

---

---

**Lait — Définition et évaluation  
de la précision globale des méthodes  
alternatives d'analyse du lait —**

Partie 3:

**Protocole pour l'évaluation et la  
validation des méthodes quantitatives  
alternatives d'analyse du lait**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Milk — Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative  
methods of milk analysis —*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0136cd5-68ba-45ef-bb84-b850d07c2276/iso-8196-3-2009>

*Part 3: Protocol for the evaluation and validation of alternative  
quantitative methods of milk analysis*



**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 8196-3:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0136cd5-68ba-45ef-bb84-b850d07e2376/iso-8196-3-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0136cd5-68ba-45ef-bb84-b850d07e2376/iso-8196-3-2009>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO et FIL 2009

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://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](mailto:info@fil-idf.org)  
Web [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
Avant-propos .....	v
Introduction.....	vi
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Principes généraux relatifs à la validation des méthodes alternatives</b> .....	<b>3</b>
<b>4.1</b> <b>Protocole de validation</b> .....	<b>3</b>
<b>4.2</b> <b>Domaine de validité de l'agrément</b> .....	<b>3</b>
<b>5</b> <b>Protocole technique de validation</b> .....	<b>4</b>
<b>5.1</b> <b>Déroulement des opérations</b> .....	<b>4</b>
<b>5.2</b> <b>Étude comparative des méthodes</b> .....	<b>4</b>
<b>5.3</b> <b>Rapport et délivrance d'un agrément</b> .....	<b>17</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Processus de mesure et précision globale</b> .....	<b>19</b>
<b>Annexe B</b> (informative) <b>Limites relatives aux caractéristiques de performance avec un lait cru</b> .....	<b>20</b>
<b>Annexe C</b> (informative) <b>Exemples de calcul</b> .....	<b>23</b>
<b>Annexe D</b> (informative) <b>Résumé des formules statistiques relatives aux évaluations des méthodes</b> .....	<b>38</b>
<b>Annexe E</b> (informative) <b>Mode opératoire de préparation d'une série d'échantillons lors de l'évaluation de la linéarité</b> .....	<b>43</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>47</b>

## 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 8196-3 | FIL 128-3 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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0136cd5-68ba-45ef-bb84-b850d97e2346/iso-8196-3-2009>

L'ISO 8196 | FIL 128 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Lait — Définition et évaluation de la précision globale des méthodes alternatives d'analyse du lait*:

- *Partie 1: Attributs analytiques des méthodes alternatives*
- *Partie 2: Calibrage et contrôle qualité dans les laboratoires laitiers*
- *Partie 3: Protocole pour l'évaluation et la validation des méthodes quantitatives alternatives d'analyse du lait*

## 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 normalisées pour le lait et les produits laitiers.

La tâche principale des Comités permanents est d'élaborer les Normes internationales. 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 8196-3|FIL 128-3 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 son chef de projet, Mr. O. Leray (FR).

La présente édition de l'ISO 8196-3|FIL 128-3, conjointement à l'ISO 8196-1|FIL 128-1 et à l'ISO 8196-2|FIL 128-2, annule et remplace la FIL 128:1985, qui a fait l'objet d'une révision technique.

L'ISO 8196|FIL 128 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Lait — Définition et évaluation de la précision globale des méthodes alternatives d'analyse du lait*:

- *Partie 1: Attributs analytiques des méthodes alternatives*
- *Partie 2: Calibrage et contrôle qualité dans les laboratoires laitiers*
- *Partie 3: Protocole pour l'évaluation et la validation des méthodes quantitatives alternatives d'analyse du lait*

## Introduction

La présente partie de l'ISO 8196 | FIL 128 est complémentaire de l'ISO 8196-1 | FIL 128-1. Elle décrit un protocole d'évaluation des nouvelles méthodes alternatives pour lesquelles l'ISO 8196-1 | FIL 128-1 ne peut pas s'appliquer, par exemple lorsque l'organisation des études interlaboratoires est empêchée par un nombre encore trop faible de nouveaux appareils disponibles pour une telle étude.

Ceci est généralement le cas pour les méthodes instrumentales dédiées (par exemple analyse pour le paiement du lait, ou pour le contrôle laitier) dont la commercialisation dépend d'agrément officiels d'utilisation. Toute demande d'un tel agrément officiel doit être accompagnée d'une ou plusieurs évaluations des caractéristiques de performance appropriées.

La présente partie de l'ISO 8196 | FIL 128 spécifie un protocole harmonisé permettant à un laboratoire expert de procéder à une telle validation de méthode. Elle énumère les étapes d'évaluation et propose une approche basée sur des critères pour l'évaluation des caractéristiques de performance, y compris des lignes directrices pour le contrôle de la conformité statistique.

