

EVALUATION DU BACTOCOUNT IBC-M POUR LA NUMERATION DE LA FLORE TOTALE

Le BactoCount IBC-M est un appareil semi-automatique de numération des bactéries dans le lait cru fabriqué par la société BENTLEY INSTRUMENTS (US) et distribué en France par la société Bentley Instruments SARL. Il fonctionne sur le principe de la cytométrie de flux avec une détection par microscopie épifluorescente.

L'échantillon est prélevé et mélangé manuellement avec un réactif d'incubation constitué d'un tampon de clarification, d'enzyme protéolytique et d'un marqueur fluorescent. Ce réactif va permettre de lyser les cellules somatiques, disperser les protéines et la matière grasse, perméabiliser la paroi des bactéries et colorer leur ADN.

Le mélange est ensuite incubé pendant 10 minutes à 50°C et mélangé deux fois manuellement avec une sonde ultrasonique. La solution est ensuite placée dans l'appareil pour être 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 filtrées et 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.

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

L'ensemble des essais constituant l'évaluation ont été réalisés avec des échantillons sans réchauffage préalable.

Les essais ont porté sur l'évaluation de la répétabilité et l'évaluation de la justesse en prenant en référence les normes ISO 4833, ISO 21187/FIL 196 et FIL 128.

essais d'aptitude CECALAIT microorganismes à 30°C, de juin 2007 à mars 2008.

1.2) Résultats

Le tableau ci-après présente les écarts types de répétabilité Sr en log UFC/ ml ainsi que l'écart maximum en double exprimé par r en log UFC/ ml et par RD95 en % UFC/ ml, pour chaque niveau de taux, ces niveaux ayant été établis en fonction de leurs correspondances aux classes de paiement du lait en France.

A noter que 2 échantillons aberrants ont été éliminés par test de Cochran à 1%.

1) REPETABILITE

1.1) Procédure

La répétabilité a été évaluée par l'analyse en doubles consécutifs de 106 échantillons de laits de troupeaux analysés en mars 2008 et de 50 échantillons des

classes UFC / ml selon la méthode de référence (Log)	N	Moyenne (Log)	Sr (Log)	R (Log)	RD 95 (%)
Tous niveaux	154	4,384	0,072	0,198	58
0 - 50 10 ³ (0 - 4,699)	108	4,053	0,082	0,229	69
50 10 ³ - 100.10 ³ (4,699 - 5,000)	20	4,843	0,035	0,098	25
100.10 ³ - 300.10 ³ (5,000 - 5,477)	20	5,244	0,035	0,097	25
> 300.10 ³ (> 5,477)	6	5,933	0,032	0,089	23

n : Nombre d'échantillons ; *Sr*:Ecart type de répétabilité en log ; *r* : Répétabilité en log ; *RD 95* : Différence maximale entre double dans 95 % des cas en % UFC / ml

1.3) Conclusion

Sur l'ensemble de la gamme de taux testée (taux de contamination moyen de 24 000 UFC/ml), l'instrument présente un écart type de répétabilité S_r d'environ 0,072 Log qui est de même ordre que la spécification technique annoncée par le fabricant ($S_r \leq 0,07$ Log) et inférieur à la limite généralement requise dans le cadre du paiement du lait à la qualité en France sur cette détermination ($S_r \leq 0,12$ log). L'écart type de répétabilité pour les taux de contamination supérieurs à 50 000 UFC/ml est inférieur à 0,035 log.

2) 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 BactoCount IBC-M en variable explicative X (Log UFC/ ml).

2.1) Echantillons de lait de troupeau

2.1.1) Procédure

140 échantillons de lait de troupeau de vache ont été analysés sur 3 jours différents en mars 2008. 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 à la qualité.

Afin d'avoir une population présentant une bonne répartition des niveaux en flore totale, 108 échantillons parmi 140 ont été sélectionnés sur la base des résultats obtenus sur le BactoCount IBC-M.

Les analyses ont été effectuées en doubles consécutifs à la fois sur l'instrument et par la méthode de référence (ISO 4833).

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 envahissantes.

Un échantillon en méthode de référence (< 4 colonies/ boîte) et un échantillon en méthode instrumentale (résultat de 0 IBC) n'ont pas été pris en compte, donnant ainsi un total de 106 échantillons retenus pour l'étude de justesse sur les 108 sélectionnés.

2.1.2) Résultats

4 échantillons aberrants ont été écartés du traitement :

- 2 échantillons éliminés en répétabilité sur test de Cochran à 1%
- 2 échantillons présentant un écart entre les méthodes supérieur à 3 fois l'écart-type résiduel ($S_{y,x}$)

