

Signatures des responsables (document N° 1280)
--

**0.1 Généralités**

Code et version            INT-MOP-00003(7)  
Titre du document        Comptage des germes totaux dans le lait  
Type de document        Instruction technique  
Date d'impression        30/06/2010

**0.2 Résumé**

Instruction technique décrivant comment effectuer le comptage des germes totaux dans le Lait cru

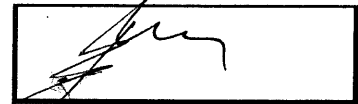
**0.3 Modification par rapport à la version précédente**

Titre : supprimer la référence à l'annexe du protocole  
§2 : Supprimer références au DQPA et ILVO définis dans le glossaire et remplacé par guidance scientifique  
§3 : NOT-ASQ-00001 : « Glossaire Général »  
§6.6.2 : supprimer le contrôle de l'autorité compétente (non fait)  
§6.10 : révision des actions en cas d'anomalies

**0.4 Dates et Signatures**

Approbateur    PIRAUX Emile  
                          Directeur  
  
Auteur            VESELKO Didier  
                          Responsable technique  
  
Vérificateur    HAVELANGE Michel  
                          Responsable laboratoire bactériolo

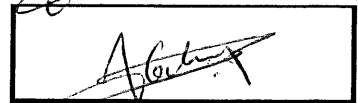
30 JUIN 2010



30 JUIN 2010



30 JUIN 2010



## Comptage des germes totaux dans le lait

### 1 Objet et domaine d'application

Cette instruction technique décrit une méthode automatisée pour le dénombrement de la flore totale du lait cru de vaches.

### 2 Définitions

- **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
- **Bactérie (Bact)** : micro-organisme contaminant naturellement tout milieu, et en particulier le lait.
- **CFU / UFC** : « unité de colonie formée », les bactéries forment de petits agrégats appelés colonies. L'appareil comptabilise les bactéries puis utilise une table de conversion afin d'en déduire le nombre de colonies.
- **BCS** : Bactériol Control Sample. Echantillons de référence fourni par le fabricant et servant à contrôler le bon fonctionnement de l'appareil

### 3 Références

- NOT-ASQ-00001 : « Glossaire Général »
- FEU-FOS-03002 : Check-List BactoScan FC
- NOT-FOS-03002 : BactoScan FC – Procédure pratique d'utilisation
- NOT-FOS-03001 : BactoScan FC – Préparation des réactifs
- FEU-CMP-00001 : Comparaison entre séries de résultats
- FEU-FOS-03003 : Limites de variation autorisées pour l'échantillons de contrôle germes

### 4 Principe de l'analyse

Une prise d'échantillon de lait est mélangée par l'appareil à un réactif d'incubation. Ce réactif est principalement composé d'une solution enzymatique et d'une solution de colorant (bromure d'éthidium).

Durant l'incubation, les colonies sont dispersées en bactéries individuelles, elles sont colorées, et les autres constituants du lait sont dégradés par les enzymes (matière grasse, cellules somatiques, ...)

Le mélange est alors passé dans la cellule de mesure où chaque bactérie est comptée individuellement

Les bactéries ainsi comptées sont transformées en colonies via une table de conversion établie en collaboration avec la guidance scientifique.

### 5 Matériel et réactifs

#### 5.1 Matériel et Maintenance

##### 5.1.1 BactoScan FC

Le BactoScan FC est un instrument entièrement automatisé basé sur le principe de la cytométrie de flux.

L'échantillon de lait cru à analyser est traité avec un réactif d'incubation afin, d'une part, de détruire les protéines, les cellules somatiques et les globules gras et, d'autre part, de colorer les bactéries avec du bromure d'éthidium.

Après incubation, le mélange est transféré dans l'unité de mesure. L'échantillon est entraîné par un liquide vecteur (en écoulement laminaire) au travers de la cellule de mesure que les bactéries fluorescentes traversent.

La lumière émise par un laser est renvoyée par les bactéries vers un lecteur optique qui génère une impulsion électronique au passage de chaque bactérie. Les impulsions sont comptabilisées afin de donner un résultat en nombre de bactéries pour l'échantillon.

## Comptage des germes totaux dans le lait

Ce résultat est ensuite transformé dans l'unité de référence (CFU/ml) à l'aide d'une table de conversion déterminée selon les spécifications du constructeur et en collaboration avec la guidance scientifique (voir 6.5.1).

L'entretien de l'appareil est effectué une fois l'an par un technicien formé à cet effet.

### 5.1.2 Verrerie courante de laboratoire

## 5.2 Réactifs

### 5.2.1 Réactifs du BactoScan

Les réactifs nécessaires à la préparation des solutions mères, des solutions de travail et de la solution de contrôle (BCS, PCS) sont disponibles auprès du fabricant (Foss-Hillrød-Denmark).

