
**Молоко. Подсчет бактерий. Протокол
для оценивания альтернативных
методов**

*Milk — Bacterial count — Protocol for the evaluation of alternative
methods*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16297:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be5d4607-8533-4da5-806b-f879dcf24e29/iso-16297-2013>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочные номера
ISO 16297:2013(R)
IDF 161:2013(R)

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 16297:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be5d4607-8533-4da5-806b-f879dcf24e29/iso-16297-2013>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO/IDF 2013

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

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

International Dairy Federation
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B • B-1030 Brussels
Tel. + 32 2 733 98 88
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail info@fil-idf.org
Web www.fil-idf.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие.....	iv
Введение	vi
1 Область применения.....	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения.....	1
4 Преобразование результатов	1
5 Характеристики альтернативного метода.....	2
5.1 Описание метода, который будет оцениваться.....	2
5.2 Диапазон измерений	2
5.3 Перенос.....	4
5.4 Стабильность.....	5
5.5 Прецизионность.....	6
6 Альтернативный метод как оценка стандартного метода	7
6.1 Определение факторов, влияющих на эту оценку	7
6.2 Протокол измерения.....	7
6.3 Вычисления	7
6.4 Характеристики альтернативного метода, выраженные в единицах стандартного метода.....	10
7 Оценка детально разработанных характеристик.....	10
Приложение (информативное) Выражение параметров прецизионности.....	11
Библиография	13

ISO 16297:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be5d4607-8533-4da5-806b-f879dcf24e29/iso-16297-2013>

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Главная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Обращается внимание на возможность того, что некоторые элементы данного международного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав.

ISO 16297|IDF 161 был разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной молочной федерацией (IDF). Он публикуется совместно ISO и IDF.

[ISO 16297:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be5d4607-8533-4da5-806b-f879dcf24e29/iso-16297-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be5d4607-8533-4da5-806b-f879dcf24e29/iso-16297-2013>

Предисловие

Международная молочная федерация (IDF) является некоммерческой организацией, представляющей молочный сектор в мировой экономике. Членами IDF являются национальные комитеты в каждой стране-члене, а также региональные молочные ассоциации, подписавшие официальное соглашение о сотрудничестве с IDF. Все члены IDF имеют право быть представленными в постоянных комитетах IDF, выполняющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO в разработке стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Главной задачей постоянных комитетов является разработка международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые рабочими группами и постоянными комитетами, рассылаются национальным комитетам на голосование. Для их опубликования в качестве международных стандартов требуется одобрение не менее 50% национальных комитетов IDF, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. IDF не несет ответственности за идентификацию какого-либо одного или всех таких патентных прав.

ISO 16297|IDF 161 был разработан Международной молочной федерацией (IDF) и Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*. Он публикуется совместно IDF и ISO.

Вся работа была проведена Совместной проектной группой ISO-IDF (S07) Постоянного комитета по *Статистике и автоматизации* под эгидой руководителя проекта госпожи. I. Andersson (Швеция).

Настоящее первое издание ISO 16297|IDF 161a отменяет и заменяет IDF 161A:1995, которое было технически пересмотрено.

Введение

Требованием любого количественного измерения в микробиологии является рассмотрение микробиологического состояния в пробе как одной точки в координатах многомерной системы, которая будет проецироваться на одномерную шкалу применяемого метода, т.е. чашечного подсчета, проточной цитометрии. Такие аспекты, как флора (типы и количества микроорганизмов и их распределение), фаза роста, сублетальное повреждение, метаболическая активность и предыстория, влияют в большей или меньшей степени на любой измеряемый параметр. Очевидно, что любое проецирование n -мерной ситуации на одномерную шкалу дает весьма ограниченную картину реальной ситуации. В этом отношении приходится принимать неизбежный результат, независимо от того, какой метод измерения предпочитается.

Термин стандартный (официальный или опорный) метод в этом международном стандарте означает метод, международно признанный экспертами, используемый в законодательстве или по договоренности между сторонами. Альтернативный метод согласно требованиям для его оценивания должен ссылаться на стандартный метод и быть основан на исследовании подходящих образцов для целевого использования.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16297:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be5d4607-8533-4da5-806b-f879dcf24e29/iso-16297-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be5d4607-8533-4da5-806b-f879dcf24e29/iso-16297-2013>

Молоко. Подсчет бактерий. Протокол для оценивания альтернативных методов

1 Область применения

Настоящий международный стандарт дает руководящие указания относительно оценивания инструментальных альтернативных методов для определения общего количества бактерий в сыром молоке от животных различных видов.

