

NORME
INTERNATIONALE

ISO
13366-2

FIL
148-2

Deuxième édition
2006-10-01

**Lait — Dénombrement des cellules
somatiques —**

Partie 2:

**Lignes directrices pour la mise en œuvre
des compteurs fluoro-opto-électroniques**

iTeh STANDARD PREVIEW
Milk — Enumeration of somatic cells —
(standards.iteh.ai)
Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters

[ISO 13366-2:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b038be5-662a-4ce0-982a-bed3417c3d08/iso-13366-2-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b038be5-662a-4ce0-982a-bed3417c3d08/iso-13366-2-2006>



Numéros de référence
ISO 13366-2:2006(F)
FIL 148-2:2006(F)

© ISO et FIL 2006

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 13366-2:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b038be5-662a-4ce0-982a-bed3417c3d08/iso-13366-2-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b038be5-662a-4ce0-982a-bed3417c3d08/iso-13366-2-2006>

© ISO et FIL 2006

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'adresse respective 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 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Facteurs ayant une incidence sur les résultats des mesurages	2
5.1 Flacons à échantillons	2
5.2 Échantillonnage	2
5.3 Conservation	3
5.4 Conservation et transport des échantillons	4
5.5 Substances interférentes	4
5.6 Qualité de l'échantillon lors de l'analyse	4
5.7 Produits chimiques utilisés	4
5.8 État des instruments	5
5.9 Facteur de travail	5
5.10 Volumes d'essai	5
6 Étalonnage	5
6.1 Matériaux de référence	5
6.2 Mode opératoire de l'étalonnage	7
7 Échantillonnage	8
8 Détermination	9
9 Contrôles de fonctionnement en routine	9
9.1 Contrôles du blanc	9
9.2 Contamination d'un échantillon sur l'autre	9
9.3 Rapport de volume entre réactifs et échantillon	10
9.4 Contrôles pilotes	10
9.5 Surveillance supplémentaire de l'instrument	10
9.6 Répétabilité	10
9.7 Reproductibilité intralaboratoire	11
9.8 Comparaisons externes	11
10 Remarques spécifiques pour l'utilisation de lait d'espèces différentes	11
10.1 Généralités	11
10.2 Lait de vache	12
10.3 Lait de chèvre	12
10.4 Lait de brebis	12
10.5 Lait de bufflesse	12
11 Fidélité	12
11.1 Répétabilité	12
11.2 Reproductibilité intralaboratoire	13
11.3 Reproductibilité	13
12 Rapport d'essai	14
Bibliographie	15

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 13366-2|FIL 148-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette édition de l'ISO 13366-2|FIL 148-2 annule et remplace l'ISO 13366-2:1997 et l'ISO 13366-3:1997, qui ont 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 fédération mondiale du secteur laitier avec un Comité National dans chacun de ses pays membres. Chaque Comité National 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 13366-2|FIL 148-2 a été élaborée 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.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO-FIL, *Méthodes automatisées*, du Comité permanent chargé de l'*Assurance de la qualité, des statistiques des résultats d'analyse et de l'échantillonnage*, sous la conduite de ses chefs de projet, Madame S. Orlandini (IT) et Monsieur H.J.C.M. van den Bijgaart (NL).

Cette édition de l'ISO 13366-2|FIL 148-2 annule et remplace la FIL 148A:1995, dont les méthodes B et C ont fait l'objet d'une révision technique.

[ISO 13366-2:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b038be5-663a-4ce0-9821-bed3417c3d08/iso-13366-2-2006)

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 13366-2:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b038be5-662a-4ce0-982a-bed3417c3d08/iso-13366-2-2006>

Lait — Dénombrement des cellules somatiques —

Partie 2:

Lignes directrices pour la mise en œuvre des compteurs fluoro-opto-électroniques

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 13366|FIL 148 indique des lignes directrices concernant les conditions opératoires pour le dénombrement des cellules somatiques dans le lait cru et le lait contenant des conservateurs chimiques, à l'aide de compteurs fluoro-opto-électroniques utilisant soit une méthode sur disque rotatif, soit la cytométrie en flux pour la partie comptage.

Les présentes lignes directrices s'appliquent au dénombrement des cellules somatiques dans le lait cru de vache. Elles s'appliquent également au dénombrement dans le lait cru d'animaux d'autres espèces, telles que la chèvre, la brebis et la bufflesse, si les conditions préalables spécifiées sont remplies.