La préparation de ces solutions est décrite dans la note technique NOT-FOS-03001.

### 5.2.2 Échantillons de contrôle

La guidance scientifique fabrique un échantillon de contrôle germes totaux pour la matrice « lait cru ». Ces échantillons sont fournis congelés à -18°C, et doivent être conservés dans les mêmes conditions à maximum -18°C.

Le nombre de colonies germes totaux est déterminée par une analyse sur les BactoScan des OIs.

Les échantillons nécessaires à la journée de travail sont décongelés pendant une nuit dans la chambre froide MAT-REF-00002 (0-4°C). Ils peuvent être utilisés tout au long de la journée de travail pour autant qu'ils soient maintenus entre 0 et 4 °C.

## 6 Analyses

### 6.1 Préparation des échantillons

Les échantillons froids sont directement analysés, sans autre traitement préalable qu'un mélange par retournement lents (minimum 5) de manière à ne pas incorporer de bulles d'air. Si l'opérateur constate un dépôt visible de matière grasse, l'échantillon doit être homogénéisé plus efficacement.

### 6.2 Phase de démarrage

Tous les matins, l'opérateur utilise la check-list (FEU-FOS-03002) afin d'effectuer toutes les opérations nécessaires au démarrage.

Le bon fonctionnement de l'appareil est vérifié en analysant dans l'ordre les échantillons suivants :

- 3 échantillons de blancs – 1 analyse par échantillon
- 1 échantillon de BCS – 3 analyses par échantillon
- 3 échantillons de blancs – 1 analyse par échantillon
- 1 échantillon de contrôle – 1 analyse par échantillon

#### Interprétation

- Tous les blancs doivent être < 10 avec une moyenne < 5. le premier blanc juste après le BCS peut monter jusqu'à 10 et ne compte pas dans la moyenne de la seconde série.
- Les résultats sur le BCS (Bactérie comptées, moyenne) doivent être dans les limites prescrites par le fabricant (voir la boîte de conditionnement).
- L'échantillon de contrôle est interprété conformément au point 6.6.1

Lorsque plusieurs appareils sont en fonctionnement simultanément, avant de démarrer les analyses, une analyse comparative est effectuée par couple d'appareil sur 18 échantillons. L'opérateur dispose de la feuille d'enregistrement FEU-CMP-00001 afin d'enregistrer, d'effectuer les calculs et d'interpréter les résultats de la comparaison. L'écart moyen observé entre les log des résultats ne peut excéder  $0.226/\sqrt{N}$ , 0.226 étant la

reproductibilité de l'appareil et N le nombre d'échantillons utilisés pour la comparaison. On ne prendra en compte que les couples de résultats pour lesquels les deux valeurs sont  $\geq 10.000$  CFU/ml.

### 6.3 Phase d'analyse (routine)

Le dénombrement des bactéries est automatisé et ne requiert aucune manipulation particulière.

Le bon fonctionnement de l'appareil est vérifié régulièrement au moyen de l'échantillon de contrôle (voir 6.6.1).

### 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.

Toutes les opérations reprises sur la Check-List FEU-FOS-03002 doivent être effectuées.

### 6.5 Etalonnages

#### 6.5.1 Etalonnages

Suite au travail effectué en Mai 2002 par Mr Thomas DECONINCK (guidance scientifique) l'équation d'étalonnage (table de conversion) doit être adaptée. La table active dans la machine depuis cette date est la suivante :

Bact <-> CFU	Bact <-> CFU	Bact <-> CFU	Bact <-> CFU	Bact <-> CFU
2 – 1	50 – 13	243 – 49	805 – 134	5647 – 687
9 – 3	64 - 16	321 – 62	1612 – 240	7257 – 848
16 – 5	78 – 19	481 – 87	2416 – 337	8822 – 999
32 – 9	163 - 35	643 – 111	4033 – 518	

NB sur les unités du tableau ci-dessus.

- Les Bactéries s'expriment en x 1000 impulsions / ml
- Les colonies CFU s'expriment en x 1000 CFU / ml

Remarque importante : tout résultat produit par l'appareil doit toujours être multiplié par 1000 afin d'obtenir le comptage sur 1ml de lait.

Aucune maintenance de cet étalonnage n'est nécessaire, et il est valable pour tous les appareils de ce type.

#### 6.5.2 Re-étalonnages

Aucun re-étalonnages n'est nécessaire au bon fonctionnement de la machine.

### 6.6 Contrôles

#### 6.6.1 Contrôles internes

Le bon fonctionnement de l'appareil est vérifié tous les 300 échantillons environ au moyen de l'échantillon de contrôle.

