
Norme internationale



7218

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques

Microbiology — General guidance for microbiological examinations

Première édition — 1985-09-01

CDU 579.678

Réf. n° : ISO 7218-1985 (F)

Descripteurs : analyse microbiologique, micro-organisme, échantillonnage, produit alimentaire.

Prix basé sur 14 pages

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 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.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 7218 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques

0 Introduction

Lorsqu'on effectue des examens microbiologiques, il est spécialement important

- a) d'isoler ou de dénombrer seulement les micro-organismes présents dans les échantillons;
- b) que les micro-organismes ne contaminent pas l'environnement.

Pour cela il faut veiller à l'hygiène personnelle et utiliser des techniques de travail qui assurent autant que possible des conditions aseptiques.

Puisqu'il n'est possible de donner dans la présente Norme internationale que quelques exemples des précautions à prendre pendant les examens microbiologiques, la connaissance approfondie des examens microbiologiques et des micro-organismes en question est essentielle.

C'est finalement à l'analyste de juger si les manipulations sont sûres et peuvent être considérées comme étant de bonnes pratiques de laboratoire.

De nombreuses manipulations peuvent par exemple entraîner involontairement des contaminations croisées et l'analyste devrait toujours vérifier la précision des résultats donnés par sa technique.

Afin d'exécuter les examens de façon correcte, il est évidemment nécessaire de prendre certaines précautions lors de la construction et de l'installation du laboratoire. Quelques-unes de ces précautions sont mentionnées au chapitre 4.

Certaines précautions sont à prendre, non seulement pour des raisons hygiéniques, mais également pour assurer une bonne reproductibilité des résultats. Il n'est pas possible de spécifier toutes les précautions à prendre selon les circonstances, mais les dispositions principales lors de la préparation, la stérilisation et la conservation des milieux et du matériel, sont décrites au chapitre 5.

Si l'on suit les indications contenues dans la présente Norme internationale, on contribuera également à la protection de la santé du personnel. On trouvera de plus amples informations à ce sujet dans la littérature mentionnée en bibliographie, et notamment dans [1], [2] et [3].

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour la réalisation d'examens microbiologiques effectués selon des normes spécifiques.

Le but de la présente Norme internationale est d'aider à assurer la validité des examens, de s'assurer que les techniques générales utilisées pour effectuer ces examens sont les mêmes dans tous les laboratoires et de contribuer à la protection de la santé du personnel de laboratoire, en évitant les risques d'infection.

2 Référence

ISO 6887, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

3 Hygiène personnelle

Dans le domaine de l'hygiène personnelle, il faut prendre les précautions suivantes pour éviter la contamination des échantillons et des milieux de culture en particulier, mais également pour éviter des risques d'infection du personnel de laboratoire :

- Observer scrupuleusement les précautions usuelles d'hygiène. Couper court les ongles. Porter des protections pour les cheveux et la barbe si nécessaire.
- Se laver les mains à fond à l'eau chaude et au savon liquide ou en poudre avant et après les examens microbiologiques, et immédiatement après chaque passage aux toilettes. Utiliser des serviettes en papier ou en tissu à usage unique.
- Porter des vêtements de laboratoire propres, sans trous ni déchirures. Ils ne seront pas portés ailleurs.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans les laboratoires de microbiologie.
- Ne pas parler, tousser, etc. pendant l'ensemencement des boîtes et des tubes.
- Interdire au personnel présentant des infections sérieuses aux mains et au visage de réaliser des examens microbiologiques, dans le cas où ceci pourrait conduire à une contamination.

4 Installations et matériel

4.1 Zones de travail

4.1.1 La place doit être suffisante, afin de maintenir les zones de travail propres et en ordre.

On devrait compter environ 20 m² par analyste, y compris les locaux auxiliaires (pour des travaux spéciaux, par exemple pesées, centrifugation, incubation et réfrigération).

4.1.2 Des locaux spéciaux sont à prévoir pour

- a) le nettoyage de la verrerie et des autres ustensiles, et si possible la stérilisation de la verrerie utilisée et des milieux de cultures incubés;
- b) la préparation et la stérilisation des milieux;
- c) le contrôle de la stérilité de produits alimentaires, dans le cas où une hotte à flux laminaire n'est pas utilisée.

