
**Lait — Dénombrement des cellules
somatiques —**

Partie 3:
Méthode fluoro-opto-électronique

*Milk — Enumeration of somatic cells —
Part 3: Fluoro-opto-electronic method*
(standards.iteh.ai)

[ISO 13366-3:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997>



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 13366-3 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/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997>

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*

Les annexes A à D de la présente partie de l'ISO 13366 sont données 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 3: Méthode fluoro-opto-électronique

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, en utilisant des instruments de comptage fluoro-opto-électronique¹⁾. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997>

NOTE — Le dénombrement des cellules dans des échantillons sans conservateurs dans les premières 24 h suivant la traite pourrait donner des résultats peu fiables avec des instruments plus anciens (par exemple Fossomatic 90 et 215).

2 Définition

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

2.1 cellules somatiques: Cellules ayant une intensité de fluorescence moindre due à la coloration de l'ADN dans leur noyau.

3 Principe

Mélange du lait à examiner avec une solution tampon et une solution colorante. Transfert du mélange sous forme de film mince sur un disque rotatif servant de support pour microscope. Chaque cellule colorée observée au microscope produit une impulsion électrique qui est amplifiée et enregistrée

Lecture directe du nombre de cellules somatiques en milliers par millilitre.

1) L'instrument de comptage Fossomatic (250, 300 ou 360), distribué par Foss Electric, Hillerod, Danemark est un exemple d'instrument approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 13366 et n'implique pas l'approbation de l'instrument désigné par l'ISO.

4 Réactifs

AVERTISSEMENT — Le brome d'éthidium est toxique. La préparation et l'application des solutions de base et de travail 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 Solutions de base

4.1.1 Solution tampon colorante

4.1.1.1 Composition

Bromure d'éthidium	2,5 g
Citrate tripotassique	400 g
Acide citrique	14,5 g
Eau déionisée	5 litres
Polyéthylène glycol mono- <i>p</i> -(tétraméthyl-1,1,3,3 butyle) phényléther ¹⁾	50 ml
1) Par exemple Triton X-100 concentré.	

4.1.1.2 Préparation

Dissoudre le bromure d'éthidium dans 1 litre d'eau dans un récipient de 5 litres. Remuer doucement jusqu'à complète dissolution du bromure d'éthidium. Le processus peut être accéléré en chauffant à une température comprise entre 40 °C et 60 °C. Ajouter le citrate tripotassique et l'acide citrique à la solution de bromure d'éthidium. Ajouter 4 litres d'eau. Remuer doucement jusqu'à complète dissolution des matières solides. Ajouter le polyéthylène éther concentré tout en continuant à remuer. Même si la solution est conservée à l'abri de la lumière, dans un récipient hermétiquement clos et dans un endroit frais, elle ne doit pas être conservée plus de 90 jours.

4.1.2 Solution de polyéthylène glycol mono-*p*-(tétraméthyl-1,1,3,3 butyle) phényléther

4.1.2.1 Composition

Polyéthylène glycol mono- <i>p</i> -(tétraméthyl-1,1,3,3 butyle) phényléther ¹⁾	10 ml
Eau	1 litre
1) Par exemple Triton X-100, concentré.	

4.1.2.2 Préparation

Dissoudre le polyéthylène glycol éther dans 1 litre d'eau préalablement portée à 60 °C environ. Même si la solution est conservée à l'abri de la lumière, dans un récipient hermétiquement clos et dans un endroit frais, elle ne doit pas être conservée plus de 25 jours.

4.2 Solution de travail

4.2.1 Solution tampon colorante de travail

Mélanger 1 partie de la solution tampon colorante de base (4.1.1) à 9 parties d'eau. (Cela devrait suffire pour environ 2 700 échantillons.) Ne pas utiliser de solutions de travail ayant plus de 7 jours.

