
**Lait — Dénombrement des cellules
somatiques —**

Partie 1:

**Méthode au microscope (Méthode de
référence)**

iTeh STANDARD PREVIEW
Milk — Enumeration of somatic cells —
Part 1: Microscopic method (Reference method)
(standards.iteh.ai)

ISO 13366-1:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e5b0ab6e-4361-406c-ac24-ab0c75e80013/iso-13366-1-2008>



Numéros de référence
ISO 13366-1:2008(F)
FIL 148-1:2008(F)

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO et la FIL déclinent toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO et les comités nationaux de la FIL. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central de l'ISO à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 13366-1:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e5b0ab6e-4361-406c-ac24-ab0c75e80013/iso-13366-1-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e5b0ab6e-4361-406c-ac24-ab0c75e80013/iso-13366-1-2008>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2008

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 soit de l'ISO soit de la FIL, à l'une ou l'autre des adresses ci-après.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Fédération Internationale de Laiterie
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Bruxelles
Tel. + 32 2 733 98 88
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail info@fil-idf.org
Web www.fil-idf.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Avant-propos.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Termes et définitions	1
3 Principe	1
4 Réactifs	1
4.1 Solutions colorantes	2
4.2 Solution tampon de phosphate (PBS)	3
5 Appareillage	4
6 Échantillonnage	4
7 Préparation des échantillons à analyser	4
7.1 Stockage	4
7.2 Préparation	5
8 Mode opératoire	5
8.1 Préparation du film et de la coloration	5
8.2 Détermination	6
9 Calcul et expression des résultats	10
9.1 Comptage par champs successifs des formes rectangulaires	10
9.2 Comptage par bandes des formes rectangulaires	11
9.3 Comptage par champs successifs des formes circulaires	11
9.4 Expression des résultats	12
10 Fidélité	12
10.1 Répétabilité	12
10.2 Reproductibilité	13
11 Rapport d'essai	13
Annexe A (informative) Essai interlaboratoires	14
Annexe B (informative) Coloration pour lait de chèvre	15
Annexe C (informative) Loi de Poisson	16
Bibliographie	17

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 13366-1|FIL 148-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers* et par la Fédération internationale de laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette deuxième édition de l'ISO 13366-1|FIL 148-1 annule et remplace la première édition (l'ISO 13366-1:1997), qui a fait l'objet d'une révision technique.

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

- *Partie 1: Méthode au microscope (Méthode de référence)*
- *Partie 2: Lignes directrices pour la mise en œuvre des compteurs fluoro-opto-électroniques*

Avant-propos

La **FIL (Fédération Internationale de Laiterie)** est une organisation sans but lucratif représentant le secteur laitier mondial. Les membres de la FIL se composent des Comités Nationaux dans chaque pays membre et des associations laitières régionales avec lesquelles la FIL a signé des accords de coopération. Tout membre de la FIL a le droit de faire partie des Comités permanents de la FIL auxquels sont confiés les travaux techniques. La FIL collabore avec l'ISO pour l'élaboration de méthodes normalisées d'analyse et d'échantillonnage pour le lait et les produits laitiers.

Les projets de Normes internationales adoptés par les Équipes d'Action et les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux de la FIL votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 13366-1|FIL 148-1 a été élaborée par par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Elle est publiée conjointement par la FIL et l'ISO.

Tous les travaux ont été effectués par le groupe de travail conjoint ISO-FIL *Méthodes automatisées* du Comité plénier *Assurance qualité, statistiques des données analytiques et échantillonnage*, sous l'égide de ses chefs de projet, Madame S. Orlandini (Italie) et Monsieur H.J.C.M. van den Bijgaart (Pays-Bas).

Cette édition de l'ISO 13366-1|FIL 148-1 annule et remplace la FIL 148A:1995.

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

- *Partie 1: Méthode au microscope (Méthode de référence)*
- *Partie 2: Lignes directrices pour la mise en œuvre des compteurs fluoro-opto-électroniques*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 13366-1:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e5b0ab6e-4361-406c-ac24-ab0c75e80013/iso-13366-1-2008>

Lait — Dénombrement des cellules somatiques —

Partie 1: Méthode au microscope (Méthode de référence)

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 13366|FIL 148 spécifie une méthode de comptage au microscope (méthode de référence) des cellules somatiques dans le lait cru et dans le lait additionné de conservateurs chimiques.

La présente partie de l'ISO 13366|FIL 148 est applicable au comptage des cellules somatiques dans le lait de vache sous réserve que les conditions préalables éventuellement mentionnées soient satisfaites.

La présente méthode convient pour la préparation d'échantillons étalons et la détermination de valeurs de référence nécessaires pour l'étalonnage des méthodes de comptage de cellules mécanisées et automatisées.