4.1.3 Une salle indépendante est à prévoir pour la préparation des échantillons, dans le cas où il y a risque de contamination croisée, par exemple pour les produits en poudre contenant un nombre élevé de micro-organismes (surtout dans le cas de matières premières).

Pour la détermination des micro-organismes pathogènes, par exemple *Salmonella*, il est vivement conseillé de prévoir une salle spéciale ou tout au moins une enceinte à cet effet, non seulement pour éviter les contaminations croisées, mais encore pour empêcher les risques d'infection du personnel.

4.1.4 Lors de l'installation d'un laboratoire, il faudrait apporter des aménagements réduisant les risques de contamination par la poussière et donc par les micro-organismes, par exemple :

- a) placards jusqu'au plafond;
- b) tables, rebords de fenêtre, réfrigérateurs, étuves, enceintes d'ensemencement installées de façon à éviter les nids à poussière et à faciliter le nettoyage; à cet effet, on peut utiliser du matériel amovible;
- c) fenêtres et portes fermant hermétiquement (pour éviter des courants d'air);
- d) vénitienes, etc., installées à l'extérieur des fenêtres;
- e) armoires fermées pour le rangement des documents utilisés lors des manipulations, des échantillons, milieux, réactifs, etc.;

NOTE — Il convient que les périodiques, les livres qui ne sont pas fréquemment utilisés soient placés dans une pièce spéciale (bureau, par exemple) située à l'extérieur de la salle d'analyse.

- f) murs, plafonds, sols et meubles à surfaces lisses, faciles à nettoyer et, si nécessaire, à désinfecter, et avec joints incurvés entre les murs et les plafonds, et entre les murs et les sols;
- g) pas de conduites d'eau traversant les locaux, à moins qu'elles ne soient enfermées hermétiquement;
- h) systèmes de ventilation à filtres pour l'air aspiré.

On peut vérifier l'efficacité des mesures prises, simplement en exposant, pendant l'examen, des boîtes de Petri ouvertes contenant un milieu gélosé (PCA). On détermine ensuite le nombre de colonies se développant après une incubation de 3 jours à 30 °C. Dans le cas où ce nombre est anormalement élevé, il faut déterminer et éliminer les causes de cette contamination excessive.

4.1.5 Lorsque l'on doit exécuter les examens en atmosphère très peu contaminée, le local doit être spécialement équipé, par exemple :

- a) de lampes UV, à utiliser en dehors des heures de travail;
- b) de hottes spéciales (à flux d'air laminaire ou complètement fermées).

Dans de tels locaux, on portera des vêtements spéciaux. Vérifier régulièrement, par exemple une fois par mois, le fonctionnement correct des lampes UV et des hottes. Contrôler fréquemment le nombre de germes dans l'air en utilisant un appareil spécial.

4.1.6 Les places de travail doivent être protégées contre l'exposition directe du soleil.

4.1.7 Veiller à ce que les tables de travail et l'appareillage restent en bon état (en effet, des fêlures dans les tables de travail peuvent accumuler des saletés qui sont une source de contamination).

4.1.8 Les locaux doivent être bien éclairés : au moins 500 lx à 1 m du sol et au moins 1 200 lx (lumière artificielle « lumière du jour ») sur les tables de travail.

4.2 Étuves et chambres-étuves

Utiliser des étuves ou des bains d'eau spéciaux lorsque la température doit être constante et précise à quelques dixièmes de degré près.

4.2.1 Les étuves doivent être bien isolées et équipées de façon adéquate avec des unités de chauffage et les étuves de grandes dimensions doivent avoir une circulation d'air forcée, afin d'être sûr que la température est partout correcte à 1 °C près.

4.2.2 La température ambiante doit toujours être plus basse que celle de l'étuve ou bien cette dernière doit être munie d'un système de refroidissement.

4.2.3 La température doit être vérifiée au moins tous les jours d'utilisation.

Dans ce but, chaque étuve doit contenir au moins un thermomètre dont le réservoir est immergé dans de la glycérine se trouvant dans un flacon fermé et un thermomètre à maxima et minima. Les grandes étuves et les chambres-étuves doivent être équipées de plusieurs thermomètres et thermomètres à maxima et minima répartis de façon convenable.