(standards.iteh.ai)

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 8196-1|FIL 128-1, *Lait — Définition et évaluation de la précision globale de méthodes indirectes d'analyse du lait — Partie 1: Attributs d'analyse de méthodes indirectes*

ISO 8196-2|FIL 128-2, *Lait — Définition et évaluation de la précision globale de méthodes indirectes d'analyse du lait — Partie 2: Étalonnage et contrôle de la qualité dans les laboratoires laitiers*

ISO 13366-1|FIL 148-1, *Lait — Dénombrement des cellules somatiques — Partie 1: Méthode au microscope (Méthode de référence)*

ISO Guide 34, *Exigences générales pour la compétence des producteurs de matériaux de référence*

ISO Guide 43-1, *Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison — Partie 1: Développement et mise en œuvre de systèmes d'essais d'aptitude*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 8196-1|FIL 128-1, l'ISO 8196-2|FIL 128-2 ainsi que les suivants s'appliquent.

3.1

méthode de référence

méthode décrite dans l'ISO 13366-1|FIL 148-1 pour le dénombrement des cellules somatiques

3.2 cellules somatiques

cellules dont l'intensité de fluorescence résultant de la coloration de l'ADN de leurs noyaux est supérieure à un certain seuil

NOTE Le nombre de cellules somatiques est exprimé en cellules par millilitre.

4 Principe

Les compteurs fluoro-opto-électroniques comportent des fonctions dédiées à l'alimentation en réactifs et à la prise d'échantillon pour essai, une partie mélange et une partie comptage. Dans la partie mélange, l'échantillon est mélangé à une solution tampon et une solution colorante. Une partie du mélange ainsi obtenu est transférée dans la partie comptage et placée sur un support. Chaque particule colorée observée au microscope à fluorescence produit une impulsion électrique qui est filtrée, amplifiée et enregistrée. La distribution des intensités des impulsions ainsi obtenue est traitée électroniquement, ce qui permet de différencier les signaux résultant du bruit de fond et les impulsions qui sont attribuées aux cellules somatiques colorées. Le niveau de discrimination peut être fixe ou dynamique.

Dans la partie mélange sont dosés et mélangés des volumes bien maîtrisés d'échantillon et de solutions tampon/colorante. Le mélange peut être effectué dans une coupelle, une chambre de mélange, une centrifugeuse, une boucle d'échantillonnage ou dans le tuyau menant à une cellule à circulation.

Dans la partie comptage, il est possible d'appliquer soit la cytométrie sur disque, soit la cytométrie en flux. Dans le cas de la cytométrie sur disque, le mélange est transféré sous forme d'un film mince, via une buse, sur le sommet d'un disque rotatif vertical, cette surface rotative servant de support mobile à un microscope à fluorescence. Dans le cas de la cytométrie en flux, une partie du mélange est injectée au centre d'un liquide de gainage à écoulement rapide à l'intérieur d'une cellule à circulation capillaire. Sous l'effet de l'accélération, le mélange forme une mince veine liquide au centre de laquelle les cellules somatiques sont alignées et espacées de façon dynamique. La veine croise ensuite l'objectif d'un microscope à fluorescence.

Certains instruments sont munis de deux canaux à l'intérieur de la partie comptage. Dans ce cas, en termes d'assurance qualité des analyses, il convient de considérer que cela revient à travailler avec deux unités indépendantes et dès lors d'évaluer séparément le fonctionnement de chacun des canaux.

5 Facteurs ayant une incidence sur les résultats des mesurages

5.1 Flacons à échantillons

Il convient d'utiliser des flacons à échantillons appropriés à la présente méthode, c'est-à-dire adaptés au transfert des échantillons d'analyse du point de prélèvement vers le laboratoire, sans perte ni dommage.

On veillera à ce que les flacons à échantillons soient étanches et que le volume vide restant soit approprié; un volume vide trop important est susceptible de faciliter le barattage, tandis qu'un volume vide trop petit peut poser des problèmes de mélange.

5.2 Échantillonnage

5.2.1 Généralités

Il convient que les instruments d'échantillonnage, c'est-à-dire les flacons à échantillons, les béciers et les instruments de prélèvement soient propres et secs. Si des préleveurs automatiques sont utilisés, il convient qu'ils aient fait l'objet d'une validation appropriée.

Il convient de refroidir les échantillons pour essai de préférence immédiatement après le prélèvement, à une température comprise entre 0 °C et 6 °C, et de les stocker à cette température jusqu'au dénombrement (voir 5.4), plutôt que de les conserver. Il convient d'éviter la congélation. Si malgré tout il est nécessaire de conserver les échantillons pour essai, des moyens de conservation chimique appropriés sont décrits en 5.3.

