

NORME
INTERNATIONALE

ISO
16297

FIL
161

Première édition
2013-06-01

Lait — Dénombrement bactérien — Protocole pour l'évaluation des méthodes alternatives

*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)

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



Numéros de référence
ISO 16297:2013(F)
FIL 161:2013(F)

© ISO et FIL 2013

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

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



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO/FIL 2013

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO ou à la FIL, à l'une ou l'autre des adresses ci-après, ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

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

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Transformation des résultats	1
5 Caractéristiques d'une méthode alternative	2
5.1 Description de la méthode à évaluer.....	2
5.2 Plage de mesure.....	2
5.3 Contamination d'un échantillon sur l'autre.....	4
5.4 Stabilité.....	6
5.5 Fidélité.....	7
6 Méthode alternative utilisée comme estimation de la méthode de référence	7
6.1 Évaluation des facteurs affectant l'estimation.....	8
6.2 Protocole d'essai.....	8
6.3 Calculs.....	8
6.4 Caractéristiques de la méthode alternative exprimées dans les unités de la méthode de référence.....	11
7 Évaluation des caractéristiques obtenues	12
Annexe A (informative) Expression des paramètres de fidélité	13
Bibliographie	15

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

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 16297|FIL 161 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 du lait (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

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>

Avant-propos

La **FIL (Fédération internationale du lait)** 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 du lait et des produits laitiers.

La tâche principale des comités permanents est d'élaborer des Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités permanents sont soumis aux comités nationaux pour approbation avant publication en tant que Norme internationale. La publication comme Norme internationale 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 16297|FIL 161 a été élaborée par la Fédération internationale du lait (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 (S07) du comité permanent chargé des *Statistiques et l'automatisation*, sous la conduite de son chef de projet, Mme. I. Andersson (SE).

Cette première édition de l'ISO 16297|FIL 161 annule et remplace la FIL 161A:1995, qui a fait l'objet d'une révision technique.

ITC STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 16297:2013

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

Introduction

En microbiologie, il convient que tout mesurage quantitatif tienne compte du fait que l'état microbiologique dans un échantillon exige d'être considéré comme un point parmi les coordonnées d'un système multidimensionnel, qui doit être projeté sur l'échelle unidimensionnelle de la méthode appliquée, c'est-à-dire le dénombrement sur boîte, la cytométrie de flux. Les aspects tels que la flore (types et nombres de micro-organismes ainsi que leur distribution), la phase de croissance, les dommages sublétaux, l'activité et l'histoire métaboliques, influencent à un degré plus ou moins élevé tout paramètre mesuré. Il est évident que toute projection d'une situation n -dimensionnelle sur une échelle unidimensionnelle est une représentation plutôt limitée de la situation réelle. À cet égard, il faut s'incliner devant l'inévitable, quelle que soit la méthode de mesure préférée.

Dans la présente Norme internationale, la méthode de référence (ou officielle ou d'ancrage) désigne une méthode internationalement reconnue par les experts, utilisée dans la législation ou dans le cadre d'un accord entre les parties. Il est exigé que l'évaluation d'une méthode alternative se réfère à la méthode de référence et repose sur l'examen d'échantillons appropriés à l'usage prévu.

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>

Lait — Dénombrement bactérien — Protocole pour l'évaluation des méthodes alternatives

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des lignes directrices pour l'évaluation de méthodes instrumentales alternatives pour le dénombrement de la flore totale dans le lait cru provenant d'animaux de différentes espèces.

NOTE La présente Norme internationale est considérée comme complémentaire à l'ISO 16140 et l'ISO 8196|FIL 128 (voir l'[Article 2](#) et la Référence [1]).

2 Références normatives

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

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

ISO 5725-2, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée*

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 16140-1, *Microbiologie des aliments - Validation des méthodes — Partie 1: Vocabulaire*

ISO 16140-2, *Microbiologie des aliments — Validation des méthodes — Partie 2: Protocole pour la validation de méthodes alternatives (brevetées) par rapport à une méthode de référence*

ISO 21187|FIL 196:2004, *Lait — Mesure quantitative de la qualité bactériologique — Lignes directrices pour établir et vérifier une relation de conversion entre les résultats de la méthode de routine et les résultats de la méthode d'ancrage*

3 Termes et définitions

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

Pour les définitions de la fidélité, de la répétabilité et de la reproductibilité, voir l'ISO 5725-1, l'ISO 5725-2, l'ISO 8196-1|FIL 128-1 et l'ISO 16140-1.

4 Transformation des résultats

Un préalable aux traitements statistiques le plus couramment utilisé en évaluation de méthodes de mesure est que la distribution des données soit assimilable à une loi normale. La multiplication exponentielle des micro-organismes entraîne généralement une distribution dissymétrique vers la droite des paramètres microbiologiques quantitatifs. Ainsi, une transformation des données brutes est en général nécessaire pour l'obtention d'une population normale. Il s'agit habituellement d'une transformation logarithmique

décimale ou d'une transformation racine carrée pour les faibles taux de bactéries. La transformation la plus adaptée peut être contrôlée en comparant les histogrammes. Sauf indication contraire, toutes les statistiques sont ensuite calculées à partir des données transformées et seuls les résultats finaux sont retransformés pour donner une idée plus réaliste de la situation à l'utilisateur (voir également l'[Annexe A](#)).

