

NORME
INTERNATIONALE

ISO
16297

FIL 161

Deuxième édition
2020-01

**Lait — Dénombrement
bactériologique — Protocole pour
l'évaluation de méthodes alternatives**

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16297:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5afe7a07-2c31-45c4-ace4-ced6b4af69f3/iso-16297-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5afe7a07-2c31-45c4-ace4-ced6b4af69f3/iso-16297-2020>



Numéros de référence
ISO 16297:2020(F)
FIL 161:2020(F)

© ISO et FIL 2020

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 16297:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5afe7a07-2c31-45c4-ace4-ced6b4af69f3/iso-16297-2020>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2020

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +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
Tél.: + 32 2 325 67 40
Fax: + 32 2 325 67 41
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 Généralités.....	2
5.2 Description de la méthode à évaluer.....	2
5.2.1 Description.....	2
5.2.2 Liste de contrôle.....	2
5.3 Plage de mesure.....	2
5.3.1 Limite inférieure de quantification.....	2
5.3.2 Limite supérieure de quantification.....	3
5.3.3 Linéarité du signal de l'appareil.....	3
5.4 Contamination entre échantillons.....	4
5.5 Stabilité.....	5
5.6 Fidélité.....	6
5.6.1 Généralités.....	6
5.6.2 Répétabilité.....	6
5.6.3 Reproductibilité.....	6
5.6.4 Évaluation des facteurs affectant les résultats.....	6
6 Méthode alternative utilisée comme estimation de la méthode d'ancrage	7
6.1 Généralités.....	7
6.2 Évaluation des facteurs affectant l'estimation.....	7
6.3 Protocole d'essai.....	7
6.4 Calculs.....	8
6.4.1 Généralités.....	8
6.4.2 Contrôle visuel d'un diagramme de dispersion.....	8
6.4.3 Valeurs aberrantes.....	8
6.4.4 Précision d'estimation et profil d'exactitude.....	9
6.5 Caractéristiques de la méthode alternative exprimées dans les unités de la méthode d'ancrage.....	10
7 Évaluation des caractéristiques obtenues	10
Bibliographie	12

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré 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). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 16297 | FIL 161:2013) qui a fait l'objet d'une révision technique en appliquant les modifications suivantes:

- le nombre d'échantillons et le calcul de la limite inférieure de quantification ont été modifiés et mis en conformité avec l'ISO 16140-2;
- un exemple d'effet de contamination entre les échantillons, donné à la [Figure 1](#), a été supprimé;
- les exigences d'évaluation de la précision d'estimation et du profil d'exactitude ont été clarifiées et mises en conformité avec l'ISO 16140-2;
- l'Annexe A (informative) a été supprimée.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

La FIL (Fédération internationale du lait) est une organisation privée à but non lucratif qui représente les intérêts des divers acteurs de la filière laitière au niveau international. Les membres de la FIL sont organisés en comités nationaux, qui sont des associations nationales composées de représentants de groupes d'intérêt nationaux dans le secteur des produits laitiers, incluant des producteurs laitiers, des acteurs de l'industrie de transformation des produits laitiers, des fournisseurs de produits laitiers, des universitaires et des représentants des gouvernements/autorités chargées du contrôle des aliments.

L'ISO et la FIL collaborent étroitement sur toutes les activités de normalisation concernant les méthodes d'analyse et d'échantillonnage du lait et des produits laitiers. Depuis 2001, l'ISO et la FIL publient conjointement leurs Normes internationales en utilisant les logos et les numéros de référence des deux organisations.

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Le présent document a été élaboré par le Comité permanent de la FIL chargé des *Statistiques et de l'automatisation* de la Fédération internationale du lait (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

L'ensemble des travaux a été confié à l'équipe d'action ISO/FIL (S18) du Comité permanent chargé des *Statistiques et l'automatisation*, sous la direction de ses cheffes de projet, Mme V. Tzeneva (NL) et Mme I. Andersson (SE).

