

EVALUATION DU COMPTEUR DE CELLULES SOMATIQUES SOMASCOPE® (d'après le rapport d'évaluation - phase 1- de CECALAIT)

Le Somascope de la société Delta Instruments est un appareil automatique de dénombrement des cellules somatiques dans le lait. Il utilise une méthode optofluoroélectronique, couplée à la cytométrie de flux. Ses caractéristiques instrumentales et analytiques ont été évaluées, en phase I du processus de demande d'autorisation d'emploi de l'appareil pour le paiement du lait.

Le traçage et la linéarité de l'appareil apparaissent conformes aux exigences réglementaires. Quant à ses performances de précision, répétabilité et justesse, elles le rendent aptes à une utilisation en laboratoire interprofessionnel ou de contrôle laitier.

Le Somascope est un appareil automatique de dénombrement des cellules somatiques dans le lait fabriqué par la société Delta Instruments (Pays-Bas). Son distributeur en France a entamé une procédure de demande d'autorisation d'emploi dans le cadre du paiement du lait. (Cf Lettre de Cecalait, n° 33, 2000.). Dans ce cadre, les essais de la phase, dite I, d'évaluation sont toujours réalisés par CECALAIT, à la demande de la CST. Ils ont été effectués dans le courant du mois d'octobre 2001, au laboratoire de physico-chimie.

PRINCIPE ET DESCRIPTION

L'appareil fonctionne selon la méthode opto-fluoro-électronique. Il se compose d'une unité de préparation et d'une unité de comptage. Il est, en outre, couplé à un micro-ordinateur qui assure le traitement du signal.

La prise d'essai est diluée dans un mélange réactif (solution tamponnée, détergent et colorant DAPI, ie 4',6-dihydrochlorure de diamine-2'phenylindole) de manière à en disperser les globules gras et à colorer les noyaux des cellules somatiques. Une partie aliquote de la suspension cellulaire colorée est injectée, au moyen d'une seringue, dans un liquide de gainage en écoulement laminaire dans un capillaire. Les cellules marquées par le colorant et séparées par le flux sont exposées au faisceau d'une lampe halogène et émettent en conséquence une lumière de fluorescence.

Pour chaque échantillon, le Somascope réalise une mesure à 2 longueurs d'onde d'excitation différentes (vers 2 photomultiplicateurs différents) afin d'avoir une séparation nette entre le bruit de fond et le signal dû aux cellules somatiques. Seules les impulsions arrivant aux 2 photomultiplicateurs et se trouvant au dessus d'un seuil de discrimination fixe (en mV), sont comptabilisées et traduites en terme de concentration cellulaire par l'équation de calibrage.

LES ESSAIS

Les essais ont été effectués sur l'appareil en configuration : 360 déterminations/h. Ils ont porté sur les points suivants :

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

Les critères d'appréciation des paramètres estimés se basent, soit sur la norme FIL 148 A: 1995 "Numération des cellules

somatiques du lait ", soit sur le manuel des procédures de suivi des appareils de dénombrements des cellules, écrit par le CNIEL.

① STABILITE

Elle a été évaluée par l'analyse en mode automatique de 3 laits, aux teneurs respectives de 500, 1000 et 1500 x 10³ cellules / ml environ, répétée en double toutes les 20 minutes au cours d'une demi-journée de travail, soit 14 cycles de mesure.

Les résultats obtenus ont montré une bonne stabilité de l'instrument sur la période testée. En effet, les valeurs d'écart type de reproductibilité relatif (S_R%) obtenues sont :

- 2,81% pour le niveau 1,
- 2,76% pour le niveau 2,
- 3,61% pour le niveau 3

Ces valeurs sont donc toutes nettement inférieures à 5 %, qui est la valeur maximale acceptée dans la norme FIL 148 A: 1995 comme coefficient de variation des dénombrements du même lait témoin au cours d'une journée.

② CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS

Elle a été évaluée, en mode automatique, par l'analyse d'un même lait individuel et d'un filtrat de microfiltration exempt de cellules somatiques selon la séquence : LAIT - LAIT - FILTRAT - FILTRAT, répétée 20 fois.

Ce test a été effectué sur 3 laits de niveaux cellulaires différents avec un coefficient de traçage fixé à 0.

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

$$T_c (\%) = \left[\frac{\sum (\text{filtrat1}) - \sum (\text{filtrat2})}{\sum (\text{lait2}) - \sum (\text{filtrat2})} \right] \times 100$$

Dans ces conditions, l'appareil laisse apparaître une contamination entre échantillons de l'ordre de 0,5 %, indépendante du niveau de taux cellulaire des échantillons. Ce taux reste dans la limite 1% autorisée pour les méthodes rapides de détermination de la richesse du lait (Matière grasse et protéines), mais également applicable au comptage cellulaire dans le même contexte.

③ LINEARITE

Elle a été évaluée au moyen d'une gamme de 21 laits aux taux cellulaires régulièrement répartis entre 0 et 2100 x 10³/ml,

analysée en mode automatique dans l'ordre croissant puis décroissant des teneurs, à raison de 3 répétitions par niveau. Cette gamme avait été fabriquée à partir de rétentat et de microfiltrat, par pesées corrigées des masses volumiques.