En se basant sur un tel protocole harmonisé, en règle générale un nombre limité d'évaluations doit seul suffire aux organismes nationaux ou à une organisation internationale pour prendre une décision relative à l'usage des méthodes et/ou des équipements dans leur domaine d'activité. Un exemple est donné pour l'évaluation de méthodes permettant le dosage de la matière grasse, des protéines, du lactose, de l'urée et la numération des cellules somatiques dans le lait.

ISO 8196-3:2009  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0136cd5-68ba-45ef-bb84-b850d07e2376/iso-8196-3-2009>

# Lait — Définition et évaluation de la précision globale des méthodes alternatives d'analyse du lait —

## Partie 3: Protocole pour l'évaluation et la validation des méthodes quantitatives alternatives d'analyse du lait

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 8196 | FIL 128 spécifie un protocole pour l'évaluation et la validation des méthodes alternatives quantitatives d'analyse du lait.

Le protocole est applicable à tous les constituants du lait, y compris les cellules somatiques. Pour les paramètres microbiologiques, d'autres normes, telles que l'ISO 16140<sup>[5]</sup>, s'appliquent. La présente partie de l'ISO 8196 | FIL 128 est également applicable à la validation de nouvelles méthodes alternatives pour lesquelles le nombre limité d'exécutants ne permet pas l'organisation d'une étude interlaboratoire et l'ISO 8196-1 | FIL 128-1 ne peut donc pas s'appliquer.

La présente partie de l'ISO 8196 | FIL 128 établit également les principes généraux d'une procédure de délivrance d'agrément international de ces méthodes alternatives, basée sur le protocole de validation défini dans la présente partie de l'ISO 8196 | FIL 128-3:2009.

### 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 (y compris les éventuels amendements) s'applique.

ISO 3534-1, *Statistique — Vocabulaire et symboles — Partie 1: Termes statistiques généraux et termes utilisés en calcul des probabilités*

ISO 5725-1, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 1: Principes généraux et définitions*

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

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

ISO 9622, *Lait entier — Détermination des teneurs en matière grasse laitière, en protéines et en lactose — Lignes directrices pour l'utilisation des appareils de dosage par absorption dans le moyen infrarouge<sup>1)</sup>*

ISO/CEI 17025, *Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*

1) Norme internationale équivalente à la FIL 141.

### 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, l'ISO 3534-1 et dans l'ISO 5725-1 ainsi que les suivants s'appliquent.

**3.1 validation d'une méthode alternative**  
démonstration que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables à ceux obtenus avec la méthode de référence, avec une précision conforme aux exigences définies et une aptitude à l'emploi prévu

**3.2 mesurande**  
constituant  
analyte  
critère  
grandeur ou caractéristique particulière soumise à mesurage

EXEMPLES Un mesurande peut être un constituant du lait, une caractéristique physique ou un élément biologique.

NOTE Adapté de l'ISO/CEI Guide 99 :2007<sup>[8]</sup> définition 2.6.

**3.3 méthode quantitative**  
méthode d'analyse dont la réponse est la valeur de la quantité, la concentration ou la valeur du **mesurande** (3.2) mesurés soit directement, soit dans une quantité d'échantillon donnée

**3.4 étude comparative des méthodes**  
étude réalisée par un laboratoire organisateur consistant à comparer la méthode alternative à la méthode de référence dans des conditions d'expérimentation

**3.5 étude de confirmation de la méthode**  
étude de la méthode alternative réalisée dans des laboratoires de routine en vue de confirmer les résultats de l'**étude comparative des méthodes** (3.4) réalisée préalablement

**3.6 étude interlaboratoires**  
étude des performances d'une méthode alternative dans un ou plusieurs échantillons «identiques» d'une matière homogène et stable dans des conditions documentées, dans plusieurs laboratoires et sous le contrôle du **laboratoire organisateur** (3.7)

**3.7 laboratoire organisateur**  
laboratoire disposant du personnel qualifié et des compétences requises pour réaliser l'**étude comparative des méthodes** (3.4)

**3.8 agrément national**  
autorisation d'emploi de la méthode dans un pays à des fins définies — généralement pour des missions d'intérêt général et/ou à caractère officiel – délivrée par un organisme officiel

**3.9 agrément international**  
autorisation d'emploi de la méthode au niveau international à des fins définies — généralement pour des missions d'intérêt général et/ou à caractère officiel — délivrée par un organisme international au profit de ses membres



## 4 Principes généraux relatifs à la validation des méthodes alternatives

### 4.1 Protocole de validation

#### 4.1.1 Généralités

Le protocole de validation comprend deux phases décrites respectivement en 4.1.2 et 4.1.3.

