



Milch
Zählung somatischer Zellen
Teil 1: Mikroskopisches Verfahren
(ISO 13366-1:1997)

ÖNORM
EN ISO 13366-1

Milk – Enumeration of somatic cells –
 Part 1: Microscopic method
 (ISO 13366-1:1997)

Lait – Dénombrement des cellules somatiques –
 Partie 1: Méthode au microscope
 (ISO 13366-1:1997)

Normengruppe N

Ident (IDT) mit ISO 13366-1:1997 (Übersetzung)
Ident (IDT) mit EN ISO 13366-1:1997

Die Europäische Norm EN ISO 13366-1 hat den Status einer Österreichischen Norm.

Die ÖNORM EN ISO 13366-1 besteht aus – diesem nationalen Deckblatt sowie
 – der offiziellen deutschsprachigen Fassung
 der EN ISO 13366-1:1997.

Medieninhaber und Hersteller:
 Österreichisches Normungsinstitut
 1021 Wien

Hinweise auf Normen ohne Ausgabedatum beziehen sich auf die jeweils geltende Fassung.

Fortsetzung
 EN ISO 13366-1 Seiten 1 bis 7

Fachnormenausschuß
 205
 Lebensmittel-
 untersuchungsverfahren

EUROPÄISCHE NORM

EN ISO 13366-1

EUROPEAN STANDARD

NORME EUROPÉENNE

Juni 1997

ICS 07.100.30; 67.100.10

Deskriptoren: Landwirtschaftliche Erzeugnisse, Lebensmittel, Milch, Untersuchungen, mikrobiologische Untersuchungen, Zählung, Zellen (biologisch), mikroskopische Untersuchung, Referenzverfahren

Deutsche Fassung

Milch - Zählung somatischer Zellen - Teil 1: Mikroskopisches Verfahren (ISO 13366-1:1997)

Milk - Enumeration of somatic cells - Part 1:
Microscopic method (ISO 13366-1:1997)

Lait - Dénombrement des cellules somatiques -
Partie 1: Méthode au microscope
(ISO 13366-1:1997)

Diese Europäische Norm wurde von CEN am 1997-05-10 angenommen. Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist.

Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Zentralsekretariat oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Die Europäischen Normen bestehen in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in die Landessprache gemacht und dem Zentralsekretariat mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, Tschechische Republik und dem Vereinigten Königreich.

CEN

Europäisches Komitee für Normung
European Committee for Standardization
Comité Européen de Normalisation

Zentralsekretariat: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

© 1997 CEN - Alle Rechte der Verwertung, gleich in welcher Form und in welchem Verfahren, sind weltweit den nationalen Mitgliedern von CEN vorbehalten.

Ref. No. EN ISO 13366-1:1997 D

Seite 2
EN ISO 13366-1 : 1997

Vorwort

Der Text der Internationalen Norm ISO 13366-1:1997 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 "Agricultural food products" in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 "Milch und Milchprodukte - Probenahme- und Untersuchungsverfahren" erarbeitet, dessen Sekretariat vom NNI gehalten wird.

Diese Europäische Norm muß den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 1997, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 1997 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, die Tschechische Republik und das Vereinigte Königreich.

Anerkennungsnotiz

Der Text der Internationalen Norm ISO 13366-1:1997 wurde von CEN als Europäische Norm ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Warnung: Bei der Anwendung dieser Norm werden gegebenenfalls Gefahrstoffe verwendet, gefährliche Arbeitsschritte durchgeführt und Geräte eingesetzt, von denen eine Gefahr ausgehen kann. In dieser Norm werden nicht alle Sicherheitsprobleme im Zusammenhang mit deren Anwendung angesprochen.

Es steht in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, entsprechend sichere und gesundheitlich vertretbare Praktiken einzuführen und vor der Anwendung die Anwendbarkeit von Durchführungsbegrenzungen zu überprüfen.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 13366 legt das Referenzverfahren für die Zählung somatischer Zellen in roher und chemisch konservierter Milch fest.

Es ist für die Herstellung von Standarduntersuchungsproben und für die Kalibrierung mechanisierter und automatisierter Zellzählverfahren geeignet.

2 Definition

Für die Anwendung dieses Teils von ISO 13366 gilt folgende Definition:

2.1 Somatische Zellen: Zellen einschließlich ihrer Kerne, dies bedeutet alle Leukozyten und Epithelzellen.

3 Prinzip

Eine Menge der zu untersuchenden Milchprobe wird auf einem Objektträger dünn ausgestrichen um einen Film auszubilden. Der Ausstrich wird getrocknet und gefärbt und anschließend werden die gefärbten Zellen unter einem Mikroskop ausgezählt. Multiplikation der Anzahl der von einer festgelegten Fläche ausgezählten Zellen mit einem Arbeitsfaktor, woraus sich die Anzahl der Zellen je Milliliter ergibt.

