

---

---

**Insémination artificielle des animaux —  
Semences congelées de taureaux  
reproducteurs — Dénombrement des  
micro-organismes aérobies vivants**

**(standards.iteh.ai)**

*Artificial insemination of animals — Frozen semen of breeding bulls —  
Enumeration of living aerobic micro-organisms*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30f4dd1e-ccdd-44be-921d-89d48a7a7574/iso-tr-8607-1991>



## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales, mais, exceptionnellement, un comité technique peut proposer la publication d'un rapport technique de l'un des types suivants:

- type 1, lorsque, en dépit de maints efforts, l'accord requis ne peut être réalisé en faveur de la publication d'une Norme internationale;
- type 2, lorsque le sujet en question est encore en cours de développement technique ou lorsque, pour toute autre raison, la possibilité d'un accord pour la publication d'une Norme internationale peut être envisagée pour l'avenir mais pas dans l'immédiat;
- type 3, lorsqu'un comité technique a réuni des données de nature différente de celles qui sont normalement publiées comme Normes internationales (ceci pouvant comprendre des informations sur l'état de la technique, par exemple).

Les rapports techniques des types 1 et 2 font l'objet d'un nouvel examen trois ans au plus tard après leur publication afin de décider éventuellement de leur transformation en Normes internationales. Les rapports techniques du type 3 ne doivent pas nécessairement être révisés avant que les données fournies ne soient plus jugées valables ou utiles.

L'ISO/TR 8607, rapport technique du type 1, a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

La décision a été prise de publier ce document sous la forme d'un rapport technique de type 1, étant donné qu'au stade de projet de comité, aucun consensus n'a pu être obtenu eu égard aux commentaires techniques formulés par plusieurs comités membres.

© ISO 1991

Droits de reproduction réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

# Insémination artificielle des animaux — Semences congelées de taureaux reproducteurs — Dénombrement des micro-organismes aérobies vivants

## 1 Domaine d'application

Le présent Rapport technique prescrit une méthode pour le dénombrement des micro-organismes vivants dans les semences congelées de taureaux reproducteurs, par comptage des colonies obtenues en milieu solide, après incubation en aérobiose à 37 °C.

## 2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour le présent Rapport technique. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur le présent Rapport technique sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

ISO 7218:1985, *Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques.*

## 3 Définitions

Pour les besoins du présent Rapport technique, les définitions suivantes s'appliquent.

**3.1 semence:** Produit provenant des organes génitaux mâles, destiné à la fécondation d'une femelle.

**3.2 éjaculat:** Quantité de semence résultant d'une éjaculation.

**3.3 dose de semence:** Quantité de semence, individuellement emballée et portant une identification unique, destinée à une seule insémination.

**3.4 série de doses:** Ensemble des doses de semence d'un seul taureau, résultant d'un ou de plusieurs éjaculats obtenus le même jour et soumis au même traitement.

**3.5 micro-organismes aérobies vivants:** Bactéries, levures, moisissures se développant en aérobiose à 37 °C dans les conditions opératoires décrites dans le présent Rapport technique.

## 4 Principe

**4.1** Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture défini, coulé dans deux boîtes de Petri, avec une quantité déterminée de l'échantillon.

**4.2** Incubation en aérobiose de ces deux boîtes à 37 °C ± 1 °C pendant 72 h.

**4.3** Calcul du nombre de micro-organismes par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues.

## 5 Milieu de culture et diluant

### 5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218.

### 5.2 Diluant

Utiliser le diluant prescrit dans l'ISO 6887.

### 5.3 Milieu gélosé

#### 5.3.1 Composition

Extrait de viande	10,0 g
Dextrose anhydre (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1,0 g
Extrait de levure en poudre	2,5 g
Peptone	3,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	2,0 g
Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	2,0 g
Gélatine	10,0 g
Agar-agar en poudre ou en paillettes	13,0 g à 15,0 g <sup>1)</sup>
Eau	1 000 ml

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

#### 5.3.2 Préparation

Dissoudre les composants de base ou le milieu complet déshydraté, dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,4 \pm 0,1$  à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes ou dans des fioles (6.3) en quantités telles que le récipient soit à demi rempli.

Stériliser à l'autoclave (6.1) à  $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  pendant 15 min.

Si le milieu doit être utilisé extemporanément, le refroidir à  $45 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$  au bain d'eau (6.8) et compléter avec 10 % (V/V) de sérum de bovin ou de mouton inactivé et stérilisé<sup>1)</sup>. Dans le cas contraire, avant de commencer l'examen microbiologique, faire fondre complètement le milieu dans un bain d'eau bouillante, puis refroidir au bain d'eau (6.8) à  $45 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ , et ajouter 10 % (V/V) de sérum de bovin ou de mouton inactivé et stérilisé<sup>1)</sup>.

## 6 Appareillage et verrerie

NOTE 1 Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et

**6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave), voir l'ISO 7218.**

1) Par ultracentrifugation ou par tyndallisation.

**6.2 Étuve**, réglable à  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ .

**6.3 Tubes à essais**, de diamètre 16 mm et de longueur 160 mm, ou **fioles**, de capacité ne dépassant pas 500 ml.

**6.4 Boîtes de Petri**, en verre ou en matière plastique, d'un diamètre de 90 mm à 100 mm.

**6.5 Pipettes** (pas de pipettes à souffler), de 1 ml de capacité nominale, graduées en 0,1 ml.

**6.6 pH-mètre**, électrique, précis à  $\pm 0,1$  unité de pH à 25 °C.

**6.7 Bain d'eau**, réglable à  $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ .

**6.8 Bain d'eau**, réglable à  $45 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ .

**6.9 Appareil de comptage de colonies**, comportant un système d'éclairage avec fond noir, muni d'une loupe devant être utilisée à un grossissement de  $\times 1,5$  et d'un compteur numérique mécanique ou électronique.

