

Comité du Lait ASBL	Feuille d'enregistrement	FEU-ASQ-00002(1)
Signatures des responsables (document N° 2735)		

0.1 Généralités

Code et version INT-MOP-00004(15)
Titre du document Dénombrement des cellules somatiques du Lait
Type de document Instruction technique
Date d'impression 24/3/20

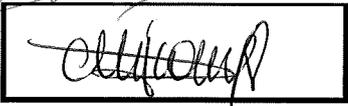
0.2 Résumé

Instruction technique décrivant comment effectuer le comptage des cellules somatiques dans le Lait cru

0.3 Modification par rapport à la version précédente

§6.6.1 : révision des critères pour le CV des échantillons de contrôle en fonction du niveau cellulaire de l'échantillon de contrôle.

0.4 Dates et Signatures

Approbateur	PIRAUX Emile Directeur	25/3/20	
Auteur	VESELKO Didier Responsable technique	24/3/20	
Vérificateur	DELLICOUR Stephanie Responsable laboratoire	25/3/20	
Vérificateur	PIRON Fabienne Responsable labo composition	25/03/20	

Dénombrement des cellules somatiques du Lait

1 Objet et domaine d'application

Cette instruction technique décrit la méthode à utiliser pour le dénombrement des cellules somatiques dans le lait cru de vaches à l'aide d'un appareillage entièrement automatisé.

2 Définitions

- **Cellule Somatique** : les cellules somatiques sont des globules blancs naturellement présents dans le pis de la vache (et donc dans le lait) afin de participer à la défense immunitaire du pis.
- **Blanc** : le « Blanc » est une solution qui analysée par la machine ne donnera aucune impulsion au niveau du module de comptage. Cette solution permet de détecter une éventuelle contamination de l'appareil
- **FMA** : échantillon de contrôle fourni par le constructeur permettant de vérifier le niveau de l'appareil, la valeur de référence à atteindre étant fournie par le constructeur.
- **Echantillon Hüfner** : échantillons de contrôle fourni par la guidance scientifique et préparé par Hüfner (selon son propre protocole) et contenant un dosage cellulaire connu déterminé par une analyse sur les appareils des OIs. La guidance scientifique produit un rapport indiquant la valeur de référence à atteindre.

3 Références

- NOT-ASQ-00001 : « Glossaire Général »
- NOT-FOS-01002 : Procédure pratique d'utilisation du Combi-Foss
- FEU-FOS-02002 : Check-list du Fossomatic 5000 et FC
- NOT-FOS-02001 : Fossomatic 5000/FC : Préparation des réactifs
- ISO 13366-2 (FIL 148-2) : « Lignes directrices pour la mise en œuvre des compteurs fluoro-opto-électronique »

4 Principe de l'analyse

L'appareil prélève une portion de l'échantillon de lait et le mélange à un colorant (bromure d'éthidium) qui a la propriété de se fixer sur l'ADN cellulaire

Le mélange est ensuite injecté au centre de la cellule de mesure dans laquelle circule en permanence un liquide porteur (Sheat Liquid) qui s'écoule en écoulement laminaire. Le film de lait est injecté au centre de ce film porteur et se retrouve donc étiré de manière à ce que chaque cellule puisse être vue individuellement par le microscope optique focalisé sur le film. Un compteur électronique compte les impulsions reçues et en déduit le nombre de cellules présentes dans l'échantillon.

5 Matériel et réactifs

5.1 Matériel et Maintenance

5.1.1 Fossomatic 5000

Il s'agit d'un appareil totalement automatisé effectuant la totalité de l'analyse, depuis le prélèvement de la prise d'échantillon jusqu'à l'impression du résultat final.

L'entretien des appareils est effectué deux fois par an par un technicien formé à cet effet. Pour les dépannages, se référer au guide de l'utilisateur Fossomatic 5000 et au manuel des pièces détachées.

5.1.2 Bain-marie

Utiliser un bain réglable à 47 ± 2 °C

- Soit à circulation
- Soit sans circulation si le chauffage est effectué par les plaques chauffantes collées sous le fond bain.

5.1.3 Verrerie courante de laboratoire

5.2 Réactifs

La liste des réactifs ainsi que la préparation des réactifs sont décrits dans la note technique NOT-FOS-02001, disponible sur la table de préparation des réactifs du laboratoire composition.

6 Analyses

6.1 Préparation des échantillons

Les échantillons sont portés à une température minimum de 42°C dans un bain-marie dans le bain-marie. Le dépassement de cette température est contrôlé à l'aide d'un thermomètre planté dans un échantillon du panier en fin de phase de chauffage.

