

EVALUATION : ANADIS SCC 500

Le Somatic Cell Counter (SCC) est un appareil automatique de numération des cellules somatiques dans le lait fabriqué par la société PERSTORP / ANADIS utilisant la méthode fluoro-opto-électronique. Les caractéristiques instrumentales de base, à savoir : stabilité, traçage, répétabilité et justesse sont conformes aux exigences réglementaires. La linéarité de l'appareil (testée jusqu'à 2200x10³ cellules/ml) ajustée avec l'équation de calibrage implique une attention particulière quant au choix des étalons.

Le Somatic Cell Counter (SCC) est un appareil automatique de numération des cellules somatiques dans le lait fabriqué et commercialisé par la société PERSTORP/ANADIS (*) utilisant la méthode fluoro-opto-électronique. Il a été évalué par CECALAIT au laboratoire de physico-chimie pendant le mois de Novembre 1996, à Poligny.

DESCRIPTION

Le principe de fonctionnement est le suivant : l'échantillon, prélevé à l'aide d'une seringue de prélèvement, est dilué dans une seringue de mélange avec un réactif (solution tamponnée de triton X100 et de bromure d'éthidium) de manière à en disperser les globules gras et à colorer les noyaux des cellules somatiques. Une partie aliquote du mélange est injectée, via une seringue d'injection, dans un liquide de gainage en écoulement laminaire dans un capillaire. Les cellules colorées, exposées au faisceau d'un laser, émettent une lumière de fluorescence dirigée à travers un microscope vers un détecteur.

Les impulsions au dessus d'un seuil de discrimination fixe (exprimés en mV) sont comptabilisées et traduites en terme de concentration cellulaire via l'équation de calibrage.

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

L'appareil existe en deux versions utilisant la même technologie et fonctionnant suivant le même principe: le SCC 300 et SCC 500 qui se différencient par leur cadence analytique. Le SCC 500 utilise deux seringues de prélèvement pour assurer une cadence ajustable de 300 à 500 échantillons/heure.

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 répétabilité,
- ♦ évaluation de la justesse.

L'appareil a été évalué dans 2 configurations distinctes: la configuration standard (400 échantillons/heure) et la configuration maximale, en terme de vitesse d'analyse, préconisée par le constructeur (450 échantillons/heure). Les différences entre ces deux configurations portent sur : le volume de lait pompé, le volume de mélange injecté dans la cellule et le temps de comptage effectif (cf annexe).

(*) Société reprise par la société Foss (cf. Lettre CECALAIT n°22)

Il n'existe pas de norme française (actuellement à l'état de projet), ni de cahier des charges officiel fixant les exigences en matière de précision de comptage cellulaire, aussi référence sera donc faite à la norme FIL 148 A: 1995.

❶ EVALUATION DE LA STABILITE DE L'APPAREIL

L'évaluation de la stabilité de l'appareil a été réalisée par l'analyse en mode automatique de 3 laits (600, 1000 et 1500 x 10³ cellules/ml environ) répétée en double toutes les 20 minutes au cours d'une demi-journée de travail, dans les conditions réelles d'un laboratoire interprofessionnel, l'ensemble de la manipulation a représenté 11 cycles de mesure, avec une configuration standard de 400 échantillons/heure.

Afin d'évaluer la stabilité de l'instrument, un calcul de répétabilité (Sr et r) et de reproductibilité (SR et R) a été effectué pour chacun des niveaux testés selon le modèle utilisé couramment pour les essais interlaboratoires d'évaluation de méthode (FIL 135 B: 1991).

Les essais montrent une bonne stabilité de l'instrument sur la période testée. En effet, l'écart type de reproductibilité relatif (SR%), pour les trois laits est respectivement de 3.4, 2.0, et 1.9%, nettement inférieur à 5 %, valeur maximale acceptée dans la norme FIL 148 A: 1995 comme coefficient de variation des numérations 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 et filtrat de microfiltration exempt de cellules somatiques, selon la séquence « lait - lait - filtrat - filtrat », répétée 10 fois. Ce test a été effectué sur 3 laits de niveaux cellulaires différents, dans chacune des configurations à tester et sans correction interne de traçage. Le taux de contamination a été estimé par la formule :

$$T_c = [(S(\text{filt.1}) - S(\text{filt.2})) / (S(\text{lait2}) - S(\text{filt.2}))] \times 100$$

Le système SCC 500 laisse apparaître des contaminations entre échantillons variables de 1 à 2,5 % environ suivant la configuration et le niveau de contamination testé. Le logiciel de pilotage de l'instrument permet de compenser cette contamination en temps réel via un coefficient correcteur. Compte tenu des différences constatées, ce coefficient devra être déterminé par l'utilisateur en fonction de la configuration de travail choisie.