## 7 Échantillonnage

Choisir au hasard, dans une série de doses, le nombre nécessaire de doses de semence congelée de tous types (paillettes de 0,25 ml ou de 0,5 ml, pellets, minitubes), pour que la quantité d'échantillon soit de 1,0 ml par série de doses.

Conserver les échantillons pour essai sous azote liquide.

NOTE 2 Sur demande, les échantillons pour essai peuvent être transférés du grand récipient de conservation sous azote liquide dans un petit récipient de laboratoire.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Avant utilisation, décongeler les échantillons pour essai au bain d'eau (6.7) à  $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$  pendant 3 min.

IMPORTANT — Les échantillons pour essai décongelés peuvent être conservés au réfrigérateur à environ 4 °C pendant 1 h au maximum.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Préparer la suspension mère conformément à l'ISO 6887. Le nombre d'autres dilutions à effectuer

dépend de la teneur en antibiotiques de la suspension mère, comme indiqué ci-dessous.

- a) Si la suspension mère contient les antibiotiques habituels, notamment  $10^3$  U.I. de pénicilline et 1 mg de streptomycine ou d'autres antibiotiques à large spectre d'activité, par millilitre de diluant, utiliser une dilution finale de  $10^{-4}$ .
- b) Si la quantité d'antibiotiques diffère de celle mentionnée en a), utiliser une dilution finale telle que la quantité ne dépasse pas 0,1 U.I. de pénicilline et 0,1 µg par millilitre de diluant pour les antibiotiques à large spectre d'activité.

NOTE 3 Une concentration d'antibiotiques plus élevée peut avoir un effet inhibiteur sur les micro-organismes et fausser les résultats.

## 9.2 Boîtes de contrôle

Ensemencer et incuber deux boîtes de contrôle, parallèlement aux opérations spécifiées en 9.3, mais en utilisant 1 ml de diluant (5.2) au lieu de la dilution finale (9.1).

## 9.3 Ensemencement et incubation

9.3.1 Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.4). Transférer dans chacune d'elles, à l'aide d'une pipette stérile (6.5), 1 ml de la dilution finale (9.1).

9.3.2 Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 15 ml de milieu gélosé (5.3) à  $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ . Le temps s'écoulant entre la fin de la préparation de la suspension mère et le moment où les dilutions sont en contact avec le milieu de culture, ne doit pas être supérieur à 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser se solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche horizontale.

9.3.3 Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'étuve (6.2) réglée à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Les incuber pendant 72 h.

## 9.4 Interprétation des résultats

### 9.4.1 Examen des boîtes de contrôle

Dans tous les cas, effectuer un premier examen des boîtes de contrôle (9.2) pour déterminer si des colonies sont présentes à l'intérieur du milieu. Si des colonies sont présentes, rejeter les boîtes de contrôle et les boîtes contenant l'échantillon pour essai et répéter le processus.

Si des colonies ne sont pas présentes, procéder à l'examen des boîtes contenant l'échantillon pour essai (9.4.2).

### 9.4.2 Dénombrement des colonies

Si aucune colonie n'est visible à l'intérieur des boîtes de contrôle après la période d'incubation (voir 9.4.1), procéder au comptage des colonies sur les deux boîtes à l'aide de l'appareil de comptage (6.9) ou à l'œil nu.

Ne retenir, pour le dénombrement, que les colonies bien distinctes qui se sont développées à l'intérieur de la gélose. Éliminer les colonies situées à la surface du milieu. Rejeter chaque boîte dont la moitié de la surface, ou plus, est envahie.

## 10 Expression des résultats

### 10.1 Boîtes contenant des colonies

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique du nombre de colonies trouvées dans les deux boîtes, multipliée par  $1/d$ , où  $d$  est le facteur de dilution de la dilution finale [ $d = 10^{-4}$  pour les dilutions finales préparées conformément à 9.1a)], et exprimée en micro-organismes par millilitre d'échantillon pour essai.

### 10.2 Plaques ne contenant pas de colonies

Si il n'y a aucune croissance observée provenant de la dilution finale, exprimer le résultat comme étant inférieur à  $1/d$  micro-organismes par millilitre d'échantillon pour essai où  $d$  est le facteur de dilution de la dilution finale.

## 11 Répétabilité

La différence entre le nombre de colonies trouvées dans les deux boîtes d'échantillon ne doit pas dépasser 30 %.

## 12 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans le présent Rapport technique, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Page blanche

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO/TR 8607:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30f4dd1e-ccdd-44be-921d-89d48a7a7574/iso-tr-8607-1991>

Page blanche

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO/TR 8607:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30f4dd1e-ccdd-44be-921d-89d48a7a7574/iso-tr-8607-1991>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO/TR 8607:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30f4dd1e-ccdd-44be-921d-89d48a7a7574/iso-tr-8607-1991>

---

---

**CDU 636.082.453.52**

**Descripteurs:** élevage, insémination artificielle, taureau, dose de semence, analyse microbiologique, détermination, microorganisme.

Prix basé sur 3 pages

---

---