5 Caractéristiques d'une méthode alternative

NOTE Les paramètres indiqués dans le présent article n'ont pas besoin d'être évalués intégralement pour chaque méthode alternative. Par exemple, la plage de mesure (voir [5.2](#)) de la méthode de l'anse calibrée est déterminée par l'anse ou (les anses) utilisée(s).

5.1 Description de la méthode à évaluer

5.1.1 Description

La description de la méthode à l'étude doit être conforme à la liste de contrôle donnée en [5.1.2](#).

La majorité des informations figure dans la spécification de la méthode donnée par le fournisseur responsable ou par toute autre source (auteur) de la technique spécifiée.

5.1.2 Liste de contrôle

- a) Principe de la méthode.
- b) Paramètre ou unité.
- c) Conception technique du mode opératoire de mesure.
- d) Domaine d'application:
 - 1) objectif: par exemple recherche, criblage, classement du lait;
 - 2) matrice: par exemple lait cru de vaches.
- e) Fournisseur(s) de l'appareil, des réactifs, des étalons.
- f) Spécification de la méthode donnée par le producteur ou l'auteur:
 - 1) préalables à l'échantillonnage (souvent comparés au cas de l'analyse de la matière grasse);
 - 2) possibilités de conservation de l'échantillon [réactif(s), condition(s) de stockage];
 - 3) aspect quantitatif (unités: méthode à l'étude ou méthode de référence) et qualitatif (type de micro-organismes concernés) de la méthode;
 - 4) fidélité (dans les unités de la méthode à l'étude ou méthode de référence);
 - 5) précision de l'estimation (dans les unités de la méthode de référence);
 - 6) échantillons par heure;
 - 7) liste des références.

5.2 Plage de mesure

5.2.1 Limite inférieure de quantification

La limite inférieure de quantification est définie comme étant la moyenne du lait sans bactérie plus n -fois son écart-type; en général, $n = 10$. Voir également l'ISO 16140-2.

Analyser le lait sans bactérie ou ayant une très faible concentration en bactéries. Transformer les données en calculant la racine carrée à partir de chaque résultat. Calculer la moyenne, \bar{x} , et l'écart-type, s , des résultats transformés. Calculer la limite inférieure de quantification sous la forme $\bar{x} + ns$.

5.2.2 Limite supérieure de quantification

La limite supérieure de quantification est déterminée par le résultat de mesure le plus élevé permis par la méthode ou par des limites méthodologiques, par exemple les effets de coïncidence, l'imprécision dans la partie supérieure de la plage, le colmatage des filtres. La coïncidence a lieu lorsque deux éléments ou plus du mesurande sont détectés simultanément et identifiés comme étant une seule unité. Par exemple, avec la cytométrie de flux, si deux cellules bactériennes traversent en même temps le détecteur, elles sont détectées comme étant une seule unité. L'effet de coïncidence est supérieur avec des concentrations plus élevées d'un mesurande.

La limite supérieure de quantification est déterminée comme étant la concentration maximale à laquelle l'instrument reste linéaire, conformément à 5.2.3.

5.2.3 Linéarité du signal de l'appareil

La relation entre les lectures de l'instrument et les valeurs attendues doit être linéaire dans la gamme de dénombrements bactériens concernée. Tout écart à la linéarité peut provenir de signaux non spécifiques et d'effets de coïncidence.

Un contrôle de la linéarité est d'abord effectué visuellement en utilisant des graphiques appropriés pour avoir une première impression du caractère de la relation. Dès qu'un écart à la linéarité apparaît de façon évidente, un paramètre quantitatif est calculé pour indiquer si la tendance observée est acceptable ou non.

Pour cela, utiliser un lait ayant des dénombrements bactériens élevés et dilué en série avec du lait à faible dénombrement bactérien, ce qui permet d'obtenir un jeu d'au moins 10 échantillons représentant la gamme de concentration concernée. [ISO 16297:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be5d4607-8533-4da5-806b-)

Mesurer tous les échantillons au moins quatre fois et calculer le résultat moyen pour chaque échantillon. Cela donne la valeur mesurée par échantillon. Utiliser les valeurs mesurées pour le lait à dénombrement élevé et le lait à faible dénombrement pour calculer les valeurs pour les échantillons intermédiaires à partir des rapports de mélange appliqués. Cela donne une valeur attendue pour chaque échantillon. Appliquer ensuite la régression linéaire avec les valeurs attendues pour chaque échantillon, C_e , sur l'axe des abscisses et avec les valeurs mesurées pour chaque échantillon, C_{meas} , sur l'axe des ordonnées. Calculer les valeurs résiduelles $\Delta C_{1i} = C_{meas, i} - (a \times C_{e, i} + b)$ à partir de la régression. Représenter graphiquement les valeurs résiduelles ΔC_{1i} sur l'axe des ordonnées en fonction des valeurs attendues C_e sur l'axe des abscisses. En général, une observation visuelle des points de données fournit suffisamment d'informations sur la linéarité du signal. Il convient que toute valeur résiduelle aberrante entraîne la suppression du résultat associé et le renouvellement du calcul.

