
**Lait — Dénombrement des cellules
somatiques —**

**Partie 2:
Méthode au compteur électronique de
particules**

iTeh STANDARD PREVIEW
Milk — Enumeration of somatic cells
Part 2: Electronic particle counter method

ISO 13366-2:1997

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/177fed0-3b23-47b7-b6b8-1056857cc648/iso-13366-2-1997>



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 13366-2 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.

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 2:

Méthode au compteur électronique de particules

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

1 Domaine d'application (standards.iteh.ai)

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, à l'aide d'un compteur électronique de particules¹⁾.

NOTE — Il convient que l'utilisateur de la présente méthode soit conscient du fait qu'en raison du principe de dénombrement (dénombrement de particules), le ou les résultat(s) ne sont pas toujours comparables à ceux obtenus par les méthodes des parties 1 et 3 de l'ISO 13366.

2 Définition

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

2.1 cellules somatiques: Cellules dénombrées par un compteur électronique de particules après qu'un seuil limite minimal a été fixé et que l'on a éliminé les particules de matière grasse couvrant la plage des dimensions des cellules somatiques.

3 Principe

Addition d'une solution de formaldéhyde (formaline) à l'échantillon à examiner afin de fixer les cellules somatiques. Dilution par un mélange électrolytique émulsifiant, puis chauffage suffisant pour décomposer les globules de

1) Le compteur Coulter, distribué par Coulter Electronics Ltd., Northwell Drive, Luton LV3 3RH, Bedfordshire, Angleterre, est un exemple d'appareil approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 13366 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif de l'appareil ainsi désigné.

matière grasse couvrant la plage des dimensions des cellules. Lecture directe du nombre de cellules somatiques en milliers par millilitre.

NOTE — Dans un compteur électronique de particules, le lait passe par une ouverture située entre des électrodes. Lorsqu'une particule passe par l'ouverture, elle déplace son propre volume de liquide très conducteur par un volume de moindre conductivité. La résistance accrue augmente la tension, provoquant une impulsion en tension proportionnelle au volume de la particule. Le nombre d'impulsions indique le nombre de particules qui passent. Seules les impulsions se situant au-dessus d'un seuil déterminé sont comptées.

4 Réactifs

AVERTISSEMENT — Le formaldéhyde est un poison. La préparation et l'application du mélange électrolytique émulsifiant doivent être effectuées sous hotte fermée.

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déionisée ou de pureté équivalente.

4.1 Mélange électrolytique émulsifiant

4.1.1 Composition

Éthanol à 95 % (V/V)	125,0 ml
Polyéthylèneglycol mono- <i>p</i> -(tétraméthyl-1,1,3,3 butyle) phényléther ¹⁾	20,0 ml
Chlorure de sodium, solution à 0,9 g/100 ml	885,0 ml

1) Par exemple, Triton X-100 concentré.

4.1.2 Préparation

Mélanger soigneusement le polyéthylèneglycol éther et l'éthanol. Ajouter la solution de chlorure de sodium. Passer le mélange sur un filtre approprié (5.6).

Effectuer les essais quotidiennement afin de déterminer le nombre de particules étrangères dans le mélange électrolytique émulsifiant. Ce mélange, le plastique et la verrerie sont jugés suffisamment propres si le nombre de particules est inférieur à 20 pour 0,1 ml de mélange électrolytique émulsifiant.

Afin d'éviter la croissance bactérienne, 10 ml de solution de formaldéhyde à 35 % (*m/m*) peuvent être ajoutés au mélange électrolytique émulsifiant (4.1).

NOTE — Un mélange électrolytique émulsifiant disponible dans le commerce peut être utilisé, par exemple le diluant Somaton²⁾.

4.2 Liquide fixatif

4.2.1 Composition

Éosine	0,02 g
Solution de formaldéhyde, à 35 % (<i>m/m</i>) ¹⁾	9,4 ml

1) La concentration en formaldéhyde de la formaline disponible dans le commerce varie entre 35 % (*m/m*) et 40% (*m/m*). Il convient d'en tenir compte lors de la préparation du liquide fixatif.