#### 4.1.2 Phase I

Une étude comparative des méthodes comprend l'évaluation des attributs analytiques et une comparaison de la méthode alternative à la méthode de référence dans des conditions d'expérimentation. Cette partie de l'évaluation doit être réalisée par un laboratoire organisateur spécialisé dans les évaluations analytiques et expérimenté dans l'application de la méthode de référence concernée. Le laboratoire doit être conforme à l'ISO/CEI 17025 pour ce type d'activité.

#### 4.1.3 Phase II

Une étude de confirmation de la méthode dans des conditions d'essai de routine est lancée dès que la Phase I a abouti. Il est recommandé d'examiner au moins deux appareils installés dans des laboratoires de routine différents pendant une période minimale de deux mois dans des conditions d'essai de routine. Au cours de cette période, il convient de veiller à ce que chaque appareil soit exposé au niveau de variation normalement prévu pour les échantillons. Il convient que chaque appareil satisfasse aux exigences de contrôle de la qualité d'un jour à l'autre, telles que spécifiées dans l'ISO 8196-2 | FIL 128-2, en vérifiant la conformité des résultats aux valeurs de précision globale obtenues lors de la Phase I. Il convient également que les aspects pratiques généraux de la méthode alternative soient évalués, par exemple la vitesse, les produits consommables, la convivialité, la sécurité et la robustesse.

[ISO 8196-3:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0136cd5-68ba-45ef-bb84-b850d07e2376/iso-8196-3-2009)

#### 4.1.4 Agrément national

Sur la base du contenu des rapports présentés, les organismes nationaux peuvent autoriser l'utilisation d'une méthode alternative à des fins définies. La conformité aux exigences spécifiées dans ce protocole garantit une qualité suffisante des résultats de mesure et une comparabilité avec d'autres méthodes et/ou appareils de type similaire validés ailleurs selon le même protocole.

#### 4.1.5 Agrément international

Des organismes internationaux peuvent délivrer un agrément international, par exemple pour le contrôle laitier international ou pour répondre à une approche par critères. Un certain nombre de validations individuelles (c'est-à-dire nationales) acquises, consignées de manière normalisée, peut offrir un niveau de confiance suffisant dans les performances de la nouvelle méthode alternative et remplacer les études interlaboratoires. Il convient que l'évaluation dans son ensemble soit renouvelée avec succès dans un nombre minimal de pays distincts. Trois validations indépendantes sont recommandées.

### 4.2 Domaine de validité de l'agrément

4.2.1 Un agrément n'est délivré que dans les circonstances spécifiées en 4.2.2 et en 4.2.3.

4.2.2 Le domaine d'application dans lequel les appareils ont été évalués (constituant, gamme de concentrations, espèces animales, etc.). Par exemple, lorsque le lait de différentes espèces animales doit être analysé, des évaluations spécifiques doivent être réalisées pour chaque espèce concernée afin d'évaluer si l'appareil est adapté à l'usage prévu. Dans le cas d'un lait provenant de races produisant un lait ayant une teneur inhabituelle en matière grasse et en protéines (par exemple la race Jersey qui produit un lait ayant une haute teneur en matière grasse et en protéines), il convient que l'évaluation couvre la totalité de la gamme de concentration du constituant concerné.

**4.2.3** La méthode spécifique et/ou la configuration spécifique de l'appareil utilisées ont été évaluées. En cas de modifications de la configuration, il convient d'apporter la preuve qu'elles n'affectent pas la fidélité ni la précision au-delà des limites acceptables.

**4.2.4** Il convient de noter soigneusement et de consigner dans le rapport toutes les caractéristiques des produits laitiers analysés et de la (des) configuration(s) de la méthode alternative évaluée.

## 5 Protocole technique de validation

### 5.1 Déroulement des opérations

Quelle que soit la méthode alternative, un processus type de mesure peut être représenté par le schéma de la Figure A.1. Chaque étape correspond à une source d'erreur susceptible de contribuer à la précision globale de la méthode (élément de la décomposition de la précision globale). Le protocole d'évaluation et les modèles expérimentaux sont conçus pour s'adapter à la séquence de traitement du signal et permettre de vérifier qu'ils sont configurés de sorte que la fidélité et la précision de la méthode puissent finalement respecter les limites spécifiées.

Chaque étape de l'évaluation décrite dans les paragraphes suivants doit respecter des limites appropriées pour chaque critère d'analyse avant de lancer l'étape suivante.

La première partie du protocole (5.2.2) est obligatoire car elle définit la séquence minimale d'évaluation devant être réalisée.

Une seconde partie (5.2.3) donne des indications pour la fourniture d'informations complémentaires destinées à de futurs utilisateurs.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 5.2 Étude comparative des méthodes ISO 8196-3:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0136cd5-68ba-45ef-bb84-b850d07e2376/iso-8196-3-2009>

#### 5.2.1 Généralités

La présente partie spécifie les éléments devant obligatoirement être évalués.