4.3 Bains d'eau

4.3.1 On doit utiliser des bains d'eau à la précision demandée.

Pour un réglage précis de la température, le bain d'eau doit être équipé d'une pompe à circulation et d'un système de réglage automatique de chauffage. L'agitation de l'eau ne doit pas provoquer la projection de gouttes.

Il doit toujours y avoir un thermomètre de précision convenable, indépendamment du système de réglage automatique.

Vérifier la température au moins chaque jour d'utilisation.

4.3.2 Afin d'éviter le développement de micro-organismes dans l'eau, nettoyer le bain d'eau régulièrement et le remplir d'eau récemment distillée ou déminéralisée. On peut également ajouter un désinfectant ou chauffer l'eau au bain d'eau, pendant quelques instants, à une température d'au moins 90 °C.

4.3.3 Afin d'éviter les contaminations,

- ne pas immerger les tubes et les flacons trop profondément;
- lorsque des bouchons en coton sont utilisés, prendre soin qu'ils ne se mouillent pas (utiliser du coton cardé).

4.3.4 Afin d'obtenir une température correcte d'incubation, veiller à ce que le niveau de liquide dans les tubes ou flacons soit en dessous du niveau du bain d'eau.

4.3.5 Procéder régulièrement à des dénombrements de micro-organismes dans l'eau.

4.4 Autoclave pour la stérilisation du matériel et des milieux de culture

L'autoclave doit avoir un thermomètre et un manomètre et doit permettre d'atteindre une température d'au moins 121 ± 1 °C.

Si l'autoclave est utilisé pour la stérilisation du matériel, il doit être muni d'un dispositif pour l'évacuation de l'air, afin d'atteindre une pression de 13,7 kPa, et dans le cas contraire, il est nécessaire de le purger de son air jusqu'à émission d'un jet continu de vapeur.

Le dispositif d'entrée de l'air doit être muni d'un filtre pour éviter la contamination par l'air lors du séchage.

4.5 Four à stériliser

Le four doit permettre de stériliser le matériel à une température de 170 à 175 °C.

5 Préparation du matériel et des milieux

5.1 Stérilisation et préparation du matériel

5.1.1 Préparation

Tout le matériel à utiliser doit être propre¹⁾

Il n'est pas nécessaire de stériliser le matériel en matière plastique déjà stérile.

Avant stérilisation, boucher les tubes à essai et les flacons avec du coton ou avec une fermeture appropriée. Boucher les pipettes avec du coton s'il existe un risque de contamination de l'échantillon (mélange par aspirations répétées) ou bien un risque d'infection de l'analyste.

Si nécessaire, placer le matériel à stériliser dans des récipients spéciaux ou l'envelopper dans du papier spécial ou une feuille d'aluminium.

5.1.2 Stérilisation

Stériliser le matériel selon l'une des méthodes suivantes:

- a) stérilisation par chaleur sèche: chauffer dans un stérilisateur à air chaud pendant au moins 1 h à 170 — 175 °C.
- b) stérilisation par chaleur humide: chauffer pendant au moins 20 min à 121 ± 1 °C dans un autoclave spécial muni d'un dispositif de séchage sous vide.

Disposer dans l'autoclave le matériel à stériliser, de façon à permettre la libre circulation de la vapeur. Avant le début de la stérilisation, faire le vide dans l'autoclave pour réduire la pression à au moins 13,7 kPa.²⁾ Stériliser comme indiqué ci-dessus. Après la stérilisation et après élimination de la vapeur, on peut par exemple, afin d'avoir un séchage parfait du matériel, faire successivement trois fois le vide pendant une durée de trois fois 3 min.

On peut utiliser des indicateurs de stérilisation dans le but de s'assurer que celle-ci a bien eu lieu (par exemple, papiers spéciaux).

5.1.3 Traitement du matériel utilisé

5.1.3.1 Stérilisation/décontamination

Il faut toujours stériliser ou décontaminer tout le matériel utilisé et les milieux incubés, même s'ils n'ont pas été employés pour la recherche de micro-organismes pathogènes.