4 Chemikalien

WARNUNG: Tetrachlorethan ist giftig. Ethidiumbromid ist toxisch. Die Herstellung und Verwendung der Farblösung muß unter einem Abzug vorgenommen werden. Sicherheitshalber sind Handschuhe zu tragen.

Soweit nicht anders angegeben, sind nur analysenreine Chemikalien und destilliertes oder deionisiertes Wasser oder Wasser von entsprechender Reinheit zu verwenden.

4.1 Farblösung

4.1.1 Zusammensetzung

Ethanol, Volumenkonzentration 95%	54,0 ml
Tetrachlorethan	40,0 ml
Methylenblau	0,6 g
Eisessig	6,0 ml

ANMERKUNG: Wahlweise darf Tetrachlorethan durch die gleiche Menge Trichlorethan ersetzt werden. Anstelle von Methylenblau darf Ethidiumbromid verwendet werden (siehe ISO 13366-3).

4.1.2 Herstellung

Ethanol und Tetrachlorethan werden in einer Flasche gemischt und in dem auf eine Temperatur von 65 °C eingestellten Wasserbad (siehe 5.1) erwärmt. Anschließend wird das Methylenblau zugefügt und gründlich durchmischt, in einem Kühlschrank auf 4 °C abgekühlt und anschließend der Eisessig zugefügt. Die Lösung wird durch einen geeigneten Filter (siehe 5.3) filtriert und in einer luftdicht verschlossenen Flasche aufbewahrt. Vor Gebrauch wird die Lösung gegebenenfalls erneut filtriert.

5 Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laboratoriumsgeräte und besonders folgende:

5.1 Wasserbad, einstellbar auf eine Temperatur von 65 °C ± 5 °C.

5.2 Wasserbad, einstellbar auf eine Temperatur von 35 °C ± 5 °C.

Seite 4
EN ISO 13366-1 : 1997

5.3 Filter, beständig gegen die verwendeten Lösungsmittel mit einer Porengröße von 10 μm bis 12 μm oder geringer.

5.4 Mikroskop mit 500- bis 1000facher Vergrößerung.

Falls Ethidiumbromid verwendet wird, muß das Mikroskop mit einer Fluoreszenzeinrichtung ausgestattet sein.

5.5 Mikrospritze mit 0,01 ml Nennvolumen und mit einer relativen Grenzabweichung von $\pm 2\%$.

5.6 Objektträger mit eingezeichnetem Ausstrichfeld von 20 mm \times 5 mm oder ein Normalobjektträger mit einer Schablone und den Maßen von 20 mm \times 5 mm.

5.7 Heizplatte, einstellbar auf 40 $^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$.

5.8 Heißlufttrockner, Haartrocknerbauart.

6 Probenahme

6.1 Es ist wichtig, daß dem Laboratorium eine Probe zur Verfügung gestellt wird, die tatsächlich repräsentativ ist und die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden ist.

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Ein als geeignet zu empfehlendes Probenahmeverfahren ist in ISO 707 angegeben [1].

6.2 Wenn automatische Probenahmegeräte verwendet werden, müssen diese ausreichend geprüft worden sein.

6.3 Vor der Untersuchung oder Konservierung sollten die Proben bei einer Temperatur von 2 $^{\circ}\text{C}$ bis 6 $^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

6.4 Proben, die nicht innerhalb von 6 h nach der Probenahme untersucht werden, sind durch Zugabe von Borsäure zu konservieren. Die Endkonzentration der Borsäure darf 0,6 g je 100 ml Probe nicht überschreiten. Derartige Proben dürfen bei 2 $^{\circ}\text{C}$ bis 6 $^{\circ}\text{C}$ nicht länger als 24 h gelagert werden.

7 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird in dem auf eine Temperatur von 35 $^{\circ}\text{C}$ eingestellten Wasserbad (siehe 5.2) erwärmt. Anschließend wird sie gründlich durchmischt und auf die Temperatur abgekühlt, bei der die Mikrospritze kalibriert worden ist, z. B. auf 20 $^{\circ}\text{C}$.

8 Durchführung

Von jeder Untersuchungsprobe werden mindestens zwei Ausstriche hergestellt und gezählt.

Die Objektträger (siehe 5.6) werden z. B. mit Ethanol gereinigt, mit staubfreiem Papier abgetrocknet, sowie abgeflammt und abgekühlt.

8.1 Untersuchungsmenge und Herstellung des Ausstrichs

Mit der Mikrospritze (siehe 5.5) wird 0,01 ml von der vorbereiteten Untersuchungsprobe (siehe Abschnitt 7) entnommen. Der mit der Probe in Berührung gekommene äußere Teil der Spritze wird gründlich gereinigt. Zunächst wird mit der Untersuchungsmenge der Umriss des Ausstrichs von 20 mm \times 5 mm (siehe 5.6) auf einen sauberen Objektträger ausgestrichen. Dann wird diese Fläche so gleichmäßig wie möglich mit der restlichen Untersuchungsmenge ausgefüllt. Der Ausstrich wird auf einer horizontalen Heizplatte (siehe 5.7) getrocknet, bis er vollkommen trocken ist. Bessere Ergebnisse werden durch mehrstündige Trocknung des

Ausstrichs bei Umgebungstemperatur erhalten.

