

EVALUATION DU BACTOSCAN F.C

Le Bactoscan FC de la société Foss Electric est un appareil automatique de numération des bactéries du lait cru. Il fonctionne sur le principe de la cytométrie de flux, avec détection des bactéries par microscopie épifluorescente. Ses caractéristiques analytiques et instrumentales ont été évaluées par CECALAIT. La stabilité sur une ou plusieurs journées ainsi que la linéarité de l'appareil apparaissent satisfaisantes. Son traçage est conforme aux exigences réglementaires. Enfin, ses performances de précision : répétabilité et justesse le rendent aptes à être utilisé en laboratoire interprofessionnel ou de contrôle laitier.

Le Bactoscan FC est un appareil automatique de numération des bactéries dans le lait cru fabriqué par la société Foss Electric (DK). Il fonctionne sur le principe de la cytométrie de flux avec une détection par microscopie épifluorescente, après un traitement chimique des échantillons. Les essais d'évaluation ont été menés à CECALAIT de février à mai 1998.

PRINCIPE ET DESCRIPTION

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

L'échantillon prélevé automatiquement est dilué dans un réactif d'incubation, solution tamponnée de bromure d'éthidium et d'enzyme protéolytique, de manière à disperser les protéines, la matière grasse et les cellules somatiques et à colorer les noyaux bactériens.

Ce mélange est incubé ensuite pendant 8 minutes à 42 °C et une partie aliquote est injectée dans un fluide vecteur en écoulement laminaire dans un capillaire. Les bactéries séparées par le flux sont exposées au faisceau d'un laser au niveau d'un objectif microscopique. Les impulsions lumineuses émises par fluorescence par le colorant fixé par les bactéries sont amplifiées au niveau d'un photomultiplicateur, comptabilisées et converties en Individual Bacteria Cell (IBC) par ml. Un calibrage réalisé par le laboratoire permet de transformer les IBC / ml en UFC / ml

LES ESSAIS

Ils ont été réalisés avec des échantillons sans réchauffage préalable et ont porté sur les points suivants .

- ◆ Evaluation de la stabilité de l'appareil,
- ◆ Evaluation de la contamination entre échantillons,
- ◆ Evaluation de la linéarité,
- ◆ Détermination de la limite de détection,
- ◆ Evaluation de la répétabilité,
- ◆ Evaluation de la justesse.

Les critères d'appréciation de ces différents paramètres se réfèrent aux normes FIL 100B 1991, FIL 128 1985 , FIL 135B 1991, FIL 161A 1995 et AFNOR NF V03-110 juillet 1993.

① STABILITE

☞ sur la journée

Ce point a été étudié grâce à une série de 6 laits en double, à savoir un lait pauvre, un lait moyen et un lait riche additionnés ou non d'azidiol. Ils ont été analysés en mode automatique, toutes les 15 minutes au cours d'une demi-journée de travail dans les conditions réelles d'un laboratoire interprofessionnel, le tout représentant 20 cycles de mesure.

Les calculs de répétabilité et de reproductibilité en vue d'évaluer la stabilité de l'instrument ont été effectués sur le modèle de la norme FIL 135 B.

Avec des valeurs allant de 6,41% à 8,90 % pour les résultats obtenus avec les laits sans azidiol et de 4,23 à 8,14 % pour les résultats obtenus avec les laits additionnés d'azidiol, l'écart type géométrique relatif de reproductibilité (GRSD_R) est nettement inférieur à 10 % quel que soit le niveau de contamination et le mode de conservation des échantillons.

De plus, on constate que les valeurs obtenues en présence d'azidiol sont significativement inférieures aux témoins sans azidiol. Le pouvoir de stabilisation de l'azidiol associé à un stockage entre 2 et 4 °C est significativement supérieur à celui d'une conservation uniquement entre 0 et 2 °C.

La stabilité sur une journée apparaît sensiblement supérieure à celle des Bactoscan des générations précédentes notamment celle du Bactoscan 8000 (valeurs de 1,6 à 21,9 % selon DASEN et al , Lait, 1991).

