

NORME
INTERNATIONALE

ISO
13969

FIL
183

Première édition
2003-10-01

**Lait et produits laitiers — Lignes
directrices pour une description
normalisée des méthodes
microbiologiques de dépistage
d'inhibiteurs microbiens**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Milk and milk products — Guidelines for a standardized description of
microbial inhibitor tests*
(standards.iteh.ai)

ISO 13969:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003>



Numéros de référence
ISO 13969:2003(F)
FIL 183:2003(F)

© ISO et FIL 2003

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 13969:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003>

© ISO et FIL 2003

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

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 13969|FIL 183 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), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément par l'AOAC International.

[ISO 13969:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003>

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 et avec l'AOAC International 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 votants.

L'ISO 13969|FIL 183 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), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément par l'AOAC International.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO/FIL/AOAC, *Antimicrobiens et autres résidus vétérinaires médicaux*, du Comité permanent chargé des *Méthodes analytiques pour les additifs et contaminants*, sous la conduite de son chef de projet, M^{me} G. Suhren (DE).

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 13969:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003>

Introduction

Les paramètres dont les grandes lignes sont tracées dans la présente Norme internationale n'ont pas nécessairement besoin d'être évalués complètement pour chaque essai; ils dépendent en effet

- a) du domaine d'application de la méthode étudiée [par exemple méthode d'évaluation ou méthode de référence, type de lait (c'est-à-dire espèce animale, lait cru/pasteurisé)],
- b) des informations recherchées [par exemple l'introduction d'une nouvelle substance avec une limite maximale de résidus (LMR) fixée], et
- c) du schéma de détection (par exemple de la sensibilité des micro-organismes d'essai à une variété plus ou moins grande de composés antimicrobiens).

Par conséquent, il convient que les «termes de référence» entre le concepteur et l'utilisateur d'une certaine méthode fassent l'objet d'un accord dans le contexte des présentes lignes directrices, en omettant par exemple les aspects qui ne relèvent pas du domaine d'application concerné.

L'inconvénient dans l'interprétation des résultats de dépistage d'inhibiteurs microbiens est qu'ils sont généralement évalués de manière subjective et en très peu d'étapes, à savoir qu'ils sont déclarés négatifs, douteux ou positifs par comparaison avec des échantillons témoins positifs et/ou négatifs.

Dans les cas où le milieu contient un indicateur, le changement de couleur peut dépendre du mode d'action de l'antimicrobien présent. Pour cette raison, il est parfois difficile d'établir une distinction claire entre des résultats positifs et négatifs. L'interprétation des résultats en peu d'étapes signifie également que de petites altérations ou des colorations mineures, qui peuvent avoir de l'importance dans un programme de validation, nécessitent un effort expérimental important.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 13969:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003>

Lait et produits laitiers — Lignes directrices pour une description normalisée des méthodes microbiologiques de dépistage d'inhibiteurs microbiens

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale indique comment établir une description normalisée des méthodes microbiologiques de dépistage d'inhibiteurs microbiens pour le lait et pour les produits laitiers. Elle a pour objet de fournir un cadre et une base d'évaluation/validation des méthodes microbiologiques de dépistage d'inhibiteurs microbiens, permettant la comparaison de données obtenues à partir de différentes méthodes et études expérimentales.

2 Termes et définitions

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

2.1

faux positifs

pourcentage de résultats positifs lors de tests réalisés sur des échantillons négatifs

[ISO 13969:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003)

2.2

faux négatifs

pourcentage de résultats négatifs au(x) niveau(x) de détection indiqué(s)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-7165825fd9fa/iso-13969-2003>

2.3

limites de détection

niveau de concentration auquel un pourcentage défini d'échantillons est détecté

EXEMPLE 95 %, avec le niveau de confiance correspondant.