ISO 16297:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5afe7a07-2c31-45c4-ae4-ced6b4af69f3/iso-16297-2020>

Introduction

En microbiologie, il convient que toute détermination quantitative 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 le présent document, la «méthode 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 d'ancrage et repose sur l'examen d'échantillons appropriés à l'usage prévu.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 16297:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5afe7a07-2c31-45c4-ace4-ced6b4af69f3/iso-16297-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5afe7a07-2c31-45c4-ace4-ced6b4af69f3/iso-16297-2020>

Lait — Dénombrement bactériologique — Protocole pour l'évaluation de méthodes alternatives

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie un protocole pour l'évaluation de méthodes instrumentales alternatives pour le dénombrement bactérien total dans le lait cru provenant d'animaux de différentes espèces.

NOTE Le document est complémentaire à l'ISO 16140-2 et à l'ISO 8196 | FIL 128 (toutes les parties).

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 | FIL 128 (toutes les parties), *Lait — Définition et évaluation de la précision globale des méthodes alternatives d'analyse du lait*

ISO 16140-1, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 1: Vocabulaire*

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

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et les définitions de l'ISO 5725-1, dans l'ISO 5725-2, dans l'ISO 8196-1 | FIL 128-1, dans l'ISO 8196-2 | FIL 128-2, dans l'ISO 8196-3 | FIL 128-3 et dans l'ISO 16140-1 s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

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 suive 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. 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 Référence [2]).

5 Caractéristiques d'une méthode alternative

5.1 Généralités

Pour chaque méthode alternative, seuls les paramètres pertinents mentionnés dans ce paragraphe doivent être évalués. Par exemple, la plage de mesure (voir 5.3) de la méthode de l'anse calibrée est déterminée par l'anse ou (les anses) utilisée(s) et la détermination du paramètre n'est pas pertinente.

5.2 Description de la méthode à évaluer

5.2.1 Description

La description de la méthode étudiée doit être conforme à la liste de contrôle donnée en 5.2.2.

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.

5.2.2 Liste de contrôle

- a) Principe de la méthode.
- b) Paramètre ou unité.
- c) Conception technique du mode opératoire de mesure.
- d) Domaine d'application: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5afe7a07-2c31-45c4-acc4-101901010101/iso-16297-2020>
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 et 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 étudiée ou méthode d'ancrage) et qualitatif (type de micro-organismes concernés) de la méthode;
 - 4) fidélité (dans les unités de la méthode étudiée ou de la méthode d'ancrage);
 - 5) précision d'estimation (dans les unités de la méthode d'ancrage);
 - 6) échantillons par heure;
 - 7) liste des références.

5.3 Plage de mesure

5.3.1 Limite inférieure de quantification

La limite inférieure de quantification est définie sur des échantillons de lait sans ou ayant une très faible concentration en bactéries. L'écart-type de n mesures est estimé; généralement, $n = 20$. L'écart-

type s_0 est calculé dans les unités de la méthode alternative sans transformation des données, d'après la [Formule \(1\)](#):

$$s_0 = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2} \quad (1)$$

où

n est le nombre total de prises d'essai utilisées;

y_j est le résultat non transformé de la prise d'essai j ;

\bar{y} est le résultat non transformé moyen de toutes les prises d'essai.

La limite inférieure de quantification est calculée sous la forme $L_q = 10s_0$ (voir également ISO 16140-2).

5.3.2 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 [5.3.3](#).

5.3.3 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 souhaitée. Tout écart à la linéarité peut provenir de signaux non spécifiques et d'effets de coïncidence.

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

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 une concentration bactérienne élevée et dilué en série avec du lait ayant une faible concentration bactérienne, ce qui permet d'obtenir un jeu d'au moins 10 échantillons représentant la gamme de concentration souhaitée.

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 ayant une concentration bactérienne élevée et le lait ayant une concentration bactérienne faible 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, pour chaque échantillon, les valeurs résiduelles $\Delta C_{1i} = C_{\text{meas},i} - (a \times C_{e,i} + b)$ à partir de la régression.

où

ΔC_{1i} est la valeur résiduelle calculée pour le $i^{\text{ème}}$ échantillon;

$C_{\text{meas},i}$ est la valeur mesurée pour le $i^{\text{ème}}$ échantillon;

$C_{e,i}$ est la valeur escomptée pour le $i^{\text{ème}}$ échantillon;

a est la pente de la régression linéaire;

b est l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire.