4.2.2 Liquide de rinçage

4.2.2.1 Composition

Polyéthylèneglycol mono- <i>p</i> -(tétraméthyl-1,1,3,3 butyle phényléther ¹)	10 ml
Ammoniaque, solution à 25 % (V/V)	25 ml
Eau	10 litres
1) Par exemple, Triton X-100 concentré.	

4.2.2.2 Préparation

Ajouter le polyéthylèneglycol éther et l'ammoniaque à l'eau.

La composition des réactifs peut varier en fonction du système de dénombrement utilisé. Suivre strictement les instructions du fabricant.

4.3 Conservateurs

L'acide borique, le dichromate de potassium, l'azide de sodium ou le bronopol peuvent être utilisés.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

5 Appareillage

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-achd-2ab76fda7de/iso-13366-3-1997>

5.1 Instrument de comptage, fonctionnant selon le principe optique de fluorescence (par exemple Fossomatic). L'étalonner conformément aux instructions du fabricant. Pour l'étalonnage, il est nécessaire d'utiliser des échantillons de lait dont les cellules ont été dénombrées selon la méthode au microscope (détails donnés dans l'ISO 13366-1).

NOTE — Des étalons de comptage de cellules sont disponibles auprès du fabricant.

5.2 Bain d'eau, à circulation, réglable entre 40 °C ± 1 °C.

5.3 Tubes pour échantillons, à joint étanche.

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 Si elle est nécessaire, la conservation doit être effectuée dès que possible après l'échantillonnage, mais dans tous les cas dans les 24 h, en ajoutant l'un des conservateurs suivants.

a) **Acide borique** (H_3BO_3): Ajouter l'acide borique à l'échantillon pour essai. La concentration finale de l'échantillon en acide borique ne doit pas dépasser 0,6 g pour 100 ml. Ces échantillons peuvent être conservés pendant une durée supplémentaire pouvant aller jusqu'à 24 h à une température comprise entre 6 °C et 12 °C.

b) **Dichromate de potassium** ($K_2Cr_2O_7$): Ajouter le dichromate de potassium à l'échantillon pour essai. La concentration finale de l'échantillon en dichromate de potassium ne doit pas dépasser 0,2 g pour 100 ml. Ces échantillons peuvent être conservés pendant une durée supplémentaire pouvant aller jusqu'à 72 h à une température comprise entre 6 °C et 12 °C. Il faut tenir compte des conditions locales en matière de déversement des effluents dans le cas d'échantillons contenant du dichromate de potassium comme conservateur.

c) **Azide de sodium**: Immédiatement après l'échantillonnage, ajouter l'azide de sodium à l'échantillon pour essai. La concentration finale de l'échantillon en azide de sodium ne doit pas dépasser 0,024 g pour 100 ml. Ces échantillons peuvent être conservés à une température comprise entre 2 °C et 6 °C. Il convient d'effectuer le dénombrement dans les 48 h après l'échantillonnage.

d) **Bronopol** (bromo-2 nitro-2 propane diol-1,3). Immédiatement après l'échantillonnage, ajouter le bronopol à l'échantillon pour essai. La concentration finale de l'échantillon en bronopol ne doit pas dépasser 0,05 g pour 100 ml (de préférence 0,02 g pour 100 ml). Il convient d'effectuer le dénombrement dans les 72 h après l'échantillonnage. Ces échantillons peuvent être conservés à une température comprise entre 2 °C et 6 °C.

NOTES

1 Un échantillon contenant déjà de l'acide borique peut être conservé jusqu'à 48 h de plus en utilisant du dichromate de potassium.

2 La durée de conservation des échantillons pour essai contenant du bronopol ajouté peut augmenter jusqu'à 5 jours sous de bonnes conditions et avec vérification de la qualité des cellules à l'aide d'un dispositif moderne. Toutefois, cela implique l'addition immédiate du conservateur et la conservation de l'échantillon dans un endroit froid avant l'essai.