Les temps de chauffages nécessaires sont les suivants (validation de mars 2004, bain marie réglé sur 47°C) :

Température de départ	Température désirée		
	42 °C	43 °C	44 °C
Echantillon froid (0-4 °C)	13 min.	15 min.	17 min.
Echantillons à température ambiante (20 °C)	9 min.	12 min.	14 min.

Ensuite, il faut :

- Mélanger par une série de minimum 3 lents retournements (éviter l'incorporation de bulles d'air)
- Enlever les bouchons
- Placer les échantillons sur l'appareil. L'opérateur attendra éventuellement quelques instants afin de s'assurer que la température des échantillons ne dépasse pas 42°C au moment où ceux-ci sont présentés à la machine (utilisation du thermomètre).

6.2 Phase de démarrage

Toutes les opérations de la check-list doivent être effectuées au démarrage de l'appareil (FEU-FOS-02002).

L'opérateur doit entre autre faire

- 10 blancs afin de vérifier l'absence de contamination de sa machine.
- Chaque semaine, analyse d'un échantillon de contrôle Hüfner ou FMA afin de vérifier le niveau de l'appareil.

Ces résultats sont interprétés de la manière suivante.

- Les mesures sur les blancs doivent être toutes ≤ 5 et en moyenne ≤ 3
- Le résultat de l'échantillon Hüfner / FMA doit être dans une limite de 10% autour de la valeur de référence fournie par la guidance scientifique / le fournisseur

Si toutes les vérifications sont correctes, on peut débiter les analyses dans le cas contraire, on doit en rechercher les causes et refaire ces tests avant de démarrer.

6.3 Phase d'analyse (routine)

Les échantillons préparés comme décrit au point 6.1 sont analysés sur l'appareil

Régulièrement, la stabilité de l'appareil est vérifiée par le contrôle décrit au point 6.6.1.

Durant les analyses, les échantillons sont placés dans une enceinte fermée et thermostatée dans le but de les maintenir le plus longtemps possible dans la plage de température 37-42°C requise pour les analyses. La validation de méthode réalisée 17/04/2005 (essai 12) a montré le temps que la température d'un casier peut être maintenue dans la plage souhaitée :

Dénombrement des cellules somatiques du Lait

Réglage de l'enceinte thermostatée sur 40°C	Temps pour que la température chute de	
	42°C à 37°C	40°C à 37°C
Casier en attente d'analyse	28 min.	22 min.
Casier en cours d'analyse	15 min.	11 min.

Dès que l'analyse d'un panier est terminée, le ranger en chambre froide dans un délai de maximum 45 minutes après la fin de l'analyse.

6.4 Phase d'arrêt

Après analyse du dernier échantillon, analyser un échantillon de contrôle pour valider la dernière série d'analyses. Interpréter le résultat conformément au point 6.6.1

L'appareil est nettoyé conformément aux notes techniques NOT-FOS-01002 et FEU-FOS-02002

6.5 Etalonnages

6.5.1 Etalonnages

L'appareil ne nécessite aucun étalonnage autre que celui établi en usine par le constructeur.

L'étalonnage est cependant évalué par la participation à des analyses inter laboratoires comme décrit au point 6.6.2.

6.5.2 Re-étalonnages

Aucun étalonnage supplémentaire n'est nécessaire sur l'appareil.

6.6 Contrôles

6.6.1 Contrôles internes

La stabilité de l'appareil est vérifiée régulièrement grâce à l'analyse minimum tous les 50 échantillons d'un échantillon de contrôle composition (ECC).

L'ensemble de ces résultats est enregistré sur la feuille d'enregistrement FEU-FOS-00001 sur laquelle est également calculé la moyenne et l'écart type des résultats. L'appareil sera considéré comme stable si le CV n'excède pas la limite prescrite dans le tableau ci-dessous (extrait ISO 13366-2)

Plage de cellules (/ ml)	Echantillons pour le payement	Echantillons hors payement Vache individuelle
<150.000	7 %	7.5 %
150.000 – 200.000	6 %	
>200.000	5 %	

En cas de dépassement de la valeur limite du CV, le paragraphe 6.10 indiquera les actions à effectuer.

6.6.2 Contrôles externes

Le contrôle de l'exactitude et de la précision est assurée par

- La guidance scientifique qui organise des analyses inter-laboratoires (selon leur propre protocole).

6.6.3 Température des échantillons

L'opérateur contrôle la température de ses échantillons de deux façons :

- Contrôle systématique : l'opérateur s'assure par ce moyen qu'il présente à l'appareil des échantillons ayant une température comprise entre 37 et 42°C.

Dénombrement des cellules somatiques du Lait

- 4 fois par jour : la température du dernier échantillon d'un casier (44°) juste après son analyse afin de garantir qu'elle est comprise entre 37 et 42°C et donc valider l'analyse.