La mesure effectuée doit être égale à la valeur fournie par la guidance scientifique  $\pm 20\%$ . Ces limites sont consignées par écrit sur la feuille d'enregistrement FEU-FOS-03003 « Limites de variation autorisées pour l'échantillons de contrôle germes » se trouvant dans le congélateur contenant les échantillons (MAT-REF-00004). Une copie sera également disponible sur les appareils.

Remarque : Lorsque l'échantillon de contrôle est défaillant, le laboratoire constituera son propre échantillon de contrôle à l'aide d'un lait UHT. 10 échantillons seront analysés afin de fixer la valeur de référence.

En cas de dérive constatée, se référer au § 6.10 afin de résoudre l'incident avant de reprendre les analyses.

## Comptage des germes totaux dans le lait

En milieu et en fin de journée, on analysera un échantillon blanc de manière à s'assurer que l'appareil ne présente aucune contamination. Si les résultats sont  $<10$  et la moyenne  $<5$ , le contrôle sera valide. Dans le cas contraire, on se réfèrera à ce qui est décrit au § 6.10.

### 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).
- 

## 6.7 Expression du résultat

### 6.7.1 Interprétation du résultat

L'utilisation de la grille de conversion Bactéries  $\rightarrow$  CFU est automatiquement faite dans l'appareil.

Tous les résultats CFU donnés par l'appareil sont  $\times 1000$  CFU / ml

### 6.7.2 Domaine de mesures – Limites

Les mesures sont exprimées en milliers de CFU (unité formant colonie) par ml.

Le résultat minimum est de 1.000 CFU/ml et le résultat maximum est de 999.000 CFU / ml.

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

- Résultat : exprimé en / ml
- Limite inférieure :  $\leq 1000$  / ml
- Limite supérieure :  $\geq 999000$  / ml

### 6.7.3 Sensibilité du résultat

Les germes sont des organismes vivants se multipliant d'autant plus rapidement que la température est élevée.

Pour que le résultat produit soit le plus précis possible, il est très important de limiter au maximum (maximum 30 minutes) le temps entre la sortie du frigo et le prélèvement par la machine (Essai du 11/06/1997).

### 6.7.4 Performances

Justesse

- $S_{y,x} < 0.25$  unités log selon le constructeur
- $S_{y,x} = 0.287 \log_{10}$  CFU / ml selon l'étude de V NINANE (07/1999)
- $S_{y,x} = 0.271 \log_{10}$  CFU / ml selon la validation de méthode de D VESELKO (01/2004)

Le tableau ci dessous donne un ordre de grandeur de la justesse

CFU / ml	CFU $\pm$ Syx V Ninane (07/1999)	CFU $\pm$ Syx D Veselko (01/2004)
10.000	5164 - 19364	5358 - 18664
20.000	10328 - 38728	10716 - 37328
50.000	25821 - 96821	26790 - 93319
100.000	51642 - 193642	53580 - 186638
200.000	103283 - 387284	107159 - 373276
500.000	258208 - 968211	267898 - 933190
999.000	515900 - 1934486	535261 - 1864513

Erreur de carry-over

- < 0.5 % selon le constructeur
- < 0.09 % selon l'étude de V NINANE (07/1999)
- < 0.19 % selon la validation de méthode de D VESELKO (01/2004)

CFU / ml	Carry-Over CFU/ml V Ninane (07/1999)	Carry-Over CFU/ml D Veselko (01/2004)
10.000	9	19
20.000	18	38
50.000	45	95
100.000	90	190
200.000	180	380
500.000	450	950
999.000	899	1898

Limite de détection

- entre 2473 imp./ml et >20 10<sup>6</sup> imp./ml (0900 CFU/ml et 1.7 10<sup>6</sup> CFU/ml) (V NINANE (07/1999))
- entre 4000 imp./ml et >30 10<sup>6</sup> imp./ml (3625 CFU/ml et 2.7 10<sup>6</sup> CFU/ml) (D VESELKO (01/2004))
- Linéarité garantie dans la même plage de mesure. (V NINANE (07/1999) & D VESELKO (01/2004))

Répétabilité

Contamination 10 <sup>3</sup> impulsion / ml	Annoncé par le constructeur Log <sub>10</sub> imp. / ml		Etude de V. NINANE (07/1999) Log <sub>10</sub> imp. / ml	
	Sr	R	Sr	r
10 – 50	0.08	0.226	0.045	0.127
51 – 100	0.06	0.170	0.045	0.127
101 – 200	0.06	0.170	0.029	0.083
>200	0.05	0.142	0.029	0.083