[ISO 13366-3:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997>

7 Préparation de l'échantillon pour essai

7.1 Entreposer l'échantillon sans conservateur pendant au moins 24 h après la traite, à une température comprise entre 2 °C et 6 °C. Si l'examen de l'échantillon sans conservateur doit toutefois être effectué dans les 24 h suivant la traite, l'échantillon pour essai doit être prétraité en ajoutant du dichromate de potassium (6.4) et laisser reposer pendant au moins 3 h.

7.2 Chauffer l'échantillon contenant des conservateurs et l'échantillon sans conservateur dans un bain d'eau (5.2) réglé à 40 °C et les laisser à température ambiante pendant 30 min au plus.

8 Mode opératoire

8.1 Prise d'essai

Une nouvelle dilution de l'échantillon pour essai et la préparation de la prise d'essai sont réalisées automatiquement dans l'instrument de comptage (5.1)

8.2 Détermination

S'assurer que le dénombrement des cellules est effectué dans les 30 min qui suivent la fin du chauffage (7.2) et avant que la température tombe au-dessous de 30 °C. S'assurer que l'agitateur de l'instrument fonctionne correctement de manière à obtenir une répartition des cellules aussi homogène que possible. Si l'on ne dispose pas d'un agitateur, mélanger soigneusement les prises d'essai avant le dénombrement.

9 Expression des résultats

Exprimer le nombre de cellules somatiques en milliers par millilitre de lait.

NOTE — Voir en annexe C une étude concernant l'utilisation d'échantillons étalons de dénombrement des cellules.

10 Fidélité

Les détails de l'essai interlaboratoire relatif à la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe A. Les valeurs provenant de l'essai interlaboratoire ne peuvent être appliquées aux plages de concentrations et aux matrices autres que celles données.

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.

[ISO 13366-3:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997>

Annexe A (informative)

Résultats de l'essai interlaboratoire

Un essai interlaboratoire auquel ont participé 37 laboratoires a donné les résultats donnés au tableau A.1 pour r (limite de répétabilité) et R (limite de reproductibilité) (en milliers de cellules par millilitre).

Tableau A.1

Échantillon de lait	Nombre moyen de cellules par millilitre	s_r	r	s_R	R
2	210	13,7	38,9	36,7	103,7
4	438	21,2	59,9	51,3	145,0
6	609	32,6	92,3	89,4	253,0

Il convient de noter que, dans la pratique, on utilise la moyenne géométrique de plusieurs déterminations (par exemple trois).

NOTE — Pour les objectifs de fidélité, voir l'annexe B.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 13366-3:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab76fdda7de/iso-13366-3-1997>

Annexe B (informative)

Contrôle de la qualité au laboratoire

B.1 Objectif

Les procédures de contrôle de la qualité ont pour but de s'assurer de la concordance des dénombrements de cellules déterminés lors des opérations de routine et du «vrai» dénombrement des cellules des échantillons. Une faible concordance peut être due à des erreurs aléatoires des déterminations individuelles (telles que celles provoquées par un mélange insuffisant ou un prélèvement à la pipette manquant de précision) ou elle peut également être due à des erreurs systématiques ou à des biais (comme ceux introduits par un étalonnage incorrect des instruments). L'importance de ces deux types d'erreurs peut varier en fonction du dénombrement vrai des cellules de l'échantillon. La figure B.1 illustre les effets des erreurs aléatoires et des erreurs systématiques sur la relation entre les dénombrements vrais et ceux observés.

La répétabilité est une mesure de la variation entre plusieurs déterminations répétées réalisées au sein d'un seul laboratoire sur le même échantillon. La reproductibilité est une mesure de la variation entre des déterminations effectuées dans des laboratoires différents sur le même échantillon. Ni la répétabilité ni la reproductibilité, définies dans l'ISO 5725-1[2] ne vise à mesurer les biais lors des mesurages concernant les valeurs «vraies». Les procédures recommandées dans la présente annexe ont pour but de faire les deux, en combinant les contrôles de routine dans les laboratoires et les essais interlaboratoires périodiques destinés à évaluer les performances relatives des différents laboratoires.