3 Informations à fournir par le concepteur ou par le fabricant

3.1 Méthodologie

Il convient que le concepteur de la méthode ou le fabricant fournisse des informations au moins sur les points suivants:

- a) une description de la méthode;
- b) le principe de la méthode;
- c) le processus technique (par exemple degré d'automatisation, traitement des données);
- d) l'interprétation des résultats (par exemple scores, échelle, définition de ce qui doit être considéré comme «positif» ou «négatif»);
- e) la capacité (par exemple débit d'échantillonnage);

- f) les exigences spécifiques pour l'échantillonnage, la conservation et l'essai;
- g) la procédure adoptée pour l'assurance qualité par le concepteur ou par le fabricant;
- h) le domaine d'application, à savoir
 - 1) l'utilisation prévue de la méthode (par exemple évaluation ou confirmation);
 - 2) le substrat/la matrice (par exemple lait de vache ou lait d'autres animaux, poudre de lait ou autre produit alimentaire).

3.2 Exigences de fonctionnement

Il convient que les informations suivantes soient données:

- a) les exigences en matière d'expérience et de formation de l'utilisateur;
- b) les exigences particulières de sécurité et de service en laboratoire (par exemple puissance électrique, lab S1, élimination des déchets, niveau de concentration maximal);
- c) les exigences de maîtrise de la qualité par le fabricant et/ou par l'utilisateur.

3.3 Spécifications relatives aux essais

Il convient de fournir l'information suivante en ce qui concerne les définitions relatives aux essais:

- la limite de détection (voir 2.3).

(standards.iteh.ai)

3.4 Documentation

[ISO 13969:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-76325d921919/iso-13969-2003)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-76325d921919/iso-13969-2003)

Il convient de fournir des informations sur les points suivants: [13969-2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/beb98a98-39cb-4c0f-868b-76325d921919/iso-13969-2003)

- a) le manuel de l'utilisateur, incluant un guide de dépannage;
- b) les fournisseurs d'instruments, de réactifs et d'étalons, ainsi que les prestataires de services techniques et du service à la clientèle;
- c) le statut de reconnaissance officielle ou d'introduction générale dans les pays spécifiés;
- d) la disponibilité des matériaux de référence;
- e) la disponibilité de méthodes internationales de référence reconnues/validées issues de l'ISO, de la FIL, de l'AOAC International ou d'autres organismes;
- f) la disponibilité de textes et d'études pratiques.

4 Évaluation des attributs de la méthode microbiologique de dépistage d'inhibiteurs microbiens

4.1 Généralités

Il convient que la validation d'une méthode soit toujours effectuée dans des conditions maîtrisées, c'est-à-dire sur la base d'échantillons pour essai définis. L'influence de conditions particulières est décrite en 4.3.6.

4.2 Conditions préalables

4.2.1 Lait exempt d'antimicrobiens («lait négatif»)

Les vaches dont est issu le lait devant servir de «lait négatif» doivent satisfaire aux exigences énumérées ci-après. Si toutefois la méthode est utilisée avec du lait d'animaux autres que la vache, les exigences relatives au statut de ces animaux doivent être adaptées en conséquence.

- a) Être en bonne santé sur le plan clinique et subclinique, en particulier en ce qui concerne les mamelles (< 150 000 cellules somatiques par millilitre).
- b) Ne pas avoir reçu de traitement ou d'alimentation contenant des substances antimicrobiennes pendant au moins les huit semaines précédant la traite. En cas de traitement pour non-lactation, il convient de ne pas recueillir le lait dans les 60 jours qui suivent le vêlage, à condition que la période de non-lactation ait duré au moins quatre semaines.
- c) Être en pleine lactation, c'est-à-dire à plus de 60 jours et à moins de 200 jours du dernier vêlage, avec une production journalière de lait de plus de 5 kg.
- d) Il convient de mélanger les traites d'au moins sept vaches pour compenser les variations individuelles de composition du lait.
- e) Le total des cellules viables doit être de 10^4 UFC (unités formant colonie) par millilitre avant le processus de conservation (congélation, lyophilisation). Tenir compte de l'éventuelle présence de micro-organismes produisant des β -lactamases dans le cas d'un essai d'antibiotique de la famille des β -lactamines.

4.2.2 Produits

Il convient que les produits utilisés dans le cadre de la méthode proviennent d'un fournisseur reconnu, avec de préférence un certificat d'analyse et une spécification garantie. Il convient en outre que la concentration requise soit calculée d'après les formes basique ou acide libre du produit, moyennant une correction de la pureté, et qu'une attention particulière soit apportée aux produits présentant des problèmes de stabilité/efficacité.