Stériliser pendant 20 min à 121 ± 1 °C les boîtes de Petri et les tubes ou flacons contenant les géloses ou les bouillons utilisés ainsi que le matériel entré en contact avec des cultures de micro-organismes pendant les manipulations.

1) Le matériel neuf livré non stérile doit être lavé (voir lavage préconisé en 5.1.3.2).

2) Il est important de noter que la pression de stérilisation est donnée ici en valeur absolue et en kilopascals.

Laver les pipettes après les avoir retirées de la solution désinfectante [voir 7 g]) et enlever les bouchons en coton.

Les pipettes Pasteur ne doivent être utilisées qu'une seule fois.

5.1.3.2 Lavage

Ne laver le matériel qu'après sa stérilisation ou décontamination.

Vider les récipients de leur contenu.

Laver soigneusement les bouchons à l'eau chaude et la verrerie avec une solution détergente ou par passage dans une solution détergente alcaline [par exemple une solution de carbonate de sodium à 0,125 (m/m)] suivi d'un passage dans de l'acide dilué [par exemple, acide chlorhydrique, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$].

Les capsules en métal seront lavées uniquement à l'eau chaude.

Rincer tout le matériel à l'eau distillée ou déminéralisée.

5.2 Techniques générales pour la préparation et la stérilisation des milieux de culture

5.2.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou un milieu complet déshydraté. Les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les composants de base doivent être conservés dans un endroit frais, sec et à l'abri de la lumière.

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture doivent être de qualité analytique reconnue.

5.2.2 Eau distillée

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions d'essai. Si l'eau distillée est préparée à partir d'eau chlorée, neutraliser le chlore avant la distillation.

Utiliser si possible de l'eau distillée sur verre.

NOTE — L'eau déminéralisée par brassage sur résine échangeuse d'ions est souvent très chargée en micro-organismes, ainsi convient-il de ne pas utiliser ce procédé pour obtenir l'eau prête à l'emploi.

5.2.3 Préparation des milieux

Après chaque ouverture, refermer le plus rapidement possible les flacons contenant les composants de base ou les milieux de culture déshydratés, afin d'éviter toute humidification de la poudre. Ne pas les employer quand ils sont pris en masse.

Préparer les milieux de culture en suivant les indications de la Norme internationale concernée ou les indications du fabricant.

Mesurer le pH du milieu, de sorte qu'après stérilisation il soit au pH demandé. Cette mesure devrait être effectuée avec un pH-mètre. Ajuster le pH, si nécessaire¹⁾, avec une solution d'hydroxyde de sodium à 40 g/l ou une solution d'acide chlorhydrique à 36,5 g/l.

Pour les milieux liquides, répartir la quantité demandée de façon à ne rien avoir à transférer après stérilisation.

Utiliser en général 10 ml dans des tubes de dimensions 16 mm × 160 mm, ou 20 ml dans des tubes de dimensions 20 mm × 200 mm, ou des quantités plus grandes dans des tubes ou flacons appropriés, mais au maximum 500 ml par flacon. Lorsque l'on désire observer une éventuelle production de gaz, les tubes peuvent être munis d'une cloche de Durham.

La répartition des milieux de culture peut être effectuée manuellement ou à l'aide d'une seringue automatique.

Pour les géloses destinées à être coulées dans les boîtes de Petri, répartir à raison de 15 ml par tube dans des tubes à essai de dimensions 16 mm × 160 mm ou 18 mm × 180 mm ou de quantités plus grandes dans des tubes ou flacons appropriés, mais au maximum 100 ml par flacon.

NOTE — Il existe des appareillages pour préparer et répartir les milieux, dans ce cas se référer aux spécifications pour l'utilisation de l'appareil.

5.2.4 Stérilisation des milieux

Suivre les indications données dans la Norme internationale concernée (sinon suivre les instructions du fabricant); généralement la stérilisation des milieux de culture est de 15 min à 121 °C (245 kPa).

Veiller à ce que, lors de la stérilisation des milieux de culture, le temps pour atteindre la température de stérilisation et le temps nécessaire au refroidissement ne soient pas trop longs, afin d'éviter la dégradation de certains composants du milieu. Ne pas surcharger l'autoclave.