La régression linéaire simple calculée sur la population des 102 échantillons de lait de troupeau retenus a donné la relation suivante :

$$\text{Log (Réf)} = 1,1591 \times \text{Log (IBC-M)} - 0,986$$

$$S_{y,x} = 0,311 \text{ Log}$$

$$\text{Précision d'estimation} : \pm 1,96 \times 0,311$$

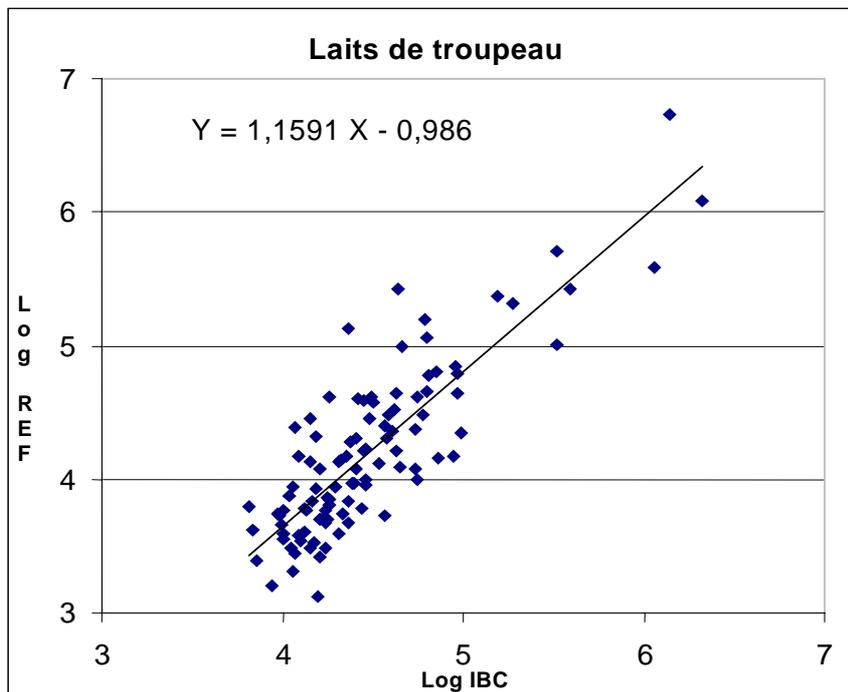
$$\text{soit } \pm 0,61 \text{ Log}$$

Caractéristiques de la population des 102 échantillons :

Valeur moyenne : $15 \cdot 10^3$ UFC / ml (Log : 4,176)

Valeur minimale : $1,3 \cdot 10^3$ UFC / ml (Log : 3,128)

Valeur maximale : $5\,450 \cdot 10^3$ UFC / ml (Log : 6,736)



2.2) Echantillons des essais d'aptitude CECALAIT

2.2.1) Procédure

Les analyses ont été réalisées sur 50 échantillons provenant des essais d'aptitude CECALAIT de juin 2007 à mars 2008, représentant 5 essais d'aptitude de 10 échantillons. Les analyses ont été effectuées en double consécutifs sur l'instrument et en simple par la méthode de référence (ISO 4833).

2.2.2) Résultats

Aucun échantillon aberrant n'a été écarté du traitement

La régression linéaire simple calculée sur la population des 50 échantillons a donné la relation suivante :

$$\text{Log (Réf)} = 0,9676 \text{ Log (IBC-M)} - 0,203$$

$$S_{y,x} = 0,194 \text{ Log}$$

Précision d'estimation : $\pm 1,96 \times 0,194$

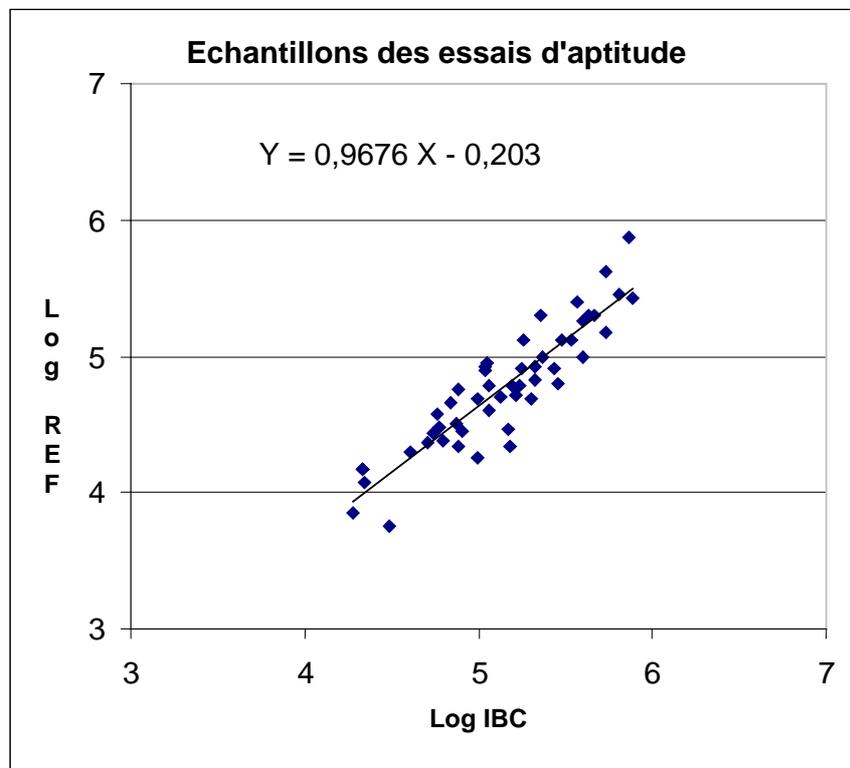
soit $\pm 0,38 \text{ Log}$

Caractéristiques de la population des 50 échantillons :

Valeur moyenne : $59 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$ (Log : 5,875)

Valeur minimale : $6 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$ (Log : 3,756)

Valeur maximale : $750 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$ (Log : 6,736)



2.3) Echantillons de lait de troupeau et des essais d'aptitude

2.3.1) Procédure

Traitement en justesse sur les 106 échantillons de lait de troupeau de vache et les 50 échantillons des essais d'aptitude CECALAIT, selon la procédure détaillée ci-dessus.