Der auf dem Objektträger getrocknete Ausstrich wird für die Dauer von 30 min in die Farblösung (siehe 4.1) eingetaucht. Gegebenenfalls läßt sich die Trocknung mit Hilfe des Heißlufttrockners (siehe 5.8) vervollständigen. Dann wird der Ausstrich in Leitungswasser eingetaucht, bis der gesamte überschüssige Farbstoff entfernt ist. Der Ausstrich wird erneut getrocknet und staubgeschützt aufbewahrt.

8.2 Bestimmung

Mit Hilfe des Mikroskops (siehe 5.4) werden die Zellkerne im Ausstrich gezählt (mindestens 400). Sie sind deutlich erkennbar und mindestens die Hälfte sollte im Gesichtsfeld des Mikroskops sichtbar sein. Zu vermeiden sind Zählstreifen, die ausschließlich in den Randzonen des Ausstrichs ausgewählt werden.

Mindestens einmal monatlich ist das sorgfältige Ansetzen der Ausstriche und dementsprechend die Verlässlichkeit der Zählergebnisse durch Auszählen verschiedener Bereiche des Ausstrichs zu kontrollieren.

9 Auswertung

9.1 Die auszuzählenden Streifen haben eine Länge von jeweils 5 mm. Die Breite eines Streifens entspricht dem Durchmesser des Gesichtsfeldes im Mikroskop. Bei Verwendung einer Untersuchungsmenge von 0,01 ml der Probe wird der Arbeitsfaktor, w_i , nach folgender Gleichung berechnet:

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

Dabei ist:

d der Zahlenwert des Durchmessers des Gesichtsfeldes im Mikroskop, in Millimeter;

b die Anzahl der vollständig ausgezählten Streifen.

9.2 Die Anzahl der ausgezählten somatischen Zellen wird mit dem Arbeitsfaktor w_i multipliziert, woraus sich die Anzahl der Zellen je Milliliter der Probe ergibt.

10 Präzision

10.1 Wiederholgrenze und Vergleichgrenze

Anhang B von ISO 13366-3 : 1997 enthält Empfehlungen für die Durchführung von Qualitätskontrollen und Ringversuchen.

10.2 Mindestanzahl auszählender Zellen

Weil die mikroskopische Zählung somatischer Zellen auch für die Kalibrierung automatisierter und mechanisierter Zählverfahren angewendet werden kann, wird der Variationskoeffizient bei Auszählungen identischer Proben nicht größer als der für elektronische Geräte sein. Der Variationskoeffizient einer Milchprobe, die 400 000 bis 600 000 Zellen je Milliliter, mit einem Anteil von etwa 80 % neutrophiler Zellen, enthält, wird 5 % nicht übersteigen.

Damit diese Forderung erfüllt wird, muß die Anzahl der in jeder Probe auszählenden somatischen Zellen mindestens 400 betragen.

Die Poisson'sche Verteilung setzt voraus, daß

$$M = V = s_d^2$$

Seite 6
EN ISO 13366-1 : 1997

Dabei ist:

M der Mittelwert;
 V die Varianz;
 s_d die Standardabweichung.

Der Variationskoeffizient (VK) beträgt

$$VK = \frac{s_d \times 100}{M} \% \quad \text{oder}$$

$$VK = \frac{100}{s_d} \% \quad \text{oder}$$

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

Dabei ist:

M ist der Mittelwert, welcher bei der Auszählung der Anzahl somatischer Zellen der Anzahl der gezählten Partikel (Zellen) entspricht.

11 Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht ist anzugeben:

- das Verfahren, nach dem die Probenahme durchgeführt worden ist, falls bekannt;
- das angewendete Verfahren;
- den Arbeitsfaktor der Mikroskopie;
- das(die) erhaltene(n) Untersuchungsergebnis(se);
- falls die Wiederholgrenze überprüft worden ist, das erhaltene Endergebnis.

Im Untersuchungsbericht sind auch alle Arbeitsbedingungen anzugeben, die in diesem Teil von ISO 13366 nicht festgelegt oder als freigestellt zu betrachten sind, einschließlich der Einzelheiten von Umständen, die das (die) Untersuchungsergebnis(se) beeinflußt haben können.

Der Untersuchungsbericht muß alle Informationen enthalten, die für die vollständige Identifizierung der Probe erforderlich sind.

Anhang A (informativ)

Literaturhinweise

- [1] ISO 707 : 1997
Milk and milk products – Guidance on sampling
- [2] ISO 13366-2 : 1997
Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Electronic particle counter method
- [3] ISO 13366-3 : 1997
Milk – Enumeration of somatic cells – Part 3: Fluoro-opto-electronic method