L'évaluation doit être effectuée à partir de résultats d'essai exprimés dans les unités normalisées de la méthode de référence. Pour les méthodes couvrant des gammes de valeurs de mesurande étendues (c'est-à-dire supérieures à 1 unité logarithmique), il est recommandé de fractionner la gamme en segments couvrant un intervalle maximal de 1 unité logarithmique de manière à obtenir au moins trois segments et à réaliser les calculs statistiques séparément sur chaque segment.

**NOTE** Par exemple, en ce qui concerne la matière grasse contenue dans un lait du commerce, il est possible de faire la distinction entre le lait écrémé, le lait demi-écrémé et le lait entier. En ce qui concerne le lait cru, les gammes naturelles de concentration en matière grasse et en protéines sont souvent liées aux espèces qui doivent alors être évaluées séparément (4.2). Dans le lait cru, les cellules somatiques couvrent généralement une gamme de plusieurs unités logarithmiques.

En ce qui concerne les méthodes pour lesquelles la fidélité et la précision s'avèrent proportionnelles à la valeur du mesurande, une transformation appropriée des valeurs brutes doit être appliquée.

Il convient que les résultats de l'évaluation soient conformes aux spécifications indiquées dans les paragraphes suivants. Dans le cadre de l'industrie laitière, les limites relatives aux différentes caractéristiques analytiques mentionnées ont été extraites ou déduites des normes existantes.

L'Annexe B résume ces limites pour la matière grasse, les protéines (protéine brute, protéine vraie et caséine), le lactose, l'urée et les cellules somatiques.

**NOTE** En ce qui concerne le lait liquide prélevé au cours de la traite ou de la transformation, les critères d'évaluation peuvent être différents pour les systèmes d'analyse directe/en ligne et les systèmes d'analyse hors ligne à côté de la chaîne de production.

## 5.2.2 Évaluations obligatoires pour la validation

### 5.2.2.1 Évaluation des réglages préliminaires de l'appareil

Avant de commencer toute autre évaluation, il est nécessaire de vérifier les critères fondamentaux indiquant un fonctionnement correct de la méthode ou de l'appareil. Ces critères sont la fidélité journalière (y compris la répétabilité et la stabilité à court terme), la contamination et la linéarité.

#### 5.2.2.1.1 Fidélité journalière (répétabilité et stabilité à court terme)

Fondamentalement, il convient que la méthode utilisée présente une stabilité du signal de mesure qui soit conforme aux exigences de fidélité. Si ce n'est pas le cas, soit l'appareil d'analyse ne fonctionne pas correctement (et il convient alors de ne pas l'utiliser), soit sa fidélité n'est pas adaptée à l'objectif de l'analyse. Par conséquent, la stabilité instantanée (répétabilité) et la stabilité du niveau du signal doivent être évaluées avant toute autre caractéristique.

#### EXEMPLE 1

Il convient d'évaluer la fidélité à trois niveaux de concentration différents du constituant mesuré, à savoir faible, moyen et élevé. Pour cela, il convient de fractionner trois échantillons de lait différents en autant de sous-échantillons identiques que requis pour les analyses.

Au cours de la journée, analyser, pour chaque niveau, le même échantillon de lait en triple ( $n = 3$ ) à l'aide de l'appareil toutes les 15 min ou 20 min sans modifier le réglage du calibrage afin d'obtenir au moins une série de 20 contre-essais ( $q \geq 20$ ). Il est préférable que l'appareil soit utilisé dans des conditions proches des conditions de routine. Il convient de traiter un nombre d'échantillons suffisant pour maintenir l'appareil en fonctionnement entre les contrôles périodiques.

En utilisant une analyse de variance à un facteur (ANOVA), estimer l'écart-type de répétabilité,  $s_r$ , l'écart-type entre les séries de contrôle,  $s_c$ , et l'écart-type de reproductibilité journalière,  $s_R$ , ou, de manière équivalente, conformément à ce qui suit:

Pour chaque contrôle,  $j$  ( $j = 1 \dots q$ ), calculer la moyenne,  $\bar{x}_j$ , et l'écart-type,  $s_{rj}$ , de la série de mesure,  $x_{ij}$ , de la manière suivante:

$$\bar{x}_j = \sum x_{ij} / n$$

et l'écart-type

$$s_{rj} = \left[ \sum (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 / (n - 1) \right]^{1/2}$$

des répétitions.