☞ sur plusieurs journées

Selon les échantillons témoin utilisés, les valeurs de GRSD_R obtenues pour des mesures sur plusieurs journées varient de 1,86% à 5,20 % pour le témoin FC. Elles sont du même ordre de grandeur que celles obtenues en étudiant la stabilité sur une journée

L'ensemble des observations permet de conclure à une bonne stabilité de l'instrument, que ce soit à court ou à moyen terme.

② CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS

Elle a été évaluée en mode automatique par l'analyse de deux laits (riche et pauvre) selon la séquence: LAIT RICHE - LAIT RICHE - LAIT PAUVRE - LAIT PAUVRE, répétée 10 fois.

Le taux de contamination (Tc %) a été estimé par la formule :

$$Tc \% = \frac{\Sigma(\text{PAUVRE 1}) - \Sigma(\text{PAUVRE 2})}{\Sigma(\text{RICHE 2}) - \Sigma(\text{PAUVRE 2})} \times 100$$

Dans ces conditions, le système Bactoscan FC laisse apparaître des contaminations de l'ordre de 0,0 à 0,4 % maximum quel que soit le niveau moyen de l'échantillon. Ce taux reste dans la limite de 1 % autorisée pour les méthodes rapides de détermination de la richesse du lait (Matière grasse et matière protéique) utilisées dans le cadre du paiement du lait. En effet, dans ce même contexte, cette limite est également applicable au dénombrement bactérien.

③ LINEARITE

Elle a été évaluée par l'analyse en mode automatique (mode répétabilité: 3 répétitions / échantillon) dans l'ordre croissant et décroissant d'une gamme de laits aux contenus en germes régulièrement répartis sur la plage souhaitée.

Les essais ont été réalisés sur deux types de matrice:

- ◆ Un lait enrichi par maturation à basse température (4 à 8 °C) pendant 24 à 72 heures
- ◆ Un lait reconstitué obtenu après microfiltration tangentielle par mélange de rétentat de microfiltration, de filtrat de microfiltration et de crème

Les résultats ont montré une linéarité satisfaisante de l'instrument sur l'ensemble de la gamme testée de 0,6 à 6000 10³ UFC / ml.

Les modalités de préparation des gammes de dilutions ne semblent pas influencer sur l'appréciation de la linéarité de l'instrument. En effet, les gammes réalisées à partir de maturation des laits à basse température ou par microfiltration donnent des résultats équivalents.

④ LIMITE DE DETECTION

La limite de détection d'une méthode est la plus faible valeur de la grandeur mesurée dont la méthode permette d'affirmer qu'elle n'est pas nulle.

Selon les modèles de calcul utilisés, la limite de détection se situe dans une fourchette allant de 940 à 1900 UFC/ml.

En tout état de cause, l'instrument présente un seuil de détection en parfait accord avec la précision demandée pour son utilisation en routine.

⑤ REPETABILITE

La répétabilité a été évaluée en mode automatique par l'analyse de 851 échantillons de laits de troupeaux selon la norme FIL 128 (les racks d'échantillons sont passés 2 fois consécutivement sur l'instrument)

Les résultats obtenus originellement en 10³ IBC / ml ont été transformés dans un premier temps en Log IBC / ml puis en Log UFC / ml à l'aide de l'équation de calibrage forcée par zéro obtenue lors de l'évaluation de la justesse :

$$Y = 0.8036 X,$$

avec Y en Log UFC/ml, obtenu par la méthode de référence
X en Log IBC/ml, valeur donnée par l'appareil.

Les résultats sont consignés dans les tableaux ci-dessous qui présentent les écarts types de répétabilités Sr* en log UFC/ml ainsi que les écarts types relatifs géométriques relatifs (GRSDr en % UFC / ml) pour chaque niveau de taux. Ces niveaux ont été établis au préalable, soit en fonction de leurs correspondance aux classes de paiement du lait en France, soit à des fins de comparaison aux valeurs du Bactoscan 8000 déterminées lors de l'évaluation de ce dernier (tableau 2)