Si une température n'est pas dans les normes, se référer au point 6.10 pour mener l'action corrective adéquate

6.7 Expression du résultat

6.7.1 Interprétation du résultat

Tous les résultats donnés par l'appareil s'expriment en x1000 cellules / ml

6.7.2 Domaine de mesures – Limites

Les résultats sont compris entre 15.000 et 9.999.000 / ml

- 15.000 signifie $\leq 15.000/\text{ml}$
- 9.999.000 signifie $\geq 9.999.000 / \text{ml}$

Sur le rapport d'essai (FEU-ADM-00020) le résultat est exprimé de la manière suivante

- Résultat : exprimé en / ml
- Limite inférieure : $\leq 15000 / \text{ml}$
- Limite supérieure : $\geq 9999000 / \text{ml}$

6.7.3 Sensibilité du résultat

- Il est important de bien mélanger l'échantillon avant son passage sur l'appareil car les cellules se concentrent dans la matière grasse du lait qui décanse naturellement vers la surface.
- Un échantillon doit avoir une température entre 37 et 42°C pour être présenté à l'appareil
- La température de chauffage doit être supérieure à 37°C pour une bonne homogénéisation de l'échantillon.

6.7.4 Performances

Les performances de l'appareil sont résumées ci-dessous. Les données sont tirées du dossier de validation de l'appareil MAT-FOS-00007, 12/2002).

Répétabilité : $S_R=6790$ cellules/ml, $r=19200$ cellules/ml à 234.000 cellules/ml de moyenne

Taux cellulaire / ml	Intervalle de confiance 95% Cellules / ml
50.000	30.000 – 70.000
100.000	80.000 – 120.000
200.000	180.000 – 220.000
300.000	280.000 – 320.000
400.000	380.000 – 420.000
500.000	480.000 – 520.000

Intra-Reproductibilité : $S_R=7060$ cellules/ml, $r=20000$ cellules/ml à 234.000 cellules/ml de moyenne

Taux cellulaire / ml	Intervalle de confiance 95% Cellules / ml
50.000	30.000 – 70.000
100.000	80.000 – 120.000
200.000	180.000 – 220.000
300.000	280.000 – 320.000
400.000	380.000 – 420.000
500.000	480.000 – 520.000

Carry-over : $E=0.31\%$

Taux cellulaire / ml	Carry-over Cellules / ml
50.000	155

Comité du Lait ASBL	INSTRUCTION TECHNIQUE	INT-MOP-00004(15)
Dénombrement des cellules somatiques du Lait		

100.000	310
500.000	1550
1000.000	3100

6.8 Administration

Néant

6.9 Classement et archivage

Néant

6.10 Anomalies usuelles

Description	Solution	Enregistrement	Resp
Les blancs de démarrage ne sont pas bons	Recommencer les analyses jusqu'à obtention de bons résultats	-	Opérateur
	Actions possibles sur l'appareil <ul style="list-style-type: none"> • pipette backflush • waste flush • Vérifier l'encrassement ou le bouchage d'un tuyau et de la pipette. Nettoyer ou remplacer si nécessaire • Flow Cell Flush • Flow Cell Flush Manuel • Appeler le technicien 	-	Opérateur
		Dossier	
L'échantillon Hüfner ou le FMA n'est pas dans les limites de variation autorisées	Rechercher la cause de la divergence, résoudre le problème, puis refaire ce contrôle avant de commencer les analyses	-	Opérateur
Le CV calculé en fin de journée sur les échantillons de contrôle composition du jour dépasse la limite de 5%	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Etape 1</u> : élimination du CV du résultat de l'échantillon de contrôle le plus extrême de la journée ($Res - Moy$ maximum) et annulation des résultats du casier analysé avant et après cet échantillon. • <u>Etape 2</u> : Si le nouveau $CV > 5\%$, répéter l'étape 1 une seconde fois. • <u>Etape 3</u> : Si malgré 1&2 $CV > 5\%$, annuler tous les résultats de la journée 		Resp labo
			Resp labo
		Ouvrir une NC	Resp labo
Problème technique : panne machine, pipette bouchée	Résoudre le problème Estimer l'impact sur les résultats antérieurs et prendre action <ul style="list-style-type: none"> • recommencer les analyses • annuler si ce n'est pas possible 	Laboba	Opérateur
La température du dernier échantillon du casier après analyse est inférieure à 37°C	Annuler les résultats depuis le dernier contrôle de température valide	Laboba	Resp labo
La température des échantillons après chauffage est supérieure à 42°C	<ul style="list-style-type: none"> • Attendre que les échantillons refroidissent avant de commencer l'analyse. 	-	Opérateur