Pour la totalité de la séquence de contrôle, calculer:

- a) l'écart-type de répétabilité:  $s_r = \left( \sum s_{rj}^2 / q \right)^{1/2}$
- b) l'écart-type des moyennes:  $s_{\bar{x}} = \left[ \sum (\bar{x}_j - \bar{x})^2 / (q - 1) \right]^{1/2} = \left\{ \left[ \sum \bar{x}_j^2 - (\sum \bar{x}_j)^2 / q \right] / (q - 1) \right\}^{1/2}$   
 avec

$$\bar{x} = \sum \bar{x}_j / q$$

- c) l'écart-type entre contrôles:  $s_c = (s_{\bar{x}}^2 - s_r^2 / n)^{1/2}$  avec  $s_c = 0$  si  $s_c < 0$

- d) l'écart-type de reproductibilité journalière:  $s_R = (s_c^2 + s_r^2)^{1/2}$

EXEMPLE 2 Il convient que les valeurs de  $s_r$  et  $s_R$  obtenues respectent les limites spécifiées dans l'Annexe B.

La stabilité de la réponse de la méthode durant la séquence des contrôles peut être visualisée en reportant sur un axe de coordonnées les résultats et moyennes de mesure,  $y$ , par rapport aux numéros de séquence de contrôle,  $x$ .

La signification de tout écart ou fluctuation éventuels observés peut être vérifiée par le test  $F$  d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA) ou, de manière équivalente, en calculant la valeur  $F$  observée,  $F_{\text{obs}}$ :

$$F_{\text{obs}} = ns_{\bar{x}}^2 / s_r^2$$

L'essai est significatif si  $F_{\text{obs}} > F_{1-\alpha}$  avec  $k_1 = q - 1$ ,  $k_2 = q(n - 1)$ , et  $\alpha = 0,05$ .

### 5.2.2.1.2 Effet de contamination

**5.2.2.1.2.1** De fortes différences entre les teneurs en constituants de deux échantillons analysés successivement peuvent influencer sur les résultats du dernier.

Cela peut se produire en cas de rinçage incomplet du système de circulation et de la cellule de mesure par la circulation de liquide et en cas de contamination avec le dispositif d'agitation. Une correction automatique des résultats est acceptable dans certaines limites dans la mesure où il peut être prouvé qu'il y a un transfert systématique d'une petite quantité de matière d'un mesurage au suivant.

Les analyseurs automatiques de liquides permettent souvent d'appliquer des corrections automatiques pour compenser, si nécessaire, l'effet de contamination global. Il est nécessaire de faire clairement la distinction entre contamination et efficacité du rinçage.

**5.2.2.1.2.2** Il convient d'évaluer l'effet de contamination global, y compris les facteurs de correction qui sont soit déterminés par l'appareil, soit obtenus à l'aide de la méthode indiquée par le fabricant. Il convient qu'il ne dépasse pas les valeurs indiquées pour chaque constituant.

**NOTE** Les limites sont définies en partant de la condition préalable qu'il convient que l'effet de contamination ne produise pas une erreur supérieure à la répétabilité de la méthode. Par conséquent, il convient que les limites pour le taux de contamination, (COR),  $L_C$ , satisfassent à la condition  $L_C \leq (r/\Delta L_{\text{range}}) \times 100$ , où  $r$  est la limite de répétabilité au niveau du biais mesuré et  $\Delta L_{\text{range}}$  représentant la différence entre la concentration maximale et la concentration minimale dans la gamme de concentration considérée. Pour les constituants pour lesquels la répétabilité n'est pas constante sur toute l'étendue de mesure, les limites COR sont déterminées sur la base de  $r$  pour les niveaux ayant la meilleure répétabilité (par exemple numération des cellules somatiques). Les limites courantes pour COR sont comprises entre 1 % et 2 %.

**5.2.2.1.2.3** L'efficacité du rinçage du système de circulation doit être évaluée séparément par des essais de fonctionnement sans correction (facteur de correction réglé à zéro) en mode manuel (en court-circuitant l'agitateur automatique). Il convient que l'efficacité du rinçage ne soit pas inférieure à 99 % ou que la contamination interne ne soit pas supérieure à 1 %.

**5.2.2.1.2.4** Analyser deux échantillons, à basse et à haute concentrations, respectivement, avant répartition en séries de prises d'essai. Répétez autant de fois,  $N_C$ , que nécessaire (voir ci-dessous), la séquence d'analyse en terme de concentration en composant, basse, basse, haute, haute, afin d'obtenir des ensembles  $N_C$  de résultats  $L_{L_1}$ ,  $L_{L_2}$ ,  $L_{H_1}$ ,  $L_{H_2}$ . Il convient que le nombre minimal de répétitions de séquence,  $N_C$ , soit de 20.

Un nombre suffisant est recommandé pour réduire l'incertitude relative de l'estimation de COR,  $\delta_{\text{rel}}$ , et rendre possible une nette différenciation de zéro. Une incertitude relative de l'ordre de 20 % ou moins est recherchée. Le nombre de séquences adéquat peut être obtenu par  $N_C \geq (100/\delta_{\text{rel}})^2$ . Une augmentation de ce nombre de séquences doit être envisagée, dans le cas particulier d'une estimation du COR pour le réglage d'un facteur de correction.