AVERTISSEMENT — L'utilisation de la présente norme peut impliquer l'utilisation de produits et la mise en œuvre de modes opératoires et d'appareillages à caractère dangereux. La présente norme n'a pas pour but d'aborder tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente norme d'établir, avant de l'utiliser, des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e5b0ab6e-4361-406c-ac24-ab0c75e80013/iso-13366-1-2008>

2 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

2.1

cellules somatiques

cellules à noyau, c'est-à-dire ensemble des leucocytes et cellules épithéliales, déterminées selon le mode opératoire décrit dans la présente partie de l'ISO 13366|FIL 148

3 Principe

Une prise d'essai du lait à examiner est étalée sur une lame de microscope sous la forme d'un film. Le film est séché pendant que les cellules sont colorées. Les cellules colorées sont ensuite comptées au microscope. Le nombre de cellules comptées sur une surface définie est multiplié par un facteur de travail; on obtient ainsi le nombre de cellules par millilitre.

4 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, sauf spécification contraire, et de l'eau distillée ou déminéralisée ou bien de l'eau de pureté équivalente.

4.1 Solutions colorantes

AVERTISSEMENT — Le tétrachloréthane est toxique. Le bromure d'éthidium est mutagène. En cas de renversement accidentel, il convient de mener les actions appropriées en vue de la désactivation. La préparation et l'application de la solution colorante doivent être réalisées dans une hotte fermée en utilisant un équipement de protection.

4.1.1 Solution colorante Newman-Lampert modifiée (modification Levowitz-Weber)

4.1.1.1 Composants

Éthanol, 95 % (fraction volumique)	54,0 ml
Tétrachloréthane ^a	40,0 ml
Bleu de méthylène	0,6 g
Acide acétique, glacial	6,0 ml

^a Le xylène peut remplacer le tétrachloréthane (même volume que celui mentionné pour ce dernier).

4.1.1.2 Préparation

Mélanger l'éthanol et le tétrachloréthane, et boucher le flacon. Chauffer le mélange dans un bain-marie (5.1) réglé à 65 °C. Ajouter le bleu de méthylène sous une hotte et mélanger soigneusement. Refroidir le mélange dans un réfrigérateur à 4 °C.

Puis ajouter l'acide acétique glacial et mélanger à nouveau soigneusement. Faire passer la solution obtenue au travers d'un filtre approprié (5.2) dans un flacon étanche à l'air et la stocker telle quelle.

Filter la solution colorante Newman-Lampert à nouveau avant utilisation.

4.1.2 Solution colorante au bromure d'éthidium

4.1.2.1 Solution mère colorante

4.1.2.1.1 Composition

Bromure d'éthidium	0,25 g
Eau déminéralisée	100 ml

4.1.2.1.2 Préparation

Dissoudre le bromure d'éthidium dans de l'eau déminéralisée chauffée au préalable à 40 °C. Refroidir la solution à température ambiante. Compléter à 100 ml avec de l'eau déminéralisée.

La solution mère colorante de bromure d'éthidium peut être conservée pendant deux mois au maximum lorsqu'elle est stockée à l'abri de la lumière à une température de 2 °C ± 2 °C.

4.1.2.2 Solution tampon

4.1.2.2.1 Composition

Hydrogénophthalate de potassium	0,51 g
Potasse caustique	0,162 g
Eau déminéralisée	100 ml

4.1.2.2.2 Préparation

Dissoudre séparément l'hydrogénophthalate de potassium et la potasse caustique dans l'eau déminéralisée.

La solution tampon peut être conservée pendant deux mois au maximum lorsqu'elle est stockée à l'abri de la lumière à une température de $2\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

4.1.2.3 Solution colorante de travail au bromure d'éthidium

4.1.2.3.1 Composants

Solution mère colorante (bromure d'éthidium) ^a (4.1.2.1)	2 ml
Solution tampon (4.1.2.2)	8 ml
Triton X-100	0,1 ml
Eau déminéralisée	90 ml

^a Une température élevée peut réduire le pouvoir colorant du bromure d'éthidium.

ISO 13366-1:2008

4.1.2.3.2 Préparation

Ajouter successivement la solution mère colorante (bromure d'éthidium), la solution tampon et le Triton X-100 dans l'eau déminéralisée et mélanger soigneusement.

Préparer la solution colorante de travail (bromure d'éthidium) extemporanément.

4.2 Solution tampon de phosphate (PBS)

4.2.1 Composants

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Eau déminéralisée	1 000 ml

4.2.2 Préparation

Dissoudre les sels dans une quantité d'eau déminéralisée. Compléter à 1 000 ml avec le reste d'eau déminéralisée.

Ajuster le pH à $7,2 \pm 0,1$.

NOTE Il est également possible d'utiliser une solution tampon de phosphate de pH = 7,2 vendue dans le commerce.

5 Appareillage

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

5.1 Bains-marie, capables de maintenir une température de $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, $50\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

5.2 Filtre, résistant aux solvants utilisés, de porosité comprise entre $10\text{ }\mu\text{m}$ et $12\text{ }\mu\text{m}$.