La linéarité est alors appréciée en observant - sur un graphique - la distribution des résidus à la régression linéaire par rapport aux taux cellulaires. Une distribution aléatoire des résidus sans courbure apparente autour de la droite de régression a ainsi été observée sur l'ensemble de la gamme testée, ce qui permet de conclure que la linéarité est satisfaisante.

④ REPETABILITE

La répétabilité a été évaluée en mode automatique par l'analyse de 131 laits individuels de vache provenant de 7 élevages du Jura, conservés avec du Bronopol (0.02 % final). Les analyses ont été effectuées en mode automatique en doublant chaque série de 20 échantillons selon la séquence suivante :

Série1 rep1 – série 1 rep2 – série 2 rep1 – série 2 rep2-
série n rep1 – série n rep2

Les résultats sont consignés dans le tableau 1 ci-dessous

tableau 1 : répétabilité du Somascope

table 1 : repeatability of Somascope

Etendue range (10 ³ /ml)	n (10 ³ /ml)	M (10 ³ /ml)	Sr (10 ³ /ml)	Sr (%)	r (10 ³ /ml)
0 – 100	53	53	3.5	6.62	9.8
100 – 200	21	138	5.7	4.11	15.7
200 – 400	22	280	8.0	2.86	22.2
400 – 750	12	565	7.9	1.39	21.8
750 – 1500	16	1002	21.0	2.10	58.3
1500 - 3000	4	2213	48.8	2.21	135.2
0 -3000	128	340	12.5	3.68	34.7

avec / with

n : nombre de résultats / number of results

M : moyenne / mean

Sr (Sr%) : écart-type de répétabilité absolu (relatif) / absolute (relative) standard deviation of repeatability

r : écart maximal de répétabilité dans 95% des cas / maximum difference between duplicates in 95% of occurrences.

Ce tableau montre que le Somascope présente une répétabilité conforme aux indications de la norme FIL 148 A, à savoir un écart type de répétabilité relatif moyen inférieur à 5%.

⑤ JUSTESSE

La justesse a été estimée au moyen de la moyenne des écarts et de l'écart type résiduel de régression en prenant :

- la méthode de référence en variable expliquée Y,
- le Somascope en variable explicative X.

➤ Procédure

Pour ce faire, 100 laits individuels de vache ont été sélectionnés parmi 131 prélevés dans 7 élevages du Jura. Ils ont alors été analysés en double sur l'appareil, préalablement calibré entre 0 et 1800 000 cellules/ml à l'aide de 9 échantillons commerciaux produits par CECALAIT. Ils ont enfin été analysés en simple par la méthode de référence (FIL 148 A). En cas de résidu trop important après régression, un deuxième comptage a été effectué.

➤ Résultats

Le tableau 2 résume les résultats obtenus.

tableau 2 : justesse du Somascope

table 2 : accuracy of Somascope

étendue range (10 ³ /ml)	n	M (10 ³ /ml)	\bar{d} (10 ³ /ml)	Sd (10 ³ /ml)	+/- l (10 ³ /ml)
0 - 100	24	74	-2.0	13.4	+/- 26.8
100 – 200	26	131	-16.2	23.7	+/- 47.4
200 – 400	19	275	-7.5	24.0	+/- 48.0
400 – 750	14	545	-19.5	34.7	+/- 69.4
750 –2000	17	1039	-9.9	37.3	+/- 74.6
0 - 2000	100	357	-10.5	26.7	+/- 53.4

avec / with

n : nombre de résultats / number of results

m : moyenne des valeurs appareil / mean of the Somascope values

d : moyenne des écarts appareil – référence / mean of the differences between Somascope and reference values

Sd : écart-type des écarts (appareil – référence) / .standard deviation of the differences (Somascope - reference)

La droite de régression linéaire obtenue entre 0 et 2 000 000 cellules somatiques/ml montre un bon ajustement de l'étalonnage. Son équation est :

$$Y = 0,996 x (\text{Somascope}) + 12$$

avec $S_{y,x} = 26,8$ et la moyenne des écarts : $\bar{d} = -10,5$

Ce biais mesuré de 10 000 cellules environ ne représente que 3% en valeur relative et reste dans les limites autorisées par l'incertitude de la méthode de référence.

La précision d'estimation de la méthode est de +/- 53 000 cellules/ml sur la gamme de 0 à 2 000 000 cellules/ml.

CONCLUSION

Le Somascope a été évalué en phase I à CECALAIT (à la demande de la société Laboratoires Humeau) dans le but d'une autorisation d'emploi pour le paiement du lait. Il a donné satisfaction sur l'ensemble des points testés: stabilité, contamination entre échantillons, répétabilité et justesse.

Le Somascope présente des performances de justesse (ajustement moyen et précision d'estimation) conformes aux besoins et exigences du paiement du lait et du contrôle laitier.

Abréviations

CNIEL : Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière

CST : Commission Scientifique et Technique

FIL : Fédération Internationale de Laiterie = IDF : International Dairy Federation

Bibliographie

- ♦ **CNIEL** : manuel des procédures de suivi des appareils de dénombrements des cellules. 2000, Réf C.N.I.E.L. Proc CE-03-05/00.
- ♦ **FIL 148A:1995**. Lait. Numération des cellules somatiques du lait
- ♦ **QUERVEL X.** ; **TROSSAT P** h.; rapport d'évaluation du Somascope® [phase I]. CECALAIT, 2001, 6 pages

