
**Lait — Dénombrement des cellules
somatiques**

**Partie 1:
Méthode au microscope**

Milk — Enumeration of somatic cells —

Part 1: Microscopic method
STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 13366-1:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7a2bb350-2601-41b1-a928-4c21d6ce5023/iso-13366-1-1997>



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.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 13366-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers* en collaboration avec la Fédération internationale de laiterie (FIL) et l'AOAC INTERNATIONAL, et sera également publiée par ces organisations.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7a2bb350-2601-41b1-a928-3561-99>

L'ISO 13366 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Lait — Dénombrement des cellules somatiques*:

- *Partie 1: Méthode au microscope*
- *Partie 2: Méthode au compteur électronique de particules*
- *Partie 3: Méthode fluoro-opto-électronique*

L'annexe A de la présente partie de l'ISO 13366 est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1997

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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
Internet central@isocs.iso.ch
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

Lait — Dénombrement des cellules somatiques

Partie 1:

Méthode au microscope

AVERTISSEMENT — L'utilisation de la présente Norme internationale implique l'intervention de produits, d'opérations et d'équipements à caractère dangereux. La présente Norme internationale n'a pas la prétention d'aborder tous les problèmes de sécurité concernés par son usage. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente Norme internationale de consulter et d'établir des règles de sécurité et d'hygiène appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires avant utilisation.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 13366 prescrit une méthode pour le dénombrement des cellules somatiques à la fois dans le lait cru et dans le lait contenant des conservateurs chimiques. La méthode est applicable à la préparation d'échantillons pour essais étalons et à l'étalonnage de procédés mécanisés et automatiques de comptage des cellules.

2 Définition

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 13366, la définition suivante s'applique.

2.1 cellules somatiques: Cellules pourvues d'un noyau, c'est-à-dire les leucocytes et les cellules épithéliales.

3 Principe

Étalement sur une lame d'une prise d'essai prélevée dans le lait soumis à l'essai, jusqu'à l'obtention d'un film. Séchage et coloration du film, puis comptage des cellules colorées à l'aide d'un microscope. Multiplication du nombre de cellules comptées sur une surface définie par un coefficient de travail permettant d'obtenir le nombre de cellules par millilitre.

4 Réactifs

AVERTISSEMENT — Le tétrachloroéthane est un poison et le bromure d'éthidium est toxique. La préparation et l'application de la solution de coloration doivent être effectuées sous hotte fermée. Utiliser des gants de protection.

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déionisée ou de pureté équivalente.

4.1 Solution de coloration

4.1.1 Composition

Éthanol 95 % (V/V)	54,0 ml
Tétrachloroéthane	40,0 ml
Bleu de méthylène	0,6 g
Acide acétique, cristallisable	6,0 ml

NOTE — Le tétrachloroéthane peut être remplacé par la même quantité de trichloroéthane. À la place du bleu de méthylène, du bromure d'éthidium peut être utilisé (voir l'ISO 13366-3).

4.1.2 Préparation

Mélanger l'éthanol et le tétrachloroéthane dans un flacon. Chauffer le mélange dans le bain d'eau (5.1) réglé à 65 °C. Ajouter le bleu de méthylène et mélanger soigneusement. Refroidir dans un réfrigérateur jusqu'à 4 °C, puis ajouter l'acide acétique cristallisable. Faire passer la solution sur un filtre de porosité appropriée (5.3) et la conserver dans un flacon hermétiquement fermé. Si nécessaire, filtrer à nouveau la solution avant de l'utiliser.

5 Appareillage

iTeh STANDARD PREVIEW

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit

(standards.iteh.ai)

ISO 13366-1:1997

5.1 **Bain d'eau**, réglable à 65 °C ± 5 °C. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7a2bb350-2601-41b1-a928-4c21d6ce5023/iso-13366-1-1997>

5.2 **Bain d'eau**, réglable à 35 °C ± 5 °C.

5.3 **Filtre**, résistant aux solvants utilisés de porosité comprise entre 10 µm et 12 µm ou inférieure.

5.4 **Microscope**, permettant un grossissement compris entre × 500 et × 1 000.

Si du bromure d'éthidium est utilisé, le microscope doit être muni d'un équipement de fluorescence.

5.5 **Microseringue**, de 0,01 ml de capacité, avec une tolérance maximale de 2 %.

5.6 **Lames**, avec repères correspondant aux dimensions du film, soit 20 mm × 5 mm, ou lames ordinaires avec gabarit de 20 mm × 5 mm.

5.7 **Plaque chauffante**, réglable à 40 °C ± 10 °C.

5.8 **Ventilateur**, de type sèche-cheveux.

6 Échantillonnage

6.1 Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode prescrite dans la présente partie de l'ISO 13366. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707 [1].

6.2 Si des échantillonneurs automatiques sont utilisés, ils doivent avoir fait l'objet de contrôles appropriés.

6.3 Avant l'essai ou la conservation, il convient que les échantillons soient entreposés à une température comprise entre 2 °C et 6 °C.

6.4 Les échantillons qui ne sont pas soumis à l'essai dans les 6 h suivant l'échantillonnage, doivent être conservés en leur ajoutant de l'acide borique. La concentration finale de l'échantillon en acide borique ne doit pas dépasser 0,6 g pour 100 ml. Conserver ces échantillons à une température comprise entre 2 °C et 6 °C pendant 24 h au plus.