La courbure peut être exprimée par le rapport, r_L , à l'aide de la Formule (1):

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

où

ΔC_{max} est la valeur résiduelle maximale à partir de la régression;

ΔC_{min} est la valeur résiduelle minimale à partir de la régression;

$C_{meas, max}$ est la valeur mesurée pour le lait à dénombrement élevé;

$C_{meas, min}$ est la valeur mesurée pour le lait à faible dénombrement.

Le rapport, r_L , doit être inférieur à 5 %.

NOTE Pour évaluer la linéarité, utiliser les données brutes exprimées dans les unités de la méthode de routine sans transformation logarithmique ou autre.

5.3 Contamination d'un échantillon sur l'autre

Des effets de contamination d'un échantillon sur l'autre peuvent se produire dans les systèmes analytiques fonctionnant en continu. Ils sont la conséquence du transfert d'une certaine partie du matériau échantillonné d'un échantillon pour essai vers l'échantillon ou (les échantillons) suivant(s).

En raison de la conception d'un processus d'analyse automatisé, non seulement l'échantillon suivant, mais également les échantillons en position ultérieure peuvent être influencés, en raison des puits d'incubation à circulation périodique.

Cet effet peut être mesuré en analysant consécutivement du lait à dénombrement bactérien élevé et des blancs. La contamination d'un échantillon sur l'autre provoque une augmentation des valeurs des blancs par comparaison à la valeur normale des blancs (valeur des blancs analysés après un autre blanc).

La contamination d'un échantillon sur l'autre peut être exprimée en pourcentage de l'échantillon de lait précédent correspondant.

Pour évaluer la contamination d'un échantillon sur l'autre, il convient que le nombre d'échantillons et le dénombrement bactérien des échantillons de lait soient suffisamment élevés pour estimer la contamination d'un échantillon sur l'autre avec une certitude suffisante. Il convient que les échantillons soient représentatifs des échantillons de routine, notamment en ce qui concerne la durée de conservation (durée de conservation plus longue, ce qui donne une viscosité plus élevée du lait et une contamination d'un échantillon sur l'autre potentiellement plus élevée). L'exemple suivant décrit une manière d'effectuer l'essai. Pour les aspects détaillés et théoriques ainsi que pour les autres paramètres d'estimation de la contamination d'un échantillon sur l'autre, il est fait référence à l'ISO 8196-3|FIL 128-3[1].

À titre d'exemple, une façon d'estimer l'effet de contamination d'un échantillon sur l'autre consiste à analyser au moins dix jeux d'échantillons contenant chacun un échantillon de lait à dénombrement bactérien très élevé puis deux blancs. Les blancs peuvent être de l'eau ou du lait ayant un dénombrement bactérien négligeable.

(lait, blanc₁, blanc₂)₁, (lait, blanc₁, blanc₂)₂ ... (lait, blanc₁, blanc₂)_n

La contamination relative d'un échantillon sur l'autre, COR, exprimée en pourcentage, peut être calculée pour chaque jeu d'échantillons puis moyennée:

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

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

où

COR_i est la contamination relative d'un échantillon sur l'autre dans le $i^{\text{ème}}$ jeu d'échantillons;

C_{b_1i} est le résultat du premier blanc dans le $i^{\text{ème}}$ jeu d'échantillons;

C_{b_2i} est le résultat du deuxième blanc dans le $i^{\text{ème}}$ jeu d'échantillons;

C_{si} est le résultat de l'échantillon de lait dans le $i^{\text{ème}}$ jeu d'échantillons;

n est le nombre de jeux d'échantillons.

Même un effet de contamination d'un échantillon sur l'autre très faible peut être pertinent si l'échantillon précédent correspondant présente un niveau très élevé par rapport au suivant. Il peut même entraîner le dépassement d'une limite donnée pour le résultat de l'échantillon suivant.

La contamination d'un échantillon sur l'autre doit être inférieure à 1 %.

La [Figure 1](#) illustre un exemple d'effet de contamination d'un échantillon sur l'autre. Les résultats des blancs analysés immédiatement après des échantillons à dénombrement élevé sont représentés graphiquement en fonction des résultats des échantillons de lait précédents correspondants. D'après le graphique, il est possible de déduire le niveau de mesure des échantillons de lait précédents pouvant entraîner une augmentation des valeurs du blanc au-delà du niveau acceptable. La relation entre les valeurs de l'échantillon et du blanc peut être approximée à l'aide d'une fonction mathématique, un polynôme par exemple.

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

NOTE Pour évaluer la contamination d'un échantillon sur l'autre, utiliser les données brutes exprimées dans les unités de la méthode de routine sans transformation logarithmique ou autre.