● EVALUATION DE LA REPETABILITE

La répétabilité a été testée en mode d'analyse automatique (précision standard) à partir de 118 laits individuels de vache provenant de 7 élevages, conservés avec du bronopol à 0,02% final.

Chaque élevage a été analysé en double selon la séquence spécifiée par la norme FIL 128 :

Ele1Rép1 / Ele1Rép2 / Ele2Rép1 / Ele7Rép1 / Ele7Rép2

Etendue (x10 ³ cellules/ml)	400 échantillons/heure					450 échantillons/heure				
	n	Moyenne	Sr	Sr %	r	n	Moyenne	Sr	Sr %	r
0 - 100	48	50	3.3	6.76	9.2	46	48	5.6	11.4	15.4
100 - 300	36	160	5.8	3.67	16.1	37	163	6.9	4.24	19.1
300 - 800	21	534	16.6	3.13	46.1	22	527	13.6	2.60	37.8
800 - 1500	9	942	11.6	1.23	32.1	9	941	17.6	1.87	48.7
1500 - 3000	4	2016	49.5	2.46	137.0	4	2086	32.6	1.58	90.4
0 - 3 000	118	304	12.5	4.14	34.74	118	310	11	3.56	30.5

TABLEAU 1 : Répétabilité sur l'ensemble des laits collectés

avec n : nombre d'échantillons
Sr % : Sr en pourcentage

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

● EVALUATION DE LA JUSTESSE

80 laits individuels de vache ont été sélectionnés parmi 118 prélevés dans 7 élevages du Jura et analysés en double sur l'appareil, préalablement calibré entre 0 et 1800 000 à l'aide de 9 échantillons commerciaux produits par CECALAIT. Ils sont ensuite analysés en simple par la méthode de référence (FIL 148A). En cas de résidu trop important après régression, un deuxième comptage a été effectué.

La justesse est estimée par les moyennes et les écarts types des écarts (appareil-référence) calculés par tranche de taux cellulaires. Chaque configuration a été calibrée préalablement aux analyses de laits individuels.

➤ CALIBRAGE DE L'APPAREIL

Le logiciel de calibrage utilise le principe de régression polynomial selon les moindres carrés, lequel permet d'ajuster simultanément linéarité et niveau de réponse sur les valeurs nominales des échantillons standards utilisés, aucun traitement de la linéarité du signal n'est effectué en amont.

Pour les deux configurations testées, la réponse de l'appareil est ajustée sur des polynômes d'ordre 3, entre 0 et 1800x10³ cellules somatiques/ml, ce qui a permis d'obtenir des écarts types résiduels de régression de 12800 pour la configuration standard et de 17100 pour la configuration 450 échantillons / heure.

➤ RESULTATS

Les droites de régression linéaire obtenue entre 0 et 2000x10³ cellules/ml montrent un bon ajustement de l'étalonnage pour les deux configurations testées avec les équations suivantes :

Le tableau 1 regroupe l'ensemble des résultats obtenus.

Le SCC 500 présente une répétabilité conforme aux indications de la norme FIL 148 A, avec un écart type de répétabilité relatif moyen inférieur aux 5 % recommandés, ceci pour les deux configurations testées.

On peut remarquer cependant que la configuration « vitesse maximale » présente des valeurs de répétabilité supérieures à celles de la configuration standard dans les taux cellulaires les plus faibles.

Configuration 400 éch / heure

$$REF = 0,987 \times (SCC 500) - 4,4$$

$$Biais\ moyen : + 9100$$

$$Ecart\ type\ résiduel\ de\ régression: 23025$$

Configuration 450 éch / heure

$$REF = 0,996 \times (SCC 500) - 13,9$$

$$Biais\ moyen: +15500$$

$$Ecart\ type\ résiduel\ de\ régression: 27994$$

Dans la configuration standard, le biais moyen observé de + 9000 représente + 2,4 % en valeur relative, et la précision d'estimation apparaît constante à tous niveaux ($\pm 50\ 000$ environ).