ПРИМЕЧАНИЕ Этот документ является дополнением к ISO 16140 и ISO 8196|IDF 128 (см. Раздел 2 и ссылку [1]).

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 5725-1, *Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения*

ISO 5725-2, *Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения*

ISO 8196-1|IDF 128-1, *Молоко. Определение и оценивание общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 1. Аналитические признаки альтернативных методов*

ISO 8196-2|IDF 128-2, *Молоко. Определение и оценивание общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 2. Калибровка и контроль качества в лаборатории по анализу молочной продукции*

ISO 16140-1, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод валидации. Часть 1. Словарь*

ISO 16140-2, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод валидации. Часть 2. Протокол валидации альтернативных (фирменных) методов в сравнении с эталонным методом*

ISO 21187|IDF 196:2004, *Молоко. Количественное определение бактериологического качества. Руководство по проверке и зависимости между результатами типового и базового методов*

3 Термины и определения

Применительно к этому документу используются термины и определения, данные в ISO 8196-1|IDF 128-1 и ISO 8196-2|IDF 128-2.

Для определений прецизионности, повторяемости и воспроизводимости см. ISO 5725-1, ISO 5725-2, ISO 8196-1|IDF 128-1 и ISO 16140-1.

4 Преобразование результатов

Предпосылкой для статистики, наиболее распространенной в оценке методов измерения, является приближение нормального распределения данных. Экспоненциальный рост микроорганизмов обычно ведет к распределению с правым хвостом для количественных микробиологических параметров. Таким образом, необходимо преобразование первичных данных для приближения нормальности.

Обычно это общепринятое логарифмическое преобразование или преобразование методом извлечения квадратного корня для низких количественных уровней бактерий. Наиболее подходящее преобразование можно проверять путем сравнения гистограмм. Все статистические данные затем вычисляются из преобразованных данных, если не установлено иначе, и только окончательные данные повторно преобразуют, чтобы дать пользователю более выразительное представление ситуации (см. также Приложение А).

5 Характеристики альтернативного метода

ПРИМЕЧАНИЕ Параметры, приведенные в этом разделе, не нужно полностью оценивать для каждого альтернативного метода. Например, диапазон измерений (см. 5.2) чашечного метода с петлей определяется используемой петлей.

5.1 Описание метода, который будет оцениваться

5.1.1 Описание

Описание исследуемого метода должно соответствовать контрольному списку в 5.1.2.

Большая часть информации содержится в технических условиях для данного метода, предоставляемых ответственным поставщиком или любым другим источником (автором) установленного метода.

5.1.2 Контрольный список

- a) Принцип метода.
- b) Параметр или единица.
- c) Технический проект процедуры измерения.
- d) Область применения:
 - 1) цель: например, научное исследование, тестирование, классификация молока;
 - 2) матрица: например, сырое коровье молоко.
- e) Поставщик(и) прибора, реактивов, стандартов.
- f) Технические условия метода, предоставляемые производителем или автором:
 - 1) предпосылки отбора проб и приготовления образцов (часто в сравнении с ситуацией анализа жиров);
 - 2) возможности для консервации проб [реактив(ы), условие(я) хранения];
 - 3) количественный (единицы: исследуемый метод или эталонный метод) и качественный (вид охваченных микроорганизмов) спектральный анализ;
 - 4) прецизионность (в единицах исследуемого метода или в единицах эталонного метода);
 - 5) точность оценки (в единицах эталонного метода);
 - 6) количество образцов в час;
 - 7) перечень ссылок.

5.2 Диапазон измерений

5.2.1 Нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного анализа определяется как среднее для молока без бактерий плюс n -кратное его стандартного отклонения; обычно $n = 10$. См. также ISO 16140-2.

Анализируют молоко без бактерий или с очень низкой концентрацией бактерий. Преобразуют данные, вычисляя квадратный корень из каждого результата. Вычисляют среднее, \bar{x} , и стандартное отклонение, s , преобразованных результатов. Вычисляют нижний предел количественного определения как $\bar{x} + ns$.