**NOTE** En ce qui concerne les constituants pour lesquels la répétabilité n'est pas constante sur l'étendue de mesure et pour les niveaux ayant une forte répétabilité, un nombre de séquences plus élevé peut être exigé. Un nombre de séquences alternatives peut être calculé par  $N_C \geq [r \times 100 / (L_C \Delta L_{\text{test}})]^2$  où  $\Delta L_{\text{test}}$  est la gamme de concentration entre les échantillons à concentration élevée et faible (supérieure ou égale à  $\Delta L_{\text{range}}$ ).

**5.2.2.1.2.5** Exigences relatives à la méthode pour les échantillons: Préparer un nombre suffisant de sous-échantillons de chaque échantillon de laboratoire à concentration élevée et faible avant l'analyse afin que chaque sous-échantillon ne soit analysé qu'une seule fois. Il est préférable que les échantillons de laboratoire à concentration élevée et faible soient de préférence des laits ou des produits laitiers dont la viscosité est similaire à celle des échantillons de routine.

Les concentrations respectives en constituant doivent différer considérablement. Pour le lait, il est possible, par exemple, d'utiliser une séparation naturelle (écrémage pour la matière grasse), une séparation artificielle (ultrafiltration pour les protéines, microfiltration pour les cellules somatiques) ou une addition (lactose et urée).

Pour les dosages biochimiques des constituants, il est préférable que les échantillons de laboratoire à concentration élevée et faible soient des valeurs extrêmes dans l'étendue de mesure.

NOTE Des gammes suffisamment étendues sont recommandées pour différencier facilement les effets de contamination d'une erreur aléatoire. La gamme minimale requise,  $\Delta L_{\text{test}} = L_H - L_L$ , peut être calculée selon  $\Delta L_{\text{test}} \geq r \times 100 / (L_C \sqrt{N_C})$  où  $r$  et  $L_C$  sont les limites indiquées et  $N_C$  est le nombre de séquences appliqué (voir Annexe B).

Pour un constituant du lait ou des critères couvrant de vastes gammes de concentration, par exemple une échelle de  $3 \log_{10}$  ou plus, le rapport entre l'erreur due à la contamination peut ne pas être constant dans la totalité de la gamme. Il convient de le vérifier en évaluant la contamination à différentes concentrations.

Dans ce cas, il est recommandé de choisir un niveau  $L_{Hi}$  situé au milieu de chaque partie,  $i$ , préalablement définie dans la totalité de la gamme. Un nombre minimal de deux niveaux pour les concentrations moyenne et élevée sont requis, et le nombre peut être porté à trois pour des gammes étendues particulières.

EXEMPLE Pour la numération des cellules somatiques dans le lait d'un animal individuel, il est recommandé de définir trois niveaux à environ  $500 \times 10^3$  cellules/ml,  $1\ 000 \times 10^3$  cellules/ml et  $1\ 500 \times 10^3$  cellules/ml.

**5.2.2.1.2.6** Calcul: Calculer la moyenne et les écarts-types des différences  $d_{L_{Li}} = L_{L_{1i}} - L_{L_{2i}}$  et  $d_{L_{Hi}} = L_{H_{2i}} - L_{H_{1i}}$ , respectivement  $\bar{d}_{L_L}, s_{L_L}, \bar{d}_{L_H}, s_{L_H}$  et la différence moyenne de concentration  $\bar{d}_\rho = \bar{L}_{H_2} - \bar{L}_{L_2}$ .

(standards.iteh.ai)

Calculer ensuite les taux de contamination, CORs,  $C$ , et leurs écarts-types,  $s_C$ , en utilisant les équations suivantes:

$$C_{H/L} = \bar{d}_{L_L} \times 100 / \bar{d}_\rho \quad \text{et} \quad s_{C_{H/L}} = s_{d_{L_L}} \times 100 / \bar{d}_\rho \sqrt{N_C}$$

$$C_{L/H} = \bar{d}_{L_H} \times 100 / \bar{d}_\rho \quad \text{et} \quad s_{C_{L/H}} = s_{d_{L_H}} \times 100 / \bar{d}_\rho \sqrt{N_C}$$

Le COR peut également être obtenu en utilisant les formules équivalentes suivantes:

$$C_{H/L} = (\sum L_{L_1} - \sum L_{L_2}) \times 100 / (\sum L_{H_2} - \sum L_{L_2}) = (\bar{L}_{L_1} - \bar{L}_{L_2}) \times 100 / (\bar{L}_{H_2} - \bar{L}_{L_2})$$

$$C_{L/H} = (\sum L_{H_2} - \sum L_{H_1}) \times 100 / (\sum L_{H_2} - \sum L_{L_2}) = (\bar{L}_{H_2} - \bar{L}_{H_1}) \times 100 / (\bar{L}_{H_2} - \bar{L}_{L_2})$$

Il convient que les deux valeurs obtenues pour COR ne diffèrent pas l'une de l'autre de manière significative et ne dépassent pas la limite,  $L_C$ , dans la condition d'essai indiquée pour le constituant dans l'Annexe B.