5.2.2 Échantillons de lait de grand mélange

Il est essentiel de mélanger correctement le lait de grand mélange à échantillonner car, si le lait n'est pas suffisamment remué, les cellules somatiques se concentrent dans les couches supérieures et inférieures.

5.2.3 Échantillons de lait d'animaux individuels

La libération des cellules somatiques dans le lait pendant la traite est inégale. Par conséquent, si l'on cherche à réaliser un dénombrement représentatif de toute une traite, il est essentiel d'obtenir un échantillon qui soit véritablement représentatif de toute la traite. Si en revanche l'objectif est d'établir un diagnostic, un échantillon d'une partie seulement de la traite peut suffire.

5.3 Conservation

Si la conservation chimique est jugée nécessaire, il convient que l'échantillon pour essai (5.2.1) soit additionné d'un conservateur dès que possible après le prélèvement, et impérativement dans les 24 h. Dans tous les cas, il convient de maintenir au frais l'échantillon pour essai (à une température comprise entre 0 °C et 6 °C) avant l'ajout du conservateur.

Les conservateurs appropriés sont les suivants.

- a) Acide borique: il convient que sa concentration finale dans l'échantillon pour essai ne dépasse pas 0,6 g pour 100 ml. Les échantillons ainsi conservés peuvent être gardés pendant une durée supplémentaire pouvant aller jusqu'à 24 h, à une température comprise entre 6 °C et 12 °C.
- b) Azide de sodium: il convient que sa concentration finale dans l'échantillon pour essai ne dépasse pas 0,024 g pour 100 ml. Les échantillons ainsi conservés peuvent être gardés pendant une durée supplémentaire pouvant aller jusqu'à 72 h, à une température comprise entre 2 °C et 10 °C.
- c) Bronopol (bromo-2 nitro-2 propane diol-1,3): il convient que sa concentration finale dans l'échantillon pour essai ne dépasse pas 0,05 g pour 100 ml. Les échantillons ainsi conservés peuvent être gardés pendant une durée supplémentaire pouvant aller jusqu'à six jours, à une température comprise entre 2 °C et 12 °C.
- d) Dichromate de potassium: il convient que sa concentration finale dans l'échantillon pour essai ne dépasse pas 0,2 g pour 100 ml. Les échantillons ainsi conservés peuvent être gardés pendant une durée supplémentaire pouvant aller jusqu'à six jours, à une température comprise entre 2 °C et 12 °C.

Les traceurs de couleur associés considérés comme appropriés sont

- le bleu patenté V, avec une concentration finale dans l'échantillon pour essai pouvant aller jusqu'à 0,15 mg pour 100 ml,
- le jaune orange S (E110), avec une concentration finale dans l'échantillon pour essai pouvant aller jusqu'à 1 mg pour 100 ml, et
- un mélange de bleu patenté V et d'éosine B, avec une concentration finale dans l'échantillon pour essai pouvant aller respectivement jusqu'à 0,03 mg et 0,45 mg pour 100 ml.

D'autres conservateurs et traceurs de couleur peuvent être utilisés sous réserve que leur efficacité et leurs conditions d'utilisation aient été correctement validées.

Dans tous les cas, valider correctement l'absence d'interférence pour l'instrument de dénombrement concerné avant mise en application.

Dans les cas où les compteurs fluoro-opto-électroniques sont associés à des analyseurs de lait pour le mesurage d'autres composants des échantillons pour essai, il convient de veiller à ce que les conservateurs et traceurs de couleur utilisés n'influencent en aucune manière le résultat du dénombrement.

5.4 Conservation et transport des échantillons

Il convient de stocker les échantillons sans conservateur à une température comprise entre 0 °C et 6 °C et de procéder au dénombrement des cellules somatiques dans les 96 h suivant la fin de l'échantillonnage. Éviter de congeler les échantillons pour essai. La conservation à des températures supérieures et/ou pendant des périodes plus longues peut générer des résultats non représentatifs dans le dénombrement. Le mesurage des échantillons après congélation et décongélation peut engendrer des comptages inférieurs (entre 10 % et 20 %). L'âge des échantillons au moment de la congélation et le type de processus de décongélation peuvent également influencer le résultat du dénombrement.

5.5 Substances interférentes

Il convient d'éviter d'utiliser des substances qui interfèrent avec le dénombrement. Les substances connues pour avoir une influence sur la lecture des résultats des instruments sont

- a) les conservateurs et les traceurs de couleur à des concentrations supérieures aux valeurs indiquées en 5.3;
- b) le bleu de méthylène à des concentrations supérieures à 0,06 mg pour 100 ml.