Sauf indication contraire, il convient que les limites de détection (4.3.2) soient évaluées en utilisant tous les antimicrobiens et/ou concentrations que la méthode, d'après les déclarations du concepteur/du fabricant de celle-ci, permettra de détecter.

4.2.3 Solvants

Si des solvants spéciaux ou autres produits chimiques sont nécessaires pour dissoudre les substances, il convient de s'assurer que la présence de ces solvants ou autres produits chimiques dans les échantillons n'influe pas sur les résultats d'essai. Il convient de limiter l'utilisation de solvants autres que l'eau.

4.2.4 Préparation des échantillons pour essai

4.2.4.1 Généralités

La préparation des échantillons pour essai peut entraîner un certain nombre de problèmes et représenter une lourde charge de travail pour les laboratoires d'évaluation. Il peut donc être avantageux d'employer un système centralisé de préparation d'échantillons pour essai permettant de fournir aux laboratoires intéressés des échantillons sous une forme stable (par exemple lyophilisés).

Pour les évaluations à grande échelle (par exemple pour obtenir la base de données permettant de donner une description généralisée), il convient de préparer toutes les dilutions requises en un seul lot, afin d'éviter les variations journalières de pesée, de dilution et d'état du «lait négatif» (4.2.1).

4.2.4.2 Choix des concentrations

Le choix des concentrations pour la détermination des limites de détection est décrit en 4.3.2. Pour un but précis, sauf indication contraire, il convient que l'essai porte à la fois sur la concentration représentant la limite de détection, sur le niveau de concentration immédiatement supérieur à la sensibilité indiquée de l'essai et au lait négatif correspondant et sur le niveau de concentration correspondant à deux ou trois niveaux en dessous. Pour avoir un repère, il est recommandé de diviser la plage de concentrations donnant 50 % à 100 % de positifs en trois à quatre portions équidistantes (respectivement à l'échelle linéaire et logarithmique), comme le démontre l'exemple de la Figure 1.

4.2.4.3 Dilution

Il convient de prendre les précautions suivantes pour la préparation des séries de dilution de produits.

- a) Préparer les séries de dilution de sorte que seule la dilution finale soit préparée avec du lait, pour éviter les liaisons protéiniques.
- b) Il convient que la portion de solution étalon aqueuse ajoutée à l'étape finale de dilution du lait soit la même pour toutes les dilutions et qu'elle soit inférieure à 1 %.

4.2.4.4 Conservation

Il est préférable que la conservation des échantillons soit effectuée par lyophilisation, sauf indication contraire du concepteur/fabricant de la méthode à l'étude ou du principe de la méthode. Le mode opératoire suivant s'est avéré praticable.

- a) Immédiatement après la préparation des divers échantillons de lait, il convient que toutes les dilutions soient versées dans les tubes à essai selon le volume souhaité et congelées à $-18\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ en position inclinée.
- b) Il convient de procéder à la lyophilisation le plus tôt possible, et au maximum une semaine après la congélation. Au cours du processus de lyophilisation, il convient que la température n'excède pas 25 °C .
- c) Il est recommandé de fermer hermétiquement les tubes pour essais immédiatement après la lyophilisation et de les conserver dans l'obscurité à $\leq 6\text{ °C}$.
- d) Il convient de reconstituer les échantillons avec de l'eau distillée. Il convient que le volume d'eau ajouté soit inférieur de 10 % au volume de l'échantillon qui était lyophilisé, pour compenser la matière sèche du lait.
- e) Les échantillons reconstitués ne peuvent être utilisés que le jour de la reconstitution. Il est recommandé de les conserver au réfrigérateur avant utilisation, et de les jeter à la fin de la journée.

4.2.4.5 Limitation des erreurs de préparation

Dans la plupart des cas, il ne sera pas possible de confirmer la concentration d'antimicrobiens dans les échantillons selon une méthode quantitative indépendante. Une approche pragmatique du problème pour limiter les erreurs de préparation est donnée ci-après.