(standards.iteh.ai)

ISO 13366-3:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e86a0791-0404-4c93-acbd-2ab70kda/iso-13366-3-1997>

B.2 Surveillance de routine dans les laboratoires

B.2.1 Répétabilité

Pour la surveillance de routine de la répétabilité des dénombrements, il convient de compter tout échantillon comportant environ 500 000 cellules par millilitre, à intervalles réguliers (par exemple tous les 20^e ou 50^e échantillon) tout au long de la journée de travail. À la fin de la journée, il convient de calculer le coefficient de variation des dénombrements. S'il est supérieur à 5 %, il convient de vérifier la méthodologie utilisée par le laboratoire et de vérifier en particulier si l'on prend suffisamment de précautions lorsqu'on réalise le mélange et le prélèvement à la pipette.

B.2.2 Biais

Afin d'évaluer les biais de dénombrement se produisant dans un laboratoire, il faut disposer d'échantillons étalons ayant des comptages «vrais» connus. Il serait possible d'utiliser des échantillons de lait dont le nombre de cellules a été estimé par dénombrement au microscope, mais les échantillons de lait normal ne se garderaient que quelques jours et il serait coûteux de faire aussi souvent des comptages précis pour des échantillons frais. Une autre solution serait d'utiliser des suspensions de leucocytes étalons ou des échantillons de lait contenant des conservateurs appropriés pour garantir une durée de conservation d'au moins 1 mois.

Il convient de préparer deux étalons contenant respectivement environ 300 000 cellules par millilitre et 600 000 cellules par millilitre et de déterminer au microscope ou par analyse électronique le dénombrement «vrai» pour chaque échantillon et ce, dans au moins trois laboratoires différents. Il convient que chaque laboratoire compte les étalons cinq fois au début de chaque série d'analyses et, si le dénombrement moyen de chaque étalon diffère de plus de 5 % à 10 % de son dénombrement «vrai», il convient de vérifier l'étalonnage de l'instrument ou de rechercher toute autre cause possible d'erreurs systématiques.

B.2.3 Prescriptions supplémentaires

Il convient de réaliser les procédures suivantes en plus de B.2.1 et B.2.2:

- étalonnage de l'instrument par rapport à son inclinaison;
- inspection visuelle des instruments;
- contrôle de la remise à zéro; et
- détermination du coefficient d'entraînement.

B.3 Essais interlaboratoires

B.3.1 Objectif

Les essais interlaboratoires ont pour but d'obtenir des estimations de la répétabilité et de la reproductibilité des dénombrements pour les mêmes échantillons de lait dans des laboratoires différents et de mesurer les biais dans chaque dénombrement de laboratoire par rapport à la meilleure estimation disponible du dénombrement «vrai» de chaque échantillon. Outre des mesurages absolus de la fiabilité des dénombrements individuels, les résultats de ces essais montrent aux laboratoires inexpérimentés les niveaux de répétabilité et de biais atteints dans les laboratoires expérimentés.

B.3.2 Conception

Il convient que le laboratoire organisateur prépare dix lots de lait contenant des nombres de cellules également répartis dans la plage allant de 200 000 cellules par millilitre à 800 000 cellules par millilitre.

Il convient de répartir quatre échantillons de 15 ml de chaque lait dans chaque laboratoire participant, et de les coder de manière à ce que seuls les coordinateurs des essais connaissent l'identité des 40 échantillons.

Il convient que chaque laboratoire dénombre quatre fois chacun des échantillons et rapporte les dénombrements individuels aux coordinateurs des essais.

B.3.3 Analyses statistiques

B.3.3.1 Dans une description facultative des essais, on utilise les valeurs linéaires des dénombrements de cellules. Des analyses statistiques peuvent également être effectuées en utilisant leurs logarithmes ou les valeurs de leurs racines carrées. Le biais définit la différence entre la moyenne observée et la moyenne de référence.

