination entre échantillons répondent aux exigences de la norme ISO 16297 pour les TBC et de la norme ISO 8196-3 pour les SCC.

1.3 – Linéarité et limites de quantification

Pour les TBC, la linéarité du BactoCount™ IBC3.0 a été évaluée sur la plage de 5×10^2 à 5×10^6 UFC/mL avec des échantillons de lait calibrés (**Figure 2**).

Pour les SCC, la linéarité a été évaluée de 0 à $2\,500 \times 10^3$ cellules/mL avec des échantillons de lait calibrés (**Figure 2**).

Avec un ratio calculé (r_L) de **3,2 %** pour les TBC et un ratio (r_C) déterminé à **0,76 %** pour les SCC, l'instrument respecte les limites respectivement définies dans les normes ISO 16297 (< 5 %) et ISO 8196-3 (< 2 %).

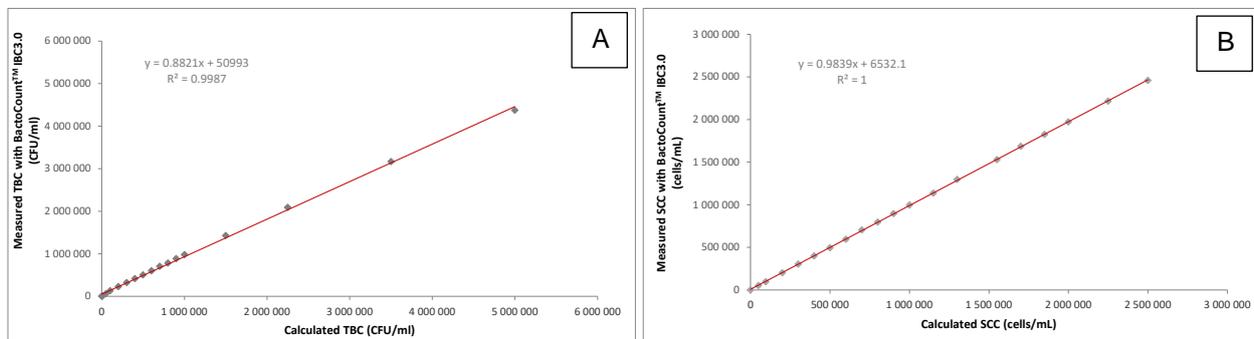


Figure 2 : Linéarité du BactoCount™ IBC3.0 pour la mesure des TBC (A) et SCC (B)

Pour les TBC, la limite inférieure de quantification a été définie à 5 000 UFC/mL et les mesures sont linéaires jusqu'à 5×10^6 UFC/mL.

Pour les SCC, la limite inférieure de quantification a été définie à 10 000 cellules/mL et les mesures sont linéaires jusqu'à $2\,500 \times 10^3$ cellules/mL.

2. EVALUATION DE LA REPETABILITE

La répétabilité de l'appareil a été évaluée en analysant :

- **Pour les TBC** : **250 échantillons de lait cru de vache de troupeau** représentatifs de différents niveaux de numération de la flore totale.
- **Pour les SCC** : **135 échantillons individuels de lait cru de vache** et **67 échantillons de lait cru de vache de troupeau** représentatifs de différents niveaux de numération des cellules somatiques.

Pour les SCC, l'instrument a été pré-calibré à l'aide des matériaux de référence cellules somatiques d'ACTALIA Cecalait.

Tous les échantillons ont été mesurés en double ($n = 2$) avec le BactoCount™ IBC3.0. Pour l'interprétation des résultats, les échantillons ont été triés selon différentes plages de concentrations en flore totale et cellules somatiques (plages définies respectivement dans l'ISO 16297 et l'ISO 13366-2). L'écart type de répétabilité (S_r) ou la répétabilité (r) ont été calculés pour chaque niveau de comptage (**Tableau 4**).

Tableau 4 : BactoCount™ IBC3.0 - Critères de répétabilité pour le nombre total de bactéries et le nombre de cellules somatiques

		Nombre d'échantillons	Niveau moyen des échantillons	S_r / r	Valeurs d'acceptabilité (ISO 16297 ou ISO 13366-2)
TBC (Log ₁₀ UFC/ml)	<4.3	85	4.0	0.07	0.12
	≥4.3	165	4.9	0.05	0.09
SCC (x10 ³ cellules/ml)	0-150	143	60	15	25
	150-300	36	205	22	42
	300-450	11	355	29	50
	450-750	8	571	28	63
	750-1500	4	960	29	126
	Total	202	140	18	-

La répétabilité du BactoCount™ IBC3.0 pour les TBC et les SCC est respectivement conforme aux exigences de la norme ISO 16297, du document EU-RL MMP et de la norme ISO 13366-2.

3. EVALUATION DE LA JUSTESSE

La justesse de l'appareil a été évaluée en utilisant :

- Pour les TBC : **246 échantillons de lait cru de vache de troupeau sans conservateur**
- Pour les SCC : **134 échantillons individuels de lait cru de vache conservés avec du bronopol et 66 échantillons de lait cru de vache de troupeau sans conservateur.**

Tous les échantillons ont été mesurés en double ($n = 2$) avec la méthode alternative et la méthode d'ancrage (BactoCount™ IBC2.0 pour les TBC / SomaCount™ FC pour les SCC). Les résultats obtenus avec les 2 méthodes ont été représentés (Figure 3 et Figure 4) et l'écart type résiduel ($S_{y,x}$) a été calculé.