5.3 Microscope, grossissement entre $\times 500$ et $\times 1\,000$. Des objectifs pour immersion dans l'huile peuvent être utilisés.

Lors de l'utilisation de bromure d'éthidium, le microscope doit comporter un équipement à fluorescence.

5.4 Microseringue, permettant de distribuer un volume fixe de 0,01 ml de lait, avec une tolérance maximale de 2 %.

5.5 Micromètre, devant être certifié.

5.6 Lames, prémarquées, ayant une zone d'étalement de forme rectangulaire ou circulaire d'une surface égale à $1\text{ cm}^2 \pm 5\%$ (95 mm^2 à 105 mm^2), ou lame standard avec un gabarit de dimensions $20\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ ou ayant un diamètre, d , de 11,28 mm.

5.6.1 Choix des lames

Il est préférable de travailler avec une surface prémarquée fixe ou un gabarit afin d'éviter de recalculer le facteur de travail pour chaque comptage.

5.6.2 Formes

Dans le cas d'une forme rectangulaire, il convient que les largeurs intérieures (supérieure et inférieure), d'une part, et les hauteurs intérieures (gauche et droite), d'autre part, ne diffèrent pas de plus de 0,2 mm.

Dans le cas d'une forme circulaire, il convient que les diamètres intérieurs (vertical et horizontal) ne diffèrent pas de plus de 0,2 mm.

6 Échantillonnage

Il convient qu'un échantillon représentatif ait été envoyé au laboratoire et qu'il n'ait été ni endommagé ni modifié au cours du transport ou du stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode indiquée dans la présente partie de l'ISO 13366|FIL 148. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707|FIL 50.

Si des échantillonneurs automatiques sont utilisés, ils doivent avoir fait l'objet d'une validation appropriée.

7 Préparation des échantillons à analyser

7.1 Stockage

Avant l'analyse ou la conservation, stocker les échantillons à une température de $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

Analyser les échantillons dans les 6 h suivant le prélèvement. En cas de stockage prolongé, ajouter des agents de conservation chimiques, par exemple de l'acide borique, du bronopol ou du bichromate de potassium. La concentration finale d'acide borique ne doit pas dépasser 0,6 g par 100 ml d'échantillon. La concentration finale de bronopol ne doit pas être supérieure à 0,05 g par 100 ml d'échantillon. La

concentration finale de bichromate de potassium ne doit pas dépasser 0,1 g par 100 ml d'échantillon. Stocker les échantillons ainsi conservés à une température de $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant une durée ne dépassant pas 6 jours.

Pour des raisons de respect de l'environnement, il est recommandé de limiter l'usage du bichromate de potassium aux échantillons devant avoir une durée de conservation importante.

7.2 Préparation

Chauffer l'échantillon à analyser (voir 7.1) dans un bain-marie (5.1) réglé à 40 °C . Mélanger soigneusement l'échantillon pour essai. Refroidir l'échantillon à la température à laquelle la microseringue (5.4) a été étalonnée, par exemple à 20 °C .

Diluer les échantillons dans lesquels le nombre estimé de cellules somatiques est supérieur à 1 000 000 cellules/ml avec une solution tampon de phosphate (4.2) afin d'obtenir un nombre de cellules somatiques d'environ 500 000 cellules/ml pour chaque échantillon pour essai dilué.

$$d = \frac{V_s}{V_s \times V_b}$$

où

d est le facteur de dilution permettant d'obtenir un nombre de cellules somatiques d'environ 500 000 cellules/ml dans l'échantillon;

V_s est le volume, en millilitres, de l'échantillon pour essai;

V_b est le volume, en millilitres, de la solution tampon utilisée pour diluer l'échantillon.

Noter le facteur de dilution requis, d , le volume de l'échantillon, V_s , et le volume de la solution tampon, V_b , utilisée pour obtenir la dilution requise.

8 Mode opératoire

Préparer pour chaque échantillon au moins deux films et compter le meilleur (par exemple un film non endommagé par la coloration). Tremper les lames (5.6) dans de l'éthanol (fraction volumique 95 %). Flamber et laisser refroidir.

8.1 Préparation du film et de la coloration

Pour la préparation du film et de la coloration, procéder selon 8.1.1 ou 8.1.2.

NOTE La coloration pour le lait de chèvre est décrite dans l'Annexe B.

8.1.1 Préparation du film et de la coloration avec la solution colorante Newman-Lampert

À l'aide de la microseringue (5.4), prélever 0,01 ml de l'échantillon (éventuellement dilué) (voir 7.2). Rincer la microseringue avec l'échantillon. Si nécessaire, nettoyer soigneusement et doucement l'extérieur de la microseringue qui a été en contact avec l'échantillon.

Placer le mélange sur une lame propre de surface 1 cm^2 (5.6). Au moyen de l'aiguille, étaler l'échantillon de manière homogène sur toute la surface définie, tout en s'assurant que la zone proche du périmètre soit uniformément recouverte. Sécher le film à température ambiante jusqu'à séchage complet.