5.6 Qualité de l'échantillon lors de l'analyse

La désagrégation des cellules somatiques (lyse) engendre une augmentation du nombre des fragments de cellules de plus petite taille. L'intensité inférieure de fluorescence après coloration de ces particules provoque un décalage vers la gauche de la distribution des intensités d'impulsion. La différenciation appropriée des impulsions du bruit de fond en est entravée, ce qui conduit à des résultats de comptages plus faibles.

NOTE Plusieurs appareils présentent des fonctionnalités permettant d'évaluer la position et la forme de la distribution des intensités d'impulsion. Se reporter aux instructions et aux recommandations du fabricant pour les instruments concernés.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b038be5-662a-4ce0-982a-7ddc39220302/iso-13366-2-2006>

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b038be5-662a-4ce0-982a-7ddc39220302/iso-13366-2-2006>

Après traitement d'un échantillon problématique, il convient de contrôler et éventuellement de nettoyer l'instrument le long de la trajectoire du flux. Avant de procéder à toute nouvelle utilisation, il convient de vérifier son fonctionnement correct. Les échantillons pouvant être problématiques sont

- a) les échantillons de lait issus de mamelles gravement infectées, c'est-à-dire présentant des caillots,
- b) les échantillons de lait contenant des impuretés,
- c) les échantillons de lait comportant un grand nombre d'érythrocytes,
- d) le colostrum,
- e) le lait de fin de lactation, et
- f) le lait caillé.

Si possible, il convient d'éviter d'analyser de tels échantillons.

5.7 Produits chimiques utilisés

Il convient que tous les réactifs utilisés soient de qualité analytique et bactériologique reconnue. Il convient que l'eau utilisée soit déminéralisée (conductivité résiduelle inférieure à 10 µS par cm) ou d'une pureté au moins équivalente. Se conformer aux instructions du fabricant relatives à la préparation des solutions de travail, à la période de conservation maximale et aux exigences en matière de conservation.

Il convient de respecter les réglementations locales en vigueur en matière d'utilisation et d'évacuation des produits chimiques employés et des effluents.

5.8 État des instruments

5.8.1 Les points généraux auxquels il faut porter attention sont

- a) le fonctionnement du dispositif de mélange et de l'agitateur,
- b) les perturbations possibles à la prise d'échantillon et dans le système de circulation des fluides dues au blocage par des impuretés ou des caillots ou à l'encrassement dans les unités de mélange et d'incubation,
- c) l'état et le fonctionnement de la source lumineuse et du tube photomultiplicateur, définition du grain et qualité du signal.

5.8.2 Les points spécifiques aux compteurs cytométriques à disque auxquels il faut porter attention sont

- a) le positionnement du film sur le disque rotatif,
- b) la propreté du support et le fonctionnement de l'éponge nettoyante; le remplacement au moment opportun de l'éponge nettoyante est indispensable, et
- c) le vidage correct du récipient collectant le liquide de rinçage.

5.8.3 Un point spécifique aux compteurs cytométriques en flux auquel il faut porter attention est la variation de comportement entre la veine de l'échantillon dans la cellule à circulation et le flux du liquide de gaine. Certains fabricants d'instruments proposent des programmes spéciaux qui permettent de vérifier ces variations, en indiquant des solutions possibles en cas d'écart.

5.9 Facteur de travail

Le facteur de travail correspond au coefficient par lequel est multiplié le nombre effectif de cellules somatiques comptées par un instrument pour obtenir le dénombrement de cellules somatiques dans l'échantillon pour essai. En théorie, un facteur de travail peu élevé est avantageux pour la fidélité et l'exactitude des résultats.

5.10 Volumes d'essai

Il est indispensable de respecter un rapport approprié entre le volume de la solution tampon/colorant et le volume d'échantillon pour garantir un dénombrement correct.

6 Étalonnage

6.1 Matériaux de référence

6.1.1 Généralités

Il convient de produire des matériaux de référence dans des conditions strictement maîtrisées, c'est-à-dire en travaillant avec un système d'assurance qualité et en se conformant aux exigences indiquées dans le Guide ISO 34.

Les matériaux de référence peuvent être

- a) des matériaux de référence certifiés (MRC) tels que produits par une organisme officiel reconnu,
- b) des matériaux de référence secondaires (MRS) tels que préparés par un fournisseur externe, ou
- c) des matériaux de référence internes (MRI) tels que préparés par le laboratoire lui-même, qui permettent de conserver la traçabilité avec les MRC, les MRS ou via les essais interlaboratoires d'aptitude.