Cela doit être vérifié en contrôlant que les équations suivantes sont respectées:

$$C_{H/L} - C_{L/H} \geq t_{1-\alpha/2} \left[ s_{C_{H/L}}^2 + s_{C_{L/H}}^2 \right]^{1/2}$$

$$C_{H/L} \leq L_C - t_{1-\alpha} s_{C_{H/L}}$$

$$C_{L/H} \leq L_C - t_{1-\alpha} s_{C_{L/H}}$$

avec  $\alpha = 0,05$ .

### 5.2.2.1.3 Linéarité

**5.2.2.1.3.1 Généralités.** Selon la définition classique d'une méthode indirecte, il convient que le signal transmis par l'appareil découle d'une caractéristique du constituant mesuré et permette, par conséquent, de définir une relation simple avec la concentration du constituant.

La linéarité exprime la constance du rapport entre l'augmentation de la concentration d'un constituant du lait et l'augmentation correspondante du résultat de la méthode alternative. Par conséquent, la linéarité du signal de mesure est, dans la plupart des cas, essentielle pour maintenir une sensibilité constante sur l'étendue de mesure et faciliter les opérations de calibrage et d'ajustement. Par ailleurs, elle permet en routine (dans une certaine mesure) des mesurages au-delà de la gamme de calibrage par une extrapolation linéaire.

NOTE Actuellement, les méthodes alternatives sont fréquemment basées sur des signaux multiples en utilisant une approche multivariée. Pour ces méthodes, en particulier pour les exemples impliquant des variations relativement faibles de la matrice de l'échantillon et des signaux de faible spécificité, l'évaluation de la linéarité peut s'avérer difficile en raison d'une erreur aléatoire élevée (faible rapport signal/bruit). Dans ce cas, étant donné que l'erreur de linéarité sera contenue dans la composante de précision globale, l'évaluation de la linéarité peut être omise dans la mesure où elle est prise en compte dans l'étape ultérieure d'évaluation de la précision.

La méthode est spécifiée de 5.2.2.1.3.2 à 5.2.2.1.3.4.

**5.2.2.1.3.2 Échantillons.** La linéarité peut être évaluée en utilisant des séries de 8 à 15 échantillons ayant des concentrations de constituant uniformément réparties sur l'étendue de mesure.

- a) Il convient de préférence que les échantillons soient des laits ou des liquides ayant des caractéristiques physiques similaires (c'est-à-dire, masse volumique, viscosité), par exemple en combinant (pesant) un échantillon à haute teneur,  $L_H$ , et un échantillon à faible teneur,  $L_L$ .
- b) Il convient que les concentrations varient dans des intervalles réguliers. Selon le constituant, il est possible pour cela d'utiliser, par exemple, une séparation naturelle (écrémage pour la matière grasse), une séparation artificielle (ultrafiltration pour les protéines, microfiltration pour les cellules somatiques) et une recombinaison, ou d'utiliser des solutions pures (lactose et urée).
- c) Il convient que la gamme d'évaluation de la linéarité soit en accord avec la gamme de concentration pour l'étude de validation (voir Annexe B).
- d) Les valeurs de référence relatives aux échantillons de linéarité peuvent être déterminées soit à partir du rapport de mélange, soit des concentrations théoriques telles que calculées à partir des concentrations des échantillons initiaux. Selon la méthode alternative, il convient qu'elles soient obtenues à partir des rapports de mélange en volume lorsque l'analyse est réalisée sur un volume de lait (mesure volumétrique du prélèvement) et des rapports de mélange en masse lorsque l'analyse est appliquée à une portion pesée de lait (voir Annexe E).

**5.2.2.1.3.3 Analyses.** Analyser chaque échantillon, tout d'abord dans l'ordre des concentrations croissantes sur  $N_L/2$  répétitions, puis dans l'ordre des concentrations décroissantes sur  $N_L/2$  répétitions, de manière à obtenir le nombre total de répétitions pertinent pour le mesurande (voir Annexe B).

**5.2.2.1.3.4 Calcul et évaluation.** Calculer l'équation de régression linéaire  $y = bx + a$  ( $y$  = appareil,  $x$  = référence) et les résidus  $e_i$  ( $e_i = y_i - bx_i - a$ ) à partir des moyennes des répétitions et de la référence théorique.