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 \(2\)](#) et en l'exprimant en pourcentage:

$$r_L = \frac{(\Delta C_{\text{max}} - \Delta C_{\text{min}})}{(C_{\text{meas,max}} - C_{\text{meas,min}})} \times 100 \quad (2)$$

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;

$C_{\text{meas,max}}$ est la valeur mesurée pour le lait ayant une concentration bactérienne élevée;

$C_{\text{meas,min}}$ est la valeur mesurée pour le lait ayant une concentration bactérienne faible.

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

5.4 Contamination entre échantillons

Des effets de contamination entre échantillons 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 le ou les échantillon(s) suivant(s).

Cet effet peut être mesuré en analysant consécutivement du lait ayant une concentration bactérienne élevée et des blancs. La contamination entre échantillons provoque une augmentation des valeurs des blancs par rapport à la gamme cible de valeurs des blancs (valeur des blancs analysés après un autre blanc).

La contamination entre échantillons peut être exprimée en pourcentage de l'échantillon de lait précédent correspondant. Pour évaluer la contamination entre échantillons, utiliser les données brutes exprimées dans les unités de la méthode alternative sans transformation logarithmique ou autre.

Pour évaluer la contamination entre échantillons, il convient que le nombre d'échantillons et le dénombrement bactérien des échantillons de lait soient suffisamment élevés pour estimer la contamination entre échantillons 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 entre échantillons 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 entre échantillons, se référer à l'ISO 8196-3 | FIL 128-3.

À titre d'exemple, une façon d'estimer l'effet de contamination croisée consiste à analyser au moins dix jeux d'échantillons contenant chacun un échantillon de lait ayant une concentration bactérienne très élevée puis deux blancs. Les blancs peuvent être du lait ayant une concentration bactérienne faible et l'échantillon élevé peut être du lait ayant une concentration bactérienne d'environ 2×10^6 ufc/ml (où ufc/ml représentent les unités formant colonies par millilitre d'échantillon de lait).

Parfois, en raison de la conception du procédé d'analyse mécanique, non seulement l'échantillon suivant mais également les échantillons ultérieurs peuvent être influencés par les échantillons ayant une concentration bactérienne élevée. Cela peut se produire, par exemple, avec des instruments ayant un système rotatif de roue d'incubation. Pour estimer l'effet de la contamination entre échantillons qui peut se produire dans chaque puits, il convient de mesurer deux tours de la roue d'incubation. Lors du deuxième cycle, il convient de s'assurer qu'un «blanc de lait» sera incubé dans un puits où, lors du précédent cycle, un échantillon de lait ayant une concentration bactérienne élevée a été incubé.

L'ordre des jeux d'échantillons à mesurer peut être le suivant:

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

La contamination entre échantillons moyenne, c , peut être calculée à partir de la contamination entre échantillon pour chaque jeu d'échantillons, c_i , à l'aide des [Formules \(3\)](#) et [\(4\)](#) et en l'exprimant en pourcentage:

$$c_i = \frac{C_{b_{1i}} - C_{b_{2i}}}{C_{si}} \times 100 \quad (3)$$

$$c = \frac{\sum_i^n C_i}{n} \quad (4)$$

où

c_i est la contamination entre échantillons dans le $i^{\text{ème}}$ jeu d'échantillons;

c est la contamination entre échantillons moyennée;

$C_{b_{1i}}$ 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 entre échantillons 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 entre échantillons doit être inférieure à 1 %.

5.5 Stabilité

Il est essentiel d'évaluer la stabilité de l'instrument tout au long de la journée de travail avec des échantillons appropriés.

Pour de nombreuses méthodes microbiologiques, les matériaux de référence ne sont pas disponibles ou leur application dans les conditions pratiques n'est pas possible, en raison de la courte durée de conservation et ainsi de leur transportabilité restreinte.