B.3.3.2 Il convient de calculer les moyennes des laboratoires ainsi que la moyenne globale pour chacun des 10 laits.

B.3.3.3 Il convient d'effectuer l'analyse suivante de la variance pour chacun des 10 laits dans chaque laboratoire:

Source de variation	ν	M
Échantillon du même lait	3	$s^2 + 4s_s^2$
Dénombrements répétés	12	s^2

où

- ν est le nombre de degrés de liberté;
- M est la moyenne des carrés;
- s est l'écart-type des dénombrements répétés;
- s_s est l'écart-type des échantillons du même lait.

La limite de répétabilité, r , est calculée de la manière suivante à partir de la moyenne des carrés observée:

$$r = 2,8 \left(s^2 + s_s^2 \right)^{1/2}$$

Il convient de classer les laboratoires selon la valeur de répétabilité r maximale pour tout échantillon. Il convient d'identifier les laboratoires qui ont le plus de valeurs de répétabilité r maximales et dont le nombre ne dépasse pas 15 % du nombre total. Le coefficient d'exclusion arbitraire de 15 % garantit que les moyennes de référence de petits essais reposent sur au moins cinq laboratoires, après exclusion de la répétabilité et des biais.

B.3.3.4 Pour chaque laboratoire, calculer la régression de ses moyennes d'échantillons sur la moyenne globale des échantillons. À partir de la droite de régression, calculer le biais maximal pour chaque laboratoire dans la plage des données observées.

Classer les laboratoires selon le biais maximal. Identifier les laboratoires ayant le plus de biais maximaux et dont le nombre ne dépasse pas 15 % du nombre total.

B.3.3.5 Calculer les moyennes de référence pour chaque lait, en excluant les laboratoires identifiés aux étapes B.3.3.3 et B.3.3.4 comme ayant les plus faibles répétabilités et le plus de biais.

B.3.3.6 Pour chaque laboratoire, calculer une nouvelle régression des moyennes des échantillons sur les moyennes de référence.

B.3.4 Présentation

B.3.4.1 Il convient de présenter les moyennes des laboratoires pour chaque lait sous forme de tableau et de faire apparaître la moyenne globale et la moyenne de référence pour chaque échantillon de lait au bas du tableau.

B.3.4.2 Pour chaque laboratoire, il convient de donner un seul écart-type de répétabilité globalisé pour tous les échantillons et de classer les laboratoires en fonction de ce paramètre.

B.3.4.3 Il convient d'indiquer l'ordonnée à l'origine et la pente de la régression des moyennes de chaque laboratoire sur la moyenne de référence. Il convient également de donner le biais maximal dans la plage des moyennes observées et de classer les laboratoires en fonction de ce paramètre.

B.3.4.4 Il convient que chaque laboratoire reçoive un graphique sur lequel figurent ses propres dénombrements individuels en fonction de la moyenne de référence et d'y représenter la droite à 45° et la droite de régression du laboratoire.

B.3.4.5 Le calcul de la limite de reproductibilité (R) ou de s est souhaitable.

B.3.5 Comparaisons entre les essais

Il convient de surveiller les répartitions de la répétabilité et des biais d'un essai à l'autre. À partir des répétabilités et des biais de chaque essai réunis, il convient d'établir un histogramme et d'identifier la position du laboratoire dans la répartition. Il y a lieu d'identifier les laboratoires ayant des responsabilités nationales pour pouvoir déterminer leurs performances absolues lors des essais successifs et leur performances relatives par rapport aux autres laboratoires ayant participé à un essai.

B.3.6 Objectifs de fidélité

L'analyse d'essais comparatifs internationaux et nationaux a mis en évidence que les chiffres suivants peuvent être considérés comme des objectifs raisonnables.