2) Somaton est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 13366 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

4.2.2 Préparation

Transvaser l'éosine et la solution de formaldéhyde dans une fiole jaugée de 100 ml et mélanger. Compléter à 100 ml avec de l'eau et mélanger à nouveau. Filtrer ou centrifuger le liquide afin d'éliminer les particules.

NOTE — L'éosine est incluse dans le liquide fixatif afin de colorer les échantillons fixés.

5 Appareillage

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

Avant utilisation, toute la verrerie doit être soigneusement nettoyée afin d'être, autant que possible, exempte de particules.

5.1 Compteur électronique de particules, comportant un tube capillaire de 100 μm de diamètre et d'un volume de dénombrement de 0,1 ml ou 0,5 ml (par exemple les compteurs de modèle Coulter F ou FN). On peut également utiliser un compteur automatique (par exemple un compteur de cellules du lait) dont le tube a une ouverture de 140 μm de diamètre et un volume de dénombrement de 0,3 ml.

AVERTISSEMENT — Lorsque le compteur est installé s'assurer qu'il n'y a pas d'interférence électromagnétique. Le tamis ainsi que le temps de comptage doivent être contrôlés en permanence.

Étalonner l'appareil avant de l'utiliser, afin de déterminer la relation entre le volume des particules à compter et le seuil au-dessus duquel les comptages sont effectués. Réaliser l'étalonnage conformément aux instructions du fabricant en utilisant une suspension de particules étalon.

Contrôler l'étalonnage à l'aide de comptages différentiels dans certains échantillons dont les comptages se situent entre 300 000 cellules par millilitre et 1 000 000 cellules par millilitre. Il faut apporter la preuve que le diamètre modal des cellules se situe entre 5,45 μm et 6,25 μm . Évaluer une valeur seuil pour l'estimation de routine, correspondant à un diamètre équivalent entre 4,7 μm et 5,0 μm , en fonction de la distribution dimensionnelle constatée. Contrôler chaque manomètre pour vérifier si les comptages en 0,1 ml sont bien égaux à 1/5 du comptage dans 0,5 ml (pour plus de détails, voir l'ISO 13366-3:1997, annexe C).

5.2 Bain d'eau, à circulation, réglable entre 20 °C et 37 °C.

5.3 Bains d'eau, à circulation, réglables à 55 °C \pm 1 °C et à 80 °C \pm 1 °C.

5.4 Incubateur, réglable à 30 °C \pm 1 °C.

5.5 Pipette, pour la préparation de la dilution au 1:100 (facultatif, voir 8.1.2).

5.6 Filtre, résistant aux solvants utilisés, de porosité inférieure ou égale à 0,5 μm .

5.7 Tubes en verre ou en matière plastique, par exemple de 100 mm de longueur et de 16 mm de diamètre, à fond rond, à bord droit et munis d'un joint approprié.

En cas d'utilisation de tubes en matière plastique, des essais doivent être réalisés pour s'assurer qu'il ne se produit pas de perte de cellules somatiques du fait de l'adhérence à la surface des tubes. Après avoir rincé les tubes, cette opération doit être répétée avec de l'eau distillée filtrée.

5.8 Pipette, délivrant 0,2 ml de liquide fixatif.

5.9 Balance analytique, capable de peser à 0,01 g près.

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 de lait cru 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 6 °C et 15 °C pendant 24 h au plus.

6.5 Immédiatement après l'échantillonnage, il convient de fixer les échantillons avec de la formaline (voir article 7). Il est recommandé que cela soit réalisé en utilisant des tubes échantillons contenant déjà la bonne quantité de liquide fixatif. Les tubes doivent être maintenus scellés afin d'empêcher l'évaporation de la formaline.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Après avoir soigneusement mélangé, prélever 10 ml de l'échantillon pour essai. Ajouter 0,2 ml de liquide fixatif (4.2) à la pipette (5.8). Bien mélanger pour fixer les cellules somatiques.

La fixation des cellules se fait normalement en ajoutant du formaldéhyde au lait dans une proportion d'environ 1:1 500, c'est-à-dire par addition de 0,2 ml de liquide fixatif à 10 ml d'échantillon pour essai. De plus fortes concentrations de formaldéhyde peuvent être utilisées [par exemple dans la proportion d'environ 1:1 500 en portant à 30,0 ml la quantité de solution de formaldéhyde à 35 % (*m/m*) dans le liquide fixatif], mais il convient de prendre des précautions particulières pour éviter d'obtenir un dénombrement faussement élevé [par exemple en chauffant les échantillons de lait dans le bain d'eau (5.3) à 55 °C pendant 50 min].