Enregistrer, sur un graphique, les résidus,  $e_i$ , en ordonnée en fonction des concentrations théoriques en abscisse. Un examen visuel des points de données fournira généralement une information suffisante sur la linéarité du signal.

Tout écart par rapport à la linéarité ou toute tendance évidente dans les données de ce tracé indique un problème potentiel et il convient qu'il conduise à une étude plus approfondie de la méthode, comme décrit ci-après de manière détaillée.

Il convient que tout résidu manifestement situé en dehors de la distribution normale (valeur aberrante) conduise à une suppression du résultat associé et à un renouvellement du processus de calcul avant de procéder aux autres tests.

Calculer le biais relatif de la linéarité par le rapport de la gamme résiduelle à la gamme des valeurs du signal:

$$\frac{\Delta e}{\Delta \rho} = \frac{e_{\max} - e_{\min}}{\rho_{\max} - \rho_{\min}}$$

où

- $e_{\max}$  est la valeur numérique du résidu le plus élevé;
- $e_{\min}$  est la valeur numérique du résidu le plus faible;
- $\rho_{\max}$  est la valeur numérique supérieure mesurée par l'appareil;
- $\rho_{\min}$  est la valeur numérique inférieure mesurée par l'appareil.

NOTE 1 Les limites sont définies en partant de la condition préalable qu'il convient que l'écart par rapport à la linéarité ne produise pas une erreur supérieure à la répétabilité de la méthode sur l'étendue de mesure courante. Par conséquent, les limites du biais relatif de linéarité,  $L_{\Delta e/\Delta L}$  sont censées satisfaire l'équation  $L_{\Delta e/\Delta L} \leq r/\Delta L_{\text{range}}$  pour la répétabilité supérieure acceptable,  $r$  étant la limite de répétabilité et  $\Delta L_{\text{range}}$  la différence entre la concentration maximale et la concentration minimale dans la gamme de concentration considérée. Pour les constituants pour lesquels la répétabilité n'est pas constante sur toute l'étendue de mesure, les limites du biais relatif de linéarité sont déterminées sur la base des niveaux ayant la répétabilité la plus élevée (par exemple, numération des cellules somatiques). Les limites courantes pour  $\Delta e/\Delta L_{\text{range}}$  sont comprises entre 0,01 et 0,02.

NOTE 2 Le nombre de répétitions requis pour garantir une valeur significative de l'essai  $\Delta e/\Delta L$  peut être estimé par la condition  $N_L \geq 8 \sigma_r^2 / (L_{\Delta e/\Delta L}^2 \Delta L_{\text{test}}^2)$  ou  $N_L \geq r^2 / (L_{\Delta e/\Delta L}^2 \Delta L_{\text{test}}^2)$ .

NOTE 3 Des gammes de concentration,  $\Delta L_{\text{test}}$ , plus étendues permettent de mesurer un biais de linéarité plus important,  $\Delta e$ , avec un même biais relatif de linéarité et une signification accrue pour une même valeur de répétabilité maximale. La gamme minimale de concentration peut être estimée à l'aide des conditions:  $\Delta L_{\text{test}} \geq 2\sqrt{2} \sigma_r / (L_{\Delta e/\Delta L_{\text{test}}} \sqrt{N_L})$  ou  $\Delta L_{\text{test}} \geq r / (L_{\Delta e/\Delta L} \sqrt{N_L})$ .

Une analyse de variance à un facteur peut être réalisée pour confirmer la signification statistique de la non linéarité. Des tests statistiques de comparaison des variances peuvent être employés pour confirmer la signification de la différence entre les variances résiduelles.

Par ailleurs, les tendances de non-linéarité peuvent, si nécessaire, être approchées par des polynômes de second et de troisième degrés, et les tests statistiques  $\Delta e/\Delta L$  et tests  $F$  utilisés pour choisir et évaluer l'équation permettant d'obtenir le meilleur ajustement de la linéarité.

Des exemples sont donnés dans l'Annexe D.

#### 5.2.2.1.4 Limites de mesure

Des limites de mesure par une méthode instrumentale existent aux deux extrémités de la gamme analytique, par exemple une limite inférieure et une limite supérieure.

Il n'est pas exigé de déterminer ces limites lorsque les gammes de concentration naturelle pour les constituants et espèces respectifs sont normalement distantes de zéro (ce qui est généralement le cas pour les constituants biochimiques, c'est-à-dire matière grasse, protéine, lactose, urée) et situées dans la gamme de linéarité de la méthode.

L'évaluation des limites de mesure peut être effectuée conjointement à l'évaluation de la linéarité. Lorsque la linéarité n'est pas réalisée sur la totalité de la gamme de concentration, il est nécessaire de déterminer le champ d'application réel de la méthode concernée.