Par rapport à cette configuration standard, la configuration « vitesse maximale » montre un biais moyen relatif plus important (de l'ordre de + 4,1 %) et une précision d'estimation également plus élevée au delà d'un niveau de 500 000, en augmentation avec les taux cellulaires des échantillons.

Pour les deux configurations, les biais moyens par tranche de taux cellulaire, même statistiquement significatifs pour certains, restent faibles et dans les limites autorisées par les incertitudes cumulées des étalonnages et des comptages visuels et compatible à la fois avec les besoins du paiement du lait et ceux du contrôle laitier.

La comparaison des résultats des 80 échantillons analysés dans les mêmes conditions sur le SCC 500 et un Somacount 150 (Bentley, USA) fonctionnant sur le principe de la cytométrie de flux utilisé par CECALAIT, montre une étroite concordance entre les deux appareils (écart type résiduel de 16800) sur la plage de calibrage (0 à 2 000x10³). Les paramètres de justesse, calculés par tranche de taux cellulaires sont reportés dans le tableau 2

Etendue de la mesure (x10 ³ cellules/ml)	400 échantillons/heure					450 échantillons/heure				
	n	Moyenne	d	Sd	+/- I	n	Moyenne	d	Sd	+/- I
0 - 100	16	73	+11.1 *	18.2	+/-36.4	16	73	+16.0 *	19.8	+/-40.6
0-200	38	107	+8.2 *	16.3	+/-32.6	38	107	+16.5 *	20.5	+/-41.0
100-300	31	166	+5.5 NS	18.0	+/-36.0	31	166	+17.7 *	21.5	+/-43.0
200-400	15	286	-3.0 NS	26.3	+/-52.6	15	287	+9.9 *	27.9	+/-55.8
330-600	13	435	+10.2 NS	35.4	+/-70.8	13	435	+19.5 *	34.2	+/-68.4
400-600	7	508	+30.4 *	29.7	+/-70.4	7	508	+40.2 *	21.8	+/-43.6
600-1000	13	782	+10.9 NS	27.4	+/-54.8	13	782	+8.0 NS	38.2	+/-76.4
0-500	56	174	+5.4 NS	20.8	+/-41.9	56	174	+15.5 *	22.9	+/-45.8
500-1000	17	728	+18.6 *	28.8	+/-57.6	17	728	+17.2 NS	38.2	+/-76.4
1000-2000	4	1476	+20.9 NS	24.1	+/-48.2	3	1403	+6.4 NS	52.7	+/-105.4
0-2000	77	364	+9.1 *	23.4	+/-46.8	76	346	+15.5 *	27.8	+/-55.6

TABLEAU 2 : Justesse du SCC 500

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

5 CONCLUSION GENERALE

L'appareil ANADIS SCC 500, évalué à la demande de la société PERSTORP/ ANADIS, donne satisfaction sur l'ensemble des points testés: stabilité, traçage, répétabilité et justesse pour les deux configurations de travail et présente les qualités requises pour l'utilisation dans le cadre du paiement du lait et du contrôle laitier.

Pour l'utilisateur, il est important de noter que l'ajustement de la linéarité et la justesse de cet instrument s'effectue de façon simultanée à partir d'une régression polynomiale dont le degré est laissé au choix de l'utilisateur. Cet ajustement est dépendant de la configuration de travail (volumes respectifs, temps de comptage...). Une attention toute particulière doit être portée au choix des étalons (nombre, niveaux cellulaires..), à leur qualité de conservation et à une utilisation exacte des valeurs de référence de manière à prévenir tout artefact d'étalonnage lié à un (ou plusieurs) points « aberrant »s. Un contrôle graphique de l'ajustement ainsi qu'un contrôle de la valeur de l'écart type résiduel doivent être appliqués systématiquement.

Références

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.

Annexe

Configuration 400 échantillons / heure

<u>Volume de lait pompé:</u>	5.0 ml
<u>Volume de colorant pompé:</u>	3.0 ml
<u>Volume analysé:</u>	70 µl
<u>Temps de comptage:</u>	4000 ms
<u>Temporisation:</u>	150 µs
<u>Seuil de discrimination:</u>	800 mV

Configuration 450 échantillons / heure

<u>Volume de lait pompé:</u>	3.0 ml
<u>Volume de colorant pompé:</u>	3.0 ml
<u>Volume analysé:</u>	60 µl
<u>Temps de comptage:</u>	3500 ms
<u>Temporisation:</u>	150 µs
<u>Seuil de discrimination:</u>	800 mV

(par Ph. Trossat et O. Leray)