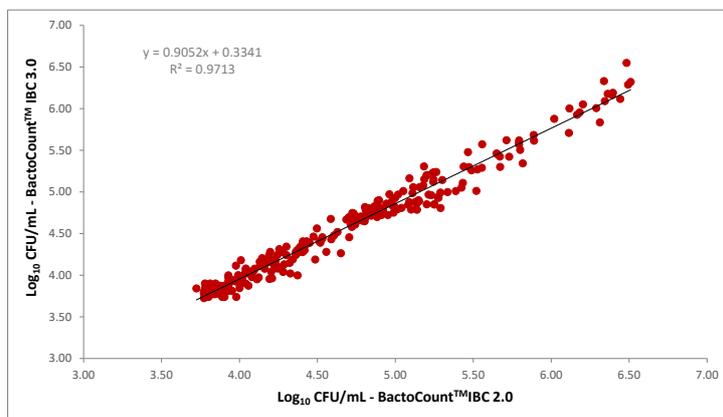


Figure 3 : Relation entre les résultats du BactoCount™ IBC3.0 et du BactoCount™ IBC2.0 pour les TBC

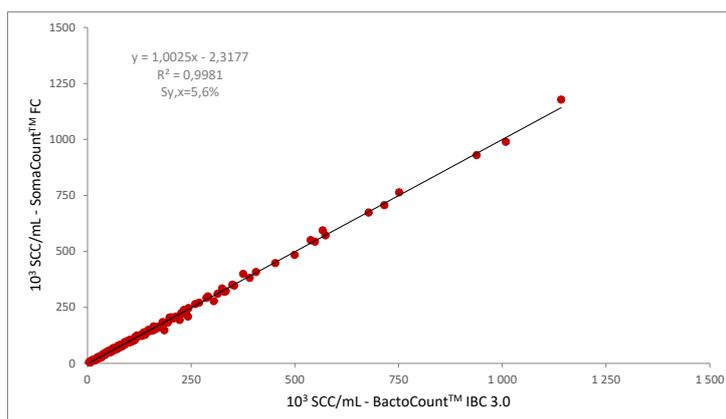


Figure 4 : Relation entre les résultats du BactoCount™ IBC3.0 et du SomaCount™ FC pour les SCC

Pour les TBC, l'écart type résiduel déterminé était $S_{y,x} = 0,11 \log_{10}$ UFC/ml et est conforme à la limite de **0,40** \log_{10} UFC/mL définie dans la norme ISO 16297 et le document EU-RL MMP. L'écart type résiduel se situe également dans la limite de reproductibilité ISO 16297 (**<0,16 log**).

Pour les SCC, l'écart type résiduel déterminé pour les mesures pour chaque plage de concentrations et pour le total des échantillons ($S_{y,x} = 5,6 \%$) est inférieur à la limite définie dans la norme ISO 8196-3 (**8 %**).

La justesse du BactoCount™ IBC3.0 pour les TBC et les SCC est conforme aux documents ISO 16297, ISO 8196-3 et EU-RL MMP.

4. CONCLUSION

ACTALIA Cecalait a mené une étude complète de validation MicroVal du BactoCount™ IBC3.0 pour les mesures séparées de TBC et de SCC dans le lait cru de vache. Cette étude a été réalisée selon les exigences générales de la norme ISO 16140-2 et les plus spécifiques des normes ISO 16297, ISO 21187, ISO 8196-3 et ISO 13366-2 selon la cible.

Pour toutes les conditions testées, l'instrument a été considéré comme **stable** au cours de la journée de travail pour les TBC et pour les SCC et l'**effet de contamination entre échantillons** mesuré était inférieur aux exigences. La **linéarité** des mesures a été vérifiée sur la plage de mesure habituelle et les **limites inférieures de quantification** ont été déterminées. La **répétabilité** de l'appareil est également conforme aux exigences.

Pour les TBC, la comparaison avec la méthode d'ancrage (BactoCount™ IBC2.0 - certifié MicroVal ; certificat n°2013 LR 44) a révélé une équivalence en termes de dénombrement de la flore totale et est conforme aux critères du document EU-RL MMP.

Pour les SCC, la comparaison avec la méthode d'ancrage (SomaCount™ FC – certifié ICAR selon ISO 8196-3 ; certificat n°2020/7) a révélé une équivalence en termes de dénombrement des cellules somatiques et est conforme aux critères du document EU-RL MMP.

Enfin, tous les résultats de cette étude de validation permettent de conclure que le BactoCount™ IBC3.0 satisfait aux exigences normatives pour la numération de la flore totale et des cellules somatiques dans le lait cru de vache.

Sur la base de cette étude d'évaluation, l'instrument a été validé par MicroVal pour les TBC et les SCC dans le lait cru de vache.

Normes utilisées pour cette évaluation:

- Pour TBC : - ISO 16140-2
 - ISO 16297
 - ISO 21187
 - EU-RL MMP criteria

- Pour SCC : - ISO 16140-2
 - ISO 8196-3
 - ISO 13366-2
 - EU-RL MMP criteria

*D'après le rapport de validation MicroVal du BactoCount™ IBC3.0 – Delphine LAROSE
Numéro de validation MicroVal : 2021LR97*