5.2.2 Верхний предел количественного определения

Верхний предел количественного анализа определяют посредством самого высокого показания метода или путем методологических ограничений, например эффект совпадений, неточность верхних пределов измерений, засорение фильтров. Совпадение бывает, когда два или более элементов измеряемого параметра детектируются одновременно и идентифицируются только как одна единица. Например, при поточной цитометрии, если две бактериальные клетки проходят детектор одновременно, они детектируются как одна. Эффект совпадения выше при более высоких концентрациях измеряемого параметра.

Верхний предел количественного анализа определяется как самая высокая концентрация, когда показания прибора еще линейные согласно 5.2.3.

5.2.3 Линейность приборного сигнала

Зависимость между показаниями прибора и ожидаемыми значениями должна быть линейной в диапазоне подсчета бактерий. Отклонения от линейности могут происходить от неспецифических сигналов и эффектов совпадений.

Проверку линейности сначала проводят визуально с помощью подходящих графиков, чтобы получить представление о форме зависимости. Всякий раз, когда появляется явное отклонение от линейности, вычисляют количественный параметр, чтобы показать, является ли наблюдаемый тренд приемлемым или нет.

Для достижения этого используют молоко с высоким количеством бактерий, последовательно разбавляя его молоком с низким количеством бактерий и в результате получая набор как минимум из 10 образцов, охватывающий рассматриваемый диапазон концентраций.

Измеряют все образцы не менее четырех раз и вычисляют средний результат для каждого образца. Получают измеренное значение в расчете на один образец. Используют измеренные значения для молока с высоким количеством бактерий и для молока с низким количеством бактерий, чтобы вычислить значения для промежуточных образцов из применяемых отношений концентраций. В результате получают математическое ожидание для каждого образца. Затем применяют линейную регрессию с ожидаемыми значениями в расчете на один образец, C_e , по оси x и измеренными значениями в расчете на один образец, C_{meas} , по оси y . Вычисляют остатки $\Delta C_{Li} = C_{meas, i} - (a \times C_{e, i} + b)$ регрессии. Откладывают остатки ΔC_{Li} по оси y относительно ожидаемых значений, C_e , на оси x . Визуальный контроль точек на графике обычно дает достаточно информации о линейности сигнала. Любой резко отклоняющийся остаток должен привести к исключению соответствующего результата и к возобновлению вычисления.

Искавление можно выразить отношением, r_L , используя Уравнение (1):

$$r_L = \frac{(\Delta C_{\max} - \Delta C_{\min})}{(C_{\text{meas, max}} - C_{\text{meas, min}})} \times 100 \quad (1)$$

где

ΔC_{\max}	величина максимального остатка регрессии;
ΔC_{\min}	величина минимального остатка регрессии;
$C_{\text{meas, max}}$	измеренное значение для молока с высоким количеством бактерий;
$C_{\text{meas, min}}$	измеренное значение для молока с низким количеством бактерий.

Отношение, r_L , должно быть меньше 5 %.

ПРИМЕЧАНИЕ Чтобы оценить линейность, используются необработанные данные, выраженные в единицах обычного метода без логарифмического или любого другого преобразования.

5.3 Перенос

Эффекты переноса могут возникать в аналитических системах, которые действуют непрерывно. Это происходит из-за переноса некоторой порции материала из одного испытательного образца в соседний образец или последующие образцы.

Вследствие применения механизированных процессов анализа не только соседний образец, но также образцы в последующих позициях могут испытывать различные воздействия, например от инкубационных камер с периодической циркуляцией.

Этот эффект можно проверить, анализируя последовательно молоко с высоким количеством бактерий и холостые образцы. Перенос вызывает увеличение количественных значений для холостого образца по сравнению с нормальным значением холостого образца (значение холостого образца, последовательно анализируемое после предыдущего холостого образца).

Перенос может быть выражен в процентном отношении к соответствующему предыдущему молочному образцу.

Чтобы оценить перенос с достаточной определенностью, количество образцов и количество бактерий в молочных образцах должны быть достаточно высокими. Образцы должны быть репрезентативными для обычных проб, особенно относительно срока хранения (увеличение срока хранения ведет к повышению вязкости молока и к потенциальному увеличению переноса). Один из способов проведения испытания описан в нижеприведенном примере. Детальные и теоретические аспекты и альтернативные установки для оценивания переноса даны в ISO 8196-3|IDF 128-3.^[1]

Приведенный в качестве примера способ для оценивания эффекта переноса состоит в проведении анализа как минимум для 10 наборов проб, каждый из которых включает один молочный образец с очень высоким количеством бактерий с двумя последующими холостыми образцами. В качестве холостых образцов могут применяться вода или молоко с пренебрежимо малым количеством бактерий.