La dégradation est plus forte lors de la stérilisation d'un grand volume, pour lequel la durée de chauffage est plus longue que dans le cas d'un petit volume. Sauf indications contraires, ne pas stériliser des volumes de plus de 500 ml dans le cas des liquides ou de plus de 100 ml pour les géloses. Après la stérilisation, ne pas réduire la pression trop rapidement pour éviter que les fermetures des récipients ne soient soulevées par l'ébullition des milieux.

Comme dans le cas de la stérilisation du matériel, on peut utiliser des indicateurs de stérilisation.

Contrôler régulièrement les milieux après stérilisation, notamment leurs pH, stérilité et efficacité.

5.2.5 Conservation des milieux de culture préparés

Si les milieux de culture préparés ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécification indiquée dans la

1) Normalement les milieux de culture préparés à partir de produits déshydratés auront le pH désiré sans ajustement.

Norme internationale concernée, être conservés à l'obscurité à environ 4 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

Ne jamais utiliser des milieux qui se sont desséchés.

5.2.6 Fusion des milieux de culture gélosés et préparation des boîtes de gélose

Faire fondre le milieu de culture en le plaçant dans un bain d'eau bouillante ou selon tout autre procédé donnant des résultats identiques (par exemple, autoclave en vapeur fluante ou four à micro-ondes). Éviter de le chauffer trop longtemps en le retirant du bain d'eau dès qu'il est fondu.

Maintenir le milieu de culture en fusion jusqu'au moment de son emploi dans un bain d'eau thermostaté de 45 à 50 °C.

Ne jamais utiliser un milieu de culture à une température supérieure à 50 °C. Ne pas maintenir un milieu en surfusion plus de 4 h et ne jamais le faire refondre.

Couler la gélose dans les boîtes de façon à obtenir une épaisseur d'au moins 2 mm (par exemple pour des boîtes de 90 mm de diamètre, il faut normalement au minimum 10 ml de gélose).

En général, pour l'ensemencement du milieu gélosé en surface, sécher les boîtes, de préférence avec le couvercle enlevé (voir figure 1) et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve réglée pendant environ 30 min à 50 °C, jusqu'à disparition des gouttelettes d'eau à la surface du milieu.

Ne pas sécher davantage.

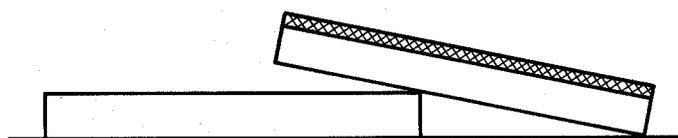


Figure 1

5.2.7 Chargement des étuves

Ne pas surcharger les étuves. Laisser au moins 25 mm entre deux piles et entre les piles et les parois ou les rayons. Chaque pile contiendra au maximum six boîtes.

6 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

Conserver le produit à échantillonner et les échantillons à examiner dans des conditions qui évitent une modification du nombre de micro-organismes présents.

Pour dénombrer des micro-organismes dans un produit liquide, on peut l'examiner tel quel ou bien examiner les dilutions de celui-ci. Pour les produits solides, il est toujours nécessaire de

préparer une solution ou suspension (suspension-mère); on examine ensuite celle-ci et/ou les dilutions de celle-ci. Dans un but de simplification, on parlera toujours d'inoculum.

Pour la préparation des dilutions, voir ISO 6887.