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Chauffer l'échantillon pour essai dans le bain d'eau (5.2) réglé à 35 °C. Le mélanger soigneusement et le laisser refroidir à la température à laquelle la microseringue a été étalonnée, par exemple 20 °C.

8 Mode opératoire

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Pour chaque échantillon pour essai, préparer et dénombrer au moins deux films. Nettoyer les lames (5.6), par exemple avec de l'éthanol. Les sécher à l'aide d'un morceau de papier sans poussière, les flamber puis les laisser refroidir.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7a2bb350-2601-41b1-a928-4c21d6ce5023/iso-13366-1-1997>

8.1 Prise d'essai et préparation du film

Prélever, à l'aide de la microseringue (5.5), 0,01 ml de l'échantillon pour essai préparé (article 7). Nettoyer soigneusement la paroi extérieure de la seringue qui s'est trouvée en contact avec l'échantillon. Placer la prise d'essai sur une lame propre, à l'intérieur du repère de 20 mm × 5 mm (voir 5.6). Puis remplir cet espace aussi régulièrement que possible en étalant la prise d'essai. Sécher le film sur la plaque chauffante (5.7) jusqu'à ce qu'elle soit complètement sèche. De meilleurs résultats sont obtenus en laissant sécher les films pendant plusieurs heures à la température ambiante.

Tremper la lame recouverte du film séché dans la solution de coloration (4.1) pendant 10 min. Si nécessaire, réaliser le séchage avec le ventilateur (5.8). Tremper ensuite le film dans de l'eau du robinet jusqu'à élimination du surplus de solution de coloration. Sécher à nouveau la lame et la conserver à l'abri de la poussière.

8.2 Détermination

À l'aide du microscope (5.4), compter les noyaux de cellules présents dans le film (au moins 400). Ils sont aisément reconnaissables et la moitié au moins devrait apparaître dans le champ du microscope. Compter les noyaux dans la partie centrale des bandes verticales du film. Éviter de compter les bandes sélectionnées uniquement à la périphérie du film.

Vérifier au moins une fois par mois que les films ont été correctement préparés en réalisant un comptage à partir de différentes parties du film, afin de garantir la fiabilité des résultats obtenus.

9 Calcul et expression des résultats

9.1 La longueur des bandes devant être dénombrées doit être de 5 mm. La largeur d'une bande correspond au diamètre du champ du microscope. Avec une prise d'essai de 0,01 ml, calculer le coefficient de travail du microscope, w_f , à l'aide de l'équation suivante:

$$w_f = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

où

d est la valeur numérique du diamètre, en millimètres, du champ du microscope;

b est le nombre de bandes entièrement dénombrées.

9.2 Le nombre de cellules somatiques dénombrées est multiplié par le coefficient de travail, w_f , pour obtenir le nombre de cellules par millilitre d'échantillon.

10 Fidélité

10.1 Répétabilité et reproductibilité

L'annexe B de l'ISO 13366-3:1997 donne des recommandations relatives aux méthodes de contrôle de la qualité et les essais interlaboratoires.

10.2 Nombre minimal de cellules à dénombrer

Le dénombrement au microscope des cellules somatiques peut également être utilisé pour l'étalonnage de procédés automatiques et mécanisés de dénombrement. Par conséquent, le coefficient de variation des dénombrements sur des échantillons identiques ne dépassera pas celui des instruments électroniques. Ce coefficient de variation d'un échantillon de lait contenant 400 000 cellules par millilitre à 600 000 cellules par millilitre, dont 80 % environ de neutrophiles, ne doit pas dépasser 5 %.

Afin de satisfaire à cette exigence, au moins 400 cellules somatiques doivent être dénombrées dans chaque échantillon. La distribution de Poisson présuppose que

$$M = V = s_d^2$$

où

M est la valeur moyenne;

V est la variance;

s_d est l'écart-type.

Le coefficient de variation, CV, est

$$CV = \frac{s_d \times 100}{M} \%$$

ou

$$CV = \frac{100}{s_d} \%$$

ou

$$CV = \frac{100}{\sqrt{M}} \%$$

où M est la valeur moyenne qui, pour le cas du dénombrement des cellules somatiques, est le nombre des particules (cellules) dénombrées.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer:

- la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué, si elle est connue;
- la méthode utilisée;
- le coefficient de travail du microscope;
- le(s) résultat(s) d'essai obtenu(s), et
- si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

Il doit en outre mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente partie de l'ISO 13366, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le(s) résultat(s).

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 13366-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7a2bb350-2601-41b1-a928-4c21d6ce5023/iso-13366-1-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7a2bb350-2601-41b1-a928-4c21d6ce5023/iso-13366-1-1997>

Annexe A **(informative)**

Bibliographie

- [1] ISO 707:1997, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices pour l'échantillonnage.*
- [2] ISO 13366-2:1997, *Lait — Dénombrement des cellules somatiques — Partie 2: Méthode au compteur électronique de particules.*
- [3] ISO 13366-3:1997, *Lait — Dénombrement des cellules somatiques — Partie 3: Méthode fluoro-opto-électronique.*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 13366-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7a2bb350-2601-41b1-a928-4c21d6ce5023/iso-13366-1-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7a2bb350-2601-41b1-a928-4c21d6ce5023/iso-13366-1-1997>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 13366-1:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7a2bb350-2601-41b1-a928-4c21d6ce5023/iso-13366-1-1997>