(молоко, холостой образец₁, холостой образец₂)₁, (молоко, холостой образец₁, холостой образец₂)₂ ... (молоко, холостой образец₁, холостой образец₂)_n

Относительный перенос, COR, выраженный в процентах, может быть вычислен для каждого набора проб и затем усреднен:

$$COR_i = \frac{C_{b1i} - C_{b2i}}{C_{si}} \times 100 \quad (2)$$

$$COR = \frac{\sum_i COR_i}{n} \quad (3)$$

где

COR_i относительный перенос в i -том наборе проб;

C_{b1i} результат первого холостого образца в i -том наборе проб;

C_{b2i} результат второго холостого образца в i -том наборе проб;

C_{si} результат молочного образца в i -том наборе проб;

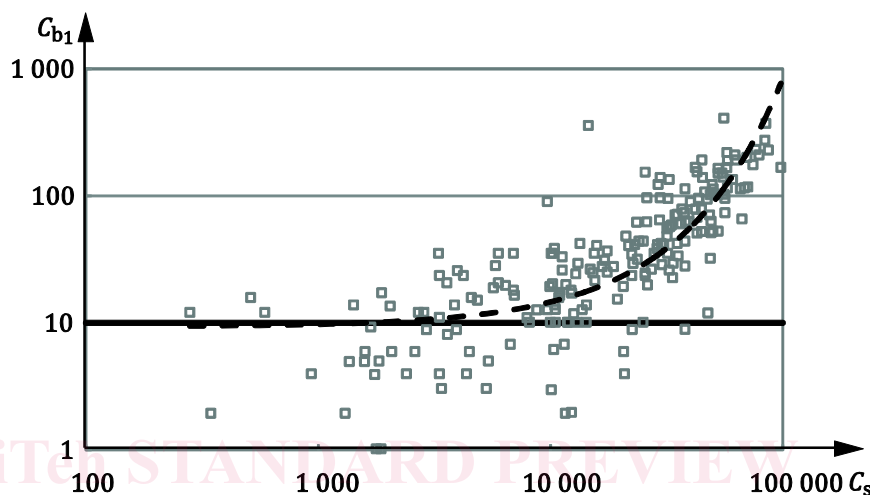
n количество наборов проб.

Даже очень низкий эффект переноса может быть значимым, если соответствующий предыдущий образец имеет очень высокий уровень концентрации бактерий по сравнению со следующим образцом. Он даже может вызвать превышение заданного предела для соседнего образца.

Перенос должен быть меньше 1 %.

Пример эффекта переноса показан на Рисунке 1. Результаты холостых растворов, анализированных непосредственно после образцов с высоким содержанием бактерий, представлены графически относительно результатов для соответствующих предшествующих молочных образцов. Из графика можно вывести уровень измерений предшествующих молочных образцов, которые могут привести к увеличению значений холостых образцов выше принятого уровня. Зависимость между значениями молочных и холостых образцов может быть аппроксимирована, например, посредством полиномиальной функции.

ПРИМЕЧАНИЕ Для оценки переноса используются необработанные данные в единицах обычного метода без логарифмического или любого другого преобразования.



Обозначение

C_{b1} общее количество бактерий в холостых растворах, анализированных непосредственно после молочного образца, в единицах/мл

C_s общее количество бактерий в молочных образцах в единицах/мл

□ результаты для отдельных наборов проб

----- линия тренда

———— перенос: 0 %

ПРИМЕЧАНИЕ Перенос в этом примере составляет 1 %.

Рисунок 1 — Пример. Эффект переноса относительно общего количества бактерий в сыром молоке

5.4 Стабильность

Важно, чтобы проверка стабильности прибора проводилась с подходящими пробами.

Для многих микробиологических методов стандартные материалы отсутствуют, или их широкое применение в полевых условиях невозможно из-за короткого срока хранения и, следовательно, ограниченной транспортабельности.

Этот недостаток можно компенсировать, используя заменитель стандартного материала или процедуру круговых испытаний. Соответствующие характеристики заменителя стандартного материала должны быть по возможности аналогичны основным свойствам компонентов и матрице, для которых проводится измерение.