Laisser l'échantillon pour essai pendant 15 h à 18 h dans l'incubateur (5.4) à une température de 30 °C, ou pendant 22 h à 26 h à une température entre 18 °C et 25 °C.

Il convient de ne pas conserver les échantillons fixés pendant plus de 48 h à une température comprise entre 6 °C et 15 °C afin de s'assurer que la fidélité des dénombrements reste dans les limites spécifiées (pour plus de détails, voir l'ISO 13366-3:1997, annexe B).

8 Mode opératoire

8.1 Prise d'essai

8.1.1 Chauffer l'échantillon pour essai fixé et réfrigéré dans le bain d'eau (5.2) pour l'amener à une température comprise entre 20 °C et 37 °C. Après l'avoir soigneusement mélangé, transférer 0,1 ml de l'échantillon pour essai prélevé dans chacun des tubes (5.7) et diluer avec le mélange électrolytique émulsifiant (4.1) jusqu'à 10 ml.

8.1.2 Cette dilution peut être réalisée soit manuellement, soit à l'aide d'une pipette (5.5). Il convient que la variation ne dépasse pas $\pm 1,5$ %. Il convient de contrôler régulièrement l'exactitude de la dilution par pesage, en effectuant au moins 20 déterminations séparées et en utilisant un échantillon pour essai bien mélangé.

8.2 Dispersion des particules de matière grasse

Chauffer la prise d'essai (8.1) au bain d'eau (5.3) jusqu'à 80 °C pendant 10 min. Vérifier la température du bain d'eau en réalisant un essai à blanc de contrôle pour s'assurer que la prise d'essai a atteint une température correcte et y est maintenue. Veiller à ce que le bain d'eau contienne suffisamment d'eau pour que le niveau de liquide des tubes soit maintenu en dessous du niveau d'eau.

Retirer la prise d'essai du bain d'eau et la refroidir à une température comprise entre 15 °C et 25 °C.

NOTE — Une légère opalescence de la prise d'essai après le traitement à chaud est due au durcissement des micelles de caséine sous l'effet de la formaline. Ces micelles ont un diamètre inférieur à 1 μm et n'affectent pas le dénombrement.

8.3 Détermination

Dénombrer les cellules dans la prise d'essai (8.2) dans l'heure qui suit le refroidissement. Mélanger soigneusement la prise d'essai juste avant le dénombrement afin d'obtenir une répartition des cellules aussi homogène que possible. Transférer la prise d'essai dans un vase gradué. Veiller à ce qu'il n'y ait pas formation de bulles d'air et que les cellules déposées ne soient pas retenues dans les tubes.

Effectuer ensuite le dénombrement à l'aide du compteur de particules électronique (5.1). Au cours du dénombrement, l'extrémité de l'électrode dans l'ouverture du tube doit être en dessous de la surface du liquide.

Au cours du dénombrement, il convient de vérifier le contrôleur d'impulsions afin de détecter une éventuelle interférence. De plus, il convient de maintenir dans la limite des tolérances le temps de comptage de chaque prise d'essai.

9 Expression des résultats

Avec un volume de mesurage de 0,1 ml et une dilution de 0,1 ml de lait dans 10 ml de mélange électrolytique émulsifiant (4.1), le nombre de cellules somatiques est donné par une lecture directe en milliers par millilitre de lait.

Voir l'ISO 13366-3:1997, annexe C, une étude concernant l'utilisation d'échantillons étalons de dénombrement des cellules.

10 Fidélité

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

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(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.

Annexe A
(informative)

Bibliographie

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 13366-2:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/177fed0-3b23-47b7-b6b8-1056857cc648/iso-13366-2-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/177fed0-3b23-47b7-b6b8-1056857cc648/iso-13366-2-1997>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 13366-2:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/177fed0-3b23-47b7-b6b8-1056857cc648/iso-13366-2-1997>