2.3.2) Résultats

4 échantillons aberrants ont été écartés du traitement :

- 2 échantillons éliminés en répétabilité sur test de Cochran à 1%
- 2 échantillons présentant un écart entre les méthodes supérieur à 3 fois l'écart-type résiduel ($S_{y,x}$)

La régression linéaire simple calculée sur la population des 152 retenus a donné la relation suivante :

$$\text{Log (Réf)} = 1,0331 \times \text{Log (IBC-M)} - 0,475$$

$$S_{y,x} = 0,285 \text{ Log}$$

Précision d'estimation : $\pm 1,96 \times 0,285$

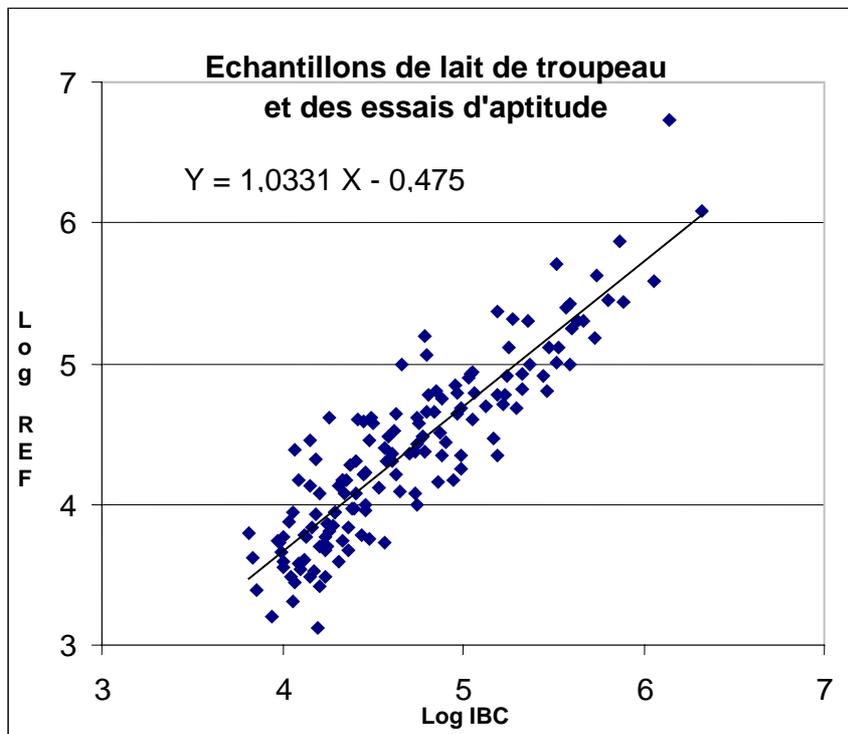
soit $\pm 0,56 \text{ Log}$

Caractéristiques de la population des 152 échantillons :

Valeur moyenne : $24 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$ (Log : 4,372)

Valeur minimale : $1,3 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$ (Log : 3,128)

Valeur maximale : $5\,450 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$ (Log : 6,736)



2.4) Conclusion

Sur l'ensemble des 152 échantillons, l'instrument présente un écart type résiduel $S_{y,x}$ de 0,285 Log (pour une contamination moyenne de 24 000 UFC/ml), conforme à la spécification technique du fabricant ($S_{y,x} \leq 0,30$ Log) et à la limite fixée dans le cadre de l'évaluation des instruments pour une autorisation d'emploi à des fins de paiement du lait à la qualité en France ($S_{y,x} \leq 0,30$ Log).

On peut remarquer que la valeur d'écart type résiduel obtenue sur les 50 échantillons correspondant aux essais d'aptitude est plus faible que celle obtenue sur les 102 laits de troupeaux (0,194 Log contre 0,311 Log). Ceci s'explique par la présence d'une plus grande diversité de la flore dans ce dernier type de

lait et par un niveau de contamination moyen beaucoup plus faible (15.10^3 au lieu de 59.10^3).

CONCLUSION GENERALE

Le BactoCount IBC-M évalué à la demande de la société BENTLEY pour la numération de la flore totale satisfait globalement aux prescriptions en répétabilité et en justesse annoncées par le fabricant ainsi que celles utilisées dans le cadre de l'évaluation des instruments pour autorisation d'emploi à des fins de paiement du lait à la qualité en France

Ph. TROSSAT et P. ROLLIER

Bentley Instruments SARL
14 rue d'Holbach
59000 Lille – France
pbroutin@bentleyinstruments.com