Tableau 1 : Répétabilité selon la norme FIL 128

classes UFC / ml (Log)	n	Moyenne (Log)	Sr (Log)	GRSDr (%)	RD 95 (%)
0 - 2000.10 ³ (0 - 6.301)	851	4.293	0.0537	13.2	41.3
0 - 50 10 ³ (0 - 4.699)	686	4.083	0.0564	13.9	43.9
50 10 ³ - 100.10 ³ (4.699 - 5.000)	80	4.823	0.0386	9.3	27.9
100.10 ³ - 300.10 ³ (5.000 - 5.477)	55	5.195	0.0477	11.6	36.1
> 300.10 ³ (> 5.477)	30	6.006	0.0253	6.0	17.5

avec:

n: Nombre d'échantillons

Sr*: Ecart type de répétabilité en log

GRSDr: Ecart type relatif géométrique relatif en % UFC / ml

RD 95: Différence maximale entre doubles dans 95 % des cas en % UFC / ml

Tableau 2 : Répétabilité, avec découpage des classes pour comparaison avec les résultats antérieurs obtenus sur Bactoscan 8000

classes UFC / ml (Log)	n	Moyenne (Log)	Sr* (Log)	Sr* Méth référence (Log)	Sr * (1) BSC 8000 (Log)
<10.10 ³ (0 - 4.00)	285	3.778	0.0671	0.070	0.132
10.10 ³ - 15 10 ³ (4.00 - 4.176)	125	4.079	0.0460	0.0443	0.092
15.10 ³ - 25.10 ³ (4.176 - 4.398)	141	4.279	0.0481	0.0477	0.078
25.10 ³ - 50.10 ³ (4.398 - 4.699)	135	4.531	0.0475	0.0647	0.051
50.10 ³ - 100.10 ³ (4.699 - 5.00)	80	4.823	0.0386	0.0543	0.035
100.10 ³ - 250.10 ³ (5.00 - 5.398)	50	5.172	0.0488	0.037	0.015
> 100.10 ³ (> 5.00)	35	5.923	0.0267	0.0623	0.005

avec :

(1) Résultats des essais: Dasen et al., 1991

n: Nombre d'échantillons

Sr*: Ecart type de répétabilité en log

RSDr : Ecart type relatif géométrique relatif en % UFC / ml

RD 95 : Différence maximale entre doubles dans 95 % des cas en % UFC / ml

Les deux tableaux montrent que l'instrument présente un écart type de répétabilité Sr* d'environ 0,054 log (soit un écart type géométrique relatif de 13,2 %) qui est significativement inférieur aux valeurs limites préconisées par le CNIEL pour les comptages bactérien (Sr* = 0,15 log).

La répétabilité relative, exprimée par les valeurs log d'écart type, apparaît liée au niveau moyen en germes, le Sr* passant de

0,0671 log (GRSDr = 16.7 %) pour les laits inférieurs à 10.10³ UFC / ml à 0,0267 log (GRSDr = 6.3 %) pour les laits supérieurs à 100.10³ UFC / ml.

On observe par rapport à des essais similaires sur le Bactoscan 8000, une certaine réduction des valeurs d'écart types de répétabilité, en particulier sur les laits faiblement chargés (inférieurs à 50.10³ UFC / ml).

© JUSTESSE

La justesse a été estimée au moyen de l'écart type résiduel de régression, en prenant la méthode de référence (Log UFC / ml) en variable expliquée Y et le Bactoscan FC en variable explicative X (Log IBC / ml).

Pour l'évaluation de la justesse, seuls les échantillons présentant une valeur de référence validée techniquement ont été conservés après élimination des boîtes hors des limites de comptage ou présentant des colonies dites envahissantes ou de contamination.

↳ Procédure

Dans un premier temps, afin d'avoir une population présentant une bonne répartition des teneurs en germes, une sélection de 450 laits de troupeaux de vache parmi 851 prélevés (sur 9 jours différents de mars à mai 1998) a été effectuée par une analyse en double selon la norme FIL 128 sur le Bactoscan FC.

Les laits sélectionnés ont été conservés entre 0 et 2 °C pendant 2 à 4 heures jusqu'au moment des analyses pour l'évaluation de la justesse. Les analyses ont été effectuées en doubles consécutifs sur l'instrument suivies immédiatement d'une analyse en double par la méthode de référence (FIL 100 B).