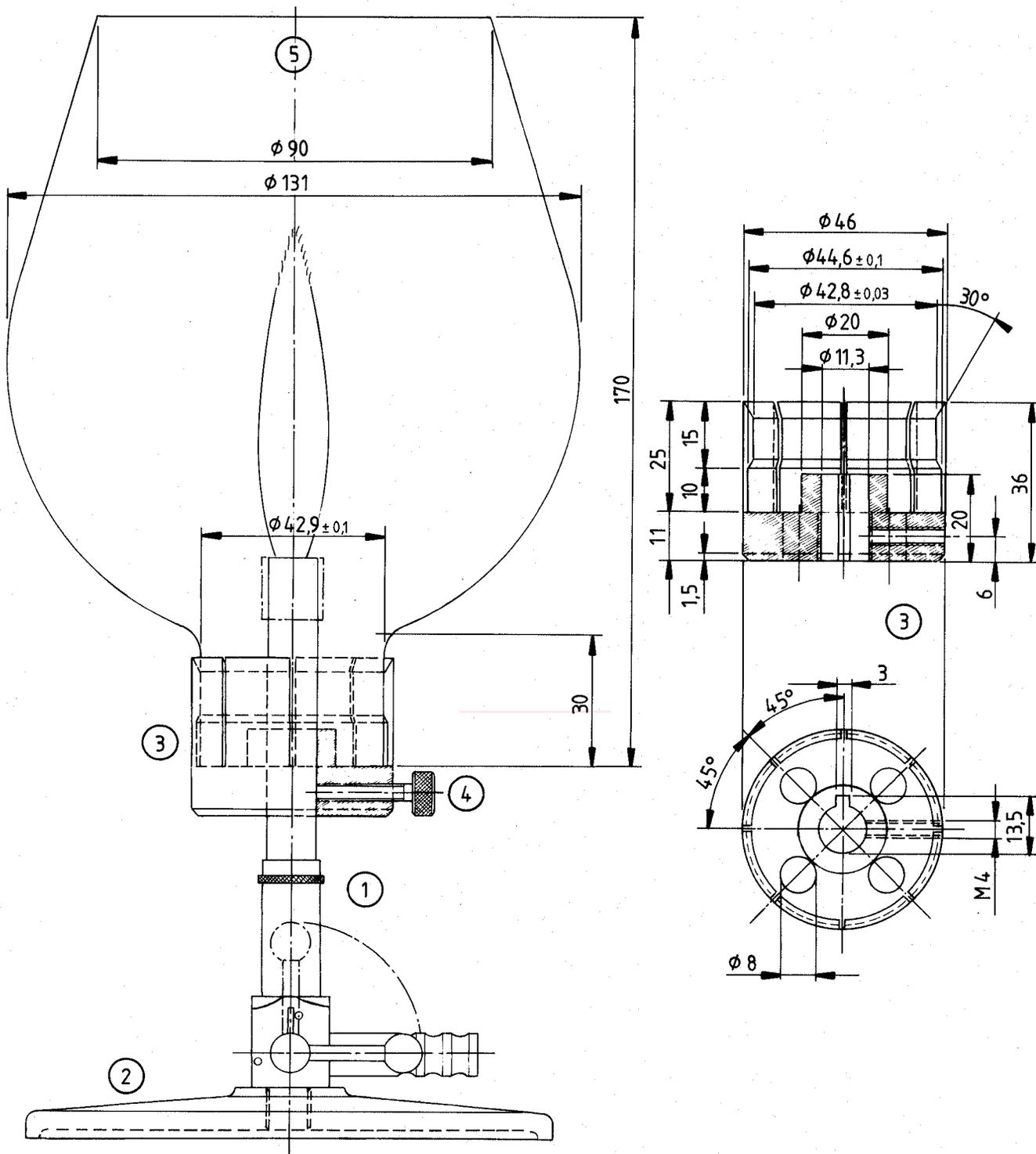
7 Précautions hygiéniques pendant l'examen

Des précautions doivent être prises pour travailler le plus possible dans des conditions aseptiques, par exemple