Contamination 10 <sup>3</sup> impulsion / ml	Valid D Veselko (01/2004) Log <sub>10</sub> imp. / ml	
	Sr	R
10 – 50	0.025	0.130
51 – 100	0.032	0.092
101 – 200	0.019	0.055
>200	0.008	0.023

En pratique on pourra utiliser le tableau suivant :

CFU / ml	r en CFU/ml
10.000	2459
20.000	4919
50.000	8025
100.000	16050
200.000	32100
500.000	80249
999.000	160337

Reproductibilité

Contamination 10 <sup>3</sup> impulsion / ml	Annoncé par le constructeur Log <sub>10</sub> imp. / ml	
	S <sub>R</sub>	R
10 – 50	0.12	0.340
51 – 100	0.08	0.226
101 – 200	0.08	0.226
>200	0.07	0.198

### 6.8 Administration

Néant

### 6.9 Classement et archivage

Les documents suivants

- Check-List (FEU-FOS-03002)
- Analyses des échantillons de contrôle
- Analyses de démarrage
- Analyses comparatives (FEU-CMP-00001)

Doivent être

- Triés par appareil et par ordre chronologique
- Rangés dans l'armoire prévue à cet effet 6 mois
- Archivés 3 ans

### 6.10 Anomalies usuelles

Description	Solution	Enregistrement	Resp
Les blancs ne sont pas bons	Recommencer les analyses jusqu'à l'obtention de bons résultats.	Annexe au check-list	Opérateur
	Si nécessaire faire (dans l'ordre) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Changer filtre incubation</li> <li>• Procédure d'arrêt - redémarrage complète</li> <li>• Refaire de nouveaux réactifs</li> <li>• Changer les deux filtres à réactif</li> <li>• Nettoyer la roue d'incubation</li> </ul>	Fiche de vie	Opérateur
	Si le problème persiste contacter le service technique.	Fiche de vie	Technicien
Message d'erreur de tout type	Recommencer les analyses	Aucun	Opérateur
La phase de démarrage ne se passe pas correctement (§6.2)	Rechercher les causes et résoudre le problème.  Refaire une phase de démarrage  Ne pas démarrer les analyses tant que l'on n'a pas eu une phase de démarrage correcte		
L'échantillon de contrôle est hors des limites autorisées	Analyser l'échantillon de contrôle sur un autre appareil afin de s'assurer que le problème ne provient pas de l'échantillon :	Copie en annexe du ctrl pas bon	Opérateur
	Si cette contre-analyse donne également un résultat hors limites, l'échantillon est mis en doute, en analyser un autre	Imprimer résultats	Opérateur
	Si le résultat de d'un autre échantillon est dans les limites, l'appareil est ok et les analyses sont ok.	Feuille de résultats	Opérateur
	Dans tous les autres cas, il faut rechercher la cause du problème avant de poursuivre :	Imprimer résultats	Opérateur
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recommencer la phase de démarrage (blancs et BCS) afin de s'assurer du bon fonctionnement de l'appareil.</li> <li>• Refaire de nouveaux réactifs</li> <li>• Si le problème persiste, contacter le</li> </ul>	Prépa réactifs  Fiche de vie	Opérateur  Technicien

Comptage des germes totaux dans le lait

	service technique. Après résolution du problème, les échantillons analysés depuis de dernier échantillon de contrôle valide seront ré analysés. Si une réanalyse est impossible, les résultats seront annulés	LABOBA	Resp labo
Panne de l'appareil	Dans ce cas, il faut <ul style="list-style-type: none"> <li>réparer la panne</li> <li>l'enregistrer dans la fiche de vie</li> <li>faire des tests afin de vérifier l'efficacité de la réparation avant de reprendre les analyses</li> </ul>	Fiche de vie	Opérateur Resp labo RT
	Les tests que l'on peut faire afin d'évaluer l'efficacité de la réparation sont <ul style="list-style-type: none"> <li>analyse de blancs</li> <li>analyse d'échantillon de contrôle</li> <li>phase de démarrage</li> <li>comparaison entre appareils</li> </ul> Selon la nature de la panne, le responsable labo décidera des contrôles à effectuer. Ces contrôles seront consignés dans le dossier de l'appareil	Fiche de vie	Resp Labo
	Après résolution de la panne, faire une évaluation de l'impact sur les résultats. Le responsable du labo pourra alors dans l'ordre soit <ul style="list-style-type: none"> <li>valider les résultats</li> <li>ré analyser les échantillons analysés depuis de dernier échantillon de contrôle valide</li> <li>annuler les résultats</li> </ul>	Fiche de vie	Resp labo
Le blanc de milieu ou de fin de journée est $\geq 10$ ou la moyenne $\geq 5$	Rechercher la cause du problème Annuler les résultats des échantillons analysés depuis le dernier blanc valide	Non conformité	Resp labo