Les opérations se sont déroulées sur 9 jours non consécutifs étalés sur une période de 45 jours. Chaque série analytique était constituée de laits provenant d'une tournée de ramassage (24 ou 48 heures de stockage en tank) prélevés en double chez les éleveurs et ayant suivi le circuit d'acheminement normal des échantillons pour le paiement du lait.

↳ Résultats

La linéarité de l'appareil étant acquise sur l'ensemble de la gamme testée, une régression linéaire simple a été appliquée à la population globale et aux 9 sous-populations des essais journaliers.

L'analyse de la justesse série par série a permis d'observer une bonne homogénéité entre les 9 séries d'échantillons pour l'évaluation de la justesse et n'a détecté aucun effet lié à la série. Dès lors, ceci autorise un traitement de l'ensemble de la population des 385 laits dans une même régression sans correction.

La régression linéaire simple calculée -d'après des valeurs transformées en Log- a donné la relation suivante:

$$\text{Log (Référence)} = 0,757 \times \text{Log (Bactoscan FC)} + 0,656$$

$$S_{y,x} = 0,301$$

Statistiquement, la pente est significativement distincte de 1,00. De même, l'ordonnée à l'origine ainsi que la moyenne des écarts sont significativement différentes de 0.

Un calibrage apparaît donc nécessaire préalablement à toute utilisation.

La précision d'estimation obtenue pour le Bactoscan FC est de :

$$\pm 1,96 \times 0,301 \text{ soit } \pm 0,590 \text{ Log UFC / ml,}$$

soit, pour une valeur Y prédite par l'équation de calibrage, une limite supérieure et une limite inférieure de l'intervalle de confiance à P = 0,95 respectivement de

$$\text{Log Y} + 0,590 \text{ et } \text{Log Y} - 0,590.$$

En conclusion, les caractéristiques de précision ($S_{y,x}$ principalement) du Bactoscan FC sont équivalentes à celles du Bactoscan 1 (GRAPPIN et al., 1985) et du Bactoscan 8000 (DASEN et al., 1991) pour l'ensemble du domaine d'application testé. Toutefois, du fait de l'excellente linéarité de son signal, il offre l'avantage, par rapport à ces appareils, de pouvoir être calibré simplement à l'aide d'une équation linéaire simple.

Le Bactoscan FC présente des performances de justesse satisfaisant aux besoins du paiement du lait.

CONCLUSION

L'appareil Bactoscan FC a été évalué dans le but d'une autorisation d'emploi pour le paiement du lait. Il a donné satisfaction sur les différents points testés: stabilité, traçage,

linéarité, répétabilité et justesse. Ses performances de précision générales mesurées le rendent apte à être utilisé dans un laboratoire interprofessionnel après confirmation (phase II) dans les conditions réelles d'analyse des laboratoires de routine.

BIBLIOGRAPHIE

- ♦ *Dasen A.; Olid R.M.; Piton-Malleret C.; Grappin R. Evaluation du BactoScan 8000 pour la numération automatique et rapide de la flore microbienne du lait cru. Le Lait 1991, V. 71, p. 661-670*
- ♦ *Grappin R.; Dasen A.; Favennec P. Numération automatique et rapide des bactéries du lait cru à l'aide du Bacto-Scan. Le Lait, 1985, V. 65, p. 123-147*
- ♦ *FIL 100B:1991 : Lait et produits laitiers. Dénombrement des microorganismes (comptage des colonies 30°C)*
- ♦ *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 161A:1995 : Lait. Détermination quantitative de la qualité bactériologique. Guide d'évaluation des méthodes de routine*
- ♦ *AFNOR V 03-110 juillet 1993 Analyse des produits alimentaires. Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse quantitative par rapport à une méthode de référence*

Liste des abréviations

GRSD_r : écart type relatif géométrique relatif de répétabilité

GRSD_R : écart type géométrique relatif de reproductibilité

IBC : individual bacteria cell

UFC ; unité formant colonie

(par Ph TROSSAT, O.LERAY et P.ROLLIER)