- a) Il convient que de trois à cinq personnes préparent, individuellement, leur propre série de dilution.
- b) Il est recommandé que les essais sur les échantillons de ces séries de dilution soient effectués avec des méthodes de dépistage d'inhibiteurs microbiologiques appropriées ou selon d'autres méthodes adéquates.
- c) Pour le mélange des échantillons finaux, il convient de choisir uniquement les séries de dilution qui donnent des résultats d'essai similaires.

4.2.5 Modèle expérimental

4.2.5.1 Nombre d'essais

4.2.5.1.1 Méthode avec lecture subjective

Pour les méthodes microbiologiques de dépistage d'inhibiteurs microbiens avec lecture subjective et peu de résultats possibles, il convient de mener toutes les expériences en aveugle. La (les) personne(s), de préférence plus d'une, responsable(s) de l'analyse reçoit (reçoivent) des échantillons codés sans connaître la combinaison de substances/concentrations. Il convient d'exprimer les résultats en pourcentage de résultats positifs sur le nombre total d'essais pour chaque niveau de concentration évaluée. Le calcul des pourcentages nécessite généralement au moins 10 à 20 essais pour chaque concentration choisie. La résolution de lecture à chaque niveau de concentration testé est égale à $\pm 5\%$ si le test porte sur 20 essais, et à $\pm 10\%$ si l'essai porte sur 10 essais.

4.2.5.1.2 Méthode avec lecture objective

Pour les méthodes avec lecture objective (par exemple au moyen d'un lecteur ELISA et d'une échelle de mesure), le modèle expérimental n'est pas nécessairement une étude en aveugle. Le nombre d'essais dépend de la répétabilité de la méthode, mais il convient qu'il y ait au moins trois à cinq essais pour chaque combinaison de substances/concentrations. Si un essai statistique est nécessaire, il convient d'analyser le nombre approprié d'essais.

Par exemple, pour la détermination à 90 % de négatifs avec un niveau de confiance de 95 %, il faut 60 échantillons pour les lectures subjectives et 30 échantillons pour les méthodes avec interprétation instrumentale. Sauf indication contraire, il convient d'utiliser au moins deux différents lots de kits d'essai pour l'évaluation des différents attributs. (standards.iteh.ai)

4.2.5.2 Évaluation des données expérimentales

Pour l'analyse des données, il est recommandé d'adopter une présentation graphique dans laquelle l'axe x représente la concentration de la substance étudiée et l'axe y le pourcentage de résultats positifs ou les valeurs de l'échelle («courbes dose-réponse»).

Le choix de porter l'axe x sur une échelle linéaire ou logarithmique dépend de l'étendue des concentrations soumises à l'essai. Si la plage s'étend à plus de 100 fois, une échelle logarithmique est plus appropriée qu'une échelle linéaire. Avec ces coordonnées, les différentes conditions d'essai (par exemple le lot de kit d'essai) donnent des courbes dose-réponse qui permettent d'effectuer une comparaison visuelle concernant l'effet du paramètre étudié.

Pour l'évaluation statistique, il est impératif de définir le niveau de confiance pour la méthode étudiée. Par exemple, on pourrait définir que la limite de détection est égale à la concentration à laquelle 95 % des résultats d'essai sont interprétés comme positifs.

Les limites de détection peuvent être exprimées de deux manières (voir Figure 1):

- la plage [exprimée en microgrammes par kilogramme ($\mu\text{g}/\text{kg}$)] couvrant les deux concentrations entre lesquelles se situe l'intersection de la courbe dose-réponse avec la ligne représentant la valeur pour «95 % de résultats positifs»;
- la concentration correspondant à l'intersection de la courbe dose-réponse avec la ligne représentant la valeur pour «95 % de résultats positifs».

Pour les méthodes à échelle continue, il convient de calculer les moyennes (\bar{X}) et les écarts-types (s) pour chaque concentration d'essai, c'est-à-dire l'intersection de la valeur moyenne moins $2s$ ($\bar{X} - 2s$) ou la valeur moyenne plus $2s$ ($\bar{X} + 2s$) selon que la réponse est inversement liée à la concentration ou pas. La valeur sur l'axe y , qui doit être interprétée comme positive, correspond à la limite de détection.