- a) S'assurer que la zone de travail est propre et qu'il n'y a pas de courant d'air.
- b) Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié à la fois avant et après le travail.
- c) Ouvrir les tubes à essais et les flacons à proximité d'une flamme en les tenant le plus inclinés possible.
- d) Effectuer le travail le plus rapidement possible sans faire de mouvements inutiles.
- e) Si la totalité d'un sachet de pipettes jetables, boîtes de Petri, etc. n'est pas utilisée au cours d'une opération, s'assurer que le récipient est bien fermé après avoir prélevé le nombre d'unités appropriées.
- f) Stériliser les anses et les fils à ensemercer, etc., avant et après usage à la flamme. Pour éviter des projections de matière, sécher soigneusement, au-dessus de la flamme, les anses humides avant de les stériliser. Lors de la manipulation de micro-organismes pathogènes, utiliser une cloche de protection en verre (voir figure 2) ou une autre protection [voir par exemple Barlow (1972) *Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Serv. No. 1*].
- g) Placer les pipettes, spatules, etc., utilisées dans des récipients spécifiques contenant un désinfectant (par exemple, solution d'hypochlorite de sodium) avant de les stériliser ou de les nettoyer.
- h) Placer les boîtes de Petri, milieux de culture et tout autre matériel pouvant contenir des micro-organismes, dans des récipients spécifiques.
- j) Placer le matériel en matière plastique à jeter dans des sacs en plastique, pour les brûler ou les stériliser.
- k) Sortir les livres, journaux, documents administratifs du laboratoire, milieux, réactifs, etc., juste le temps nécessaire.
- m) Enlever immédiatement tous milieux ou produits contaminés, qui auraient pu se répandre, au moyen de tampons de coton imprégnés d'éthanol à 70 % (V/V) ou d'un autre désinfectant, puis nettoyer et désinfecter la surface de travail avant de continuer.

La manipulation de produits pathogènes ou toxiques peut demander des précautions particulières décrites dans des ouvrages spécialisés. Quelques exemples sont les suivants :

- travail dans des enceintes fermées ou sous hotte à flux laminaire, notamment lors de l'ouverture des boîtes de Petri;
- utilisation de pipettes de sécurité, etc.



- ②, ③ et ④ en laiton nickelé
- ⑤ Ballon rond de 1 000 ml transformé

Figure 2 — Brûleur à gaz avec cloche de protection en verre

Le risque d'infection ou de contamination dépend du type des micro-organismes et des manipulations nécessaires pendant l'examen.

Les aérosols contaminés sont une cause importante de contamination de l'environnement et d'infection. Il faut donc éviter autant que possible la formation d'aérosols. Ils peuvent se former pendant l'ouverture des boîtes, tubes et flacons, lors de l'utilisation d'agitateurs, seringues, centrifugeuses, etc., ainsi que lorsque l'on vide des pipettes en soufflant, lors de la stérilisation d'anses ou fils à ensemercer humides. Lors de l'ouverture d'ampoules contenant des cultures lyophilisées, on peut également répandre des micro-organismes dans l'air.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Marquer les échantillons, les récipients, les sachets en matière plastique, les flacons, les tubes à essais, les boîtes de Petri, etc. de façon qu'ils puissent être facilement identifiés pendant toutes les étapes de l'examen pour éviter toute possibilité de confusion.

Manipuler les échantillons de façon à éviter tout risque de contamination. Pour cela, prendre les précautions suivantes :

- Lorsqu'il s'agit d'un produit dans un emballage, nettoyer la partie extérieure qui sera ouverte avec de l'éthanol à 70 % (V/V). Flamber si possible.
- Tout instrument servant à ouvrir un emballage (ouvre-boîte, ciseaux, etc.) doit être stérile (ces instruments doivent être stérilisés après avoir été emballés séparément dans une matière adéquate).

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension-mère et dilution

Pour éviter la contamination de l'environnement et de la prise d'essai, il est recommandé de travailler dans des locaux particuliers ou sous des hottes. À défaut, on doit toujours examiner en premier les produits contenant peu de micro-organismes, par exemple les produits pasteurisés, les plats précuisinés, puis ceux qui sont plus fortement contaminés.

La protection de l'environnement contre la pollution est particulièrement importante pour la pesée et la prise d'essai des produits pulvérulents fortement contaminés.

Pour vérifier la stérilité d'un produit, la prise d'essai doit s'effectuer dans des conditions d'environnement strictement contrôlées, par exemple sous une hotte à flux laminaire.

Pour la préparation des dilutions, voir ISO 6887.

9.2 Techniques de dénombrement

9.2.1 Dénombrement lors de l'utilisation d'un milieu solide

9.2.1.1 Technique par incorporation en milieu solide

Préparer le milieu (selon 5.2.6), les boîtes de Petri, le diluant et les dilutions à examiner (selon 9.1), en quantités et nombres

correspondants au plan d'ensemencement spécifié dans la Norme internationale concernée.

Répartir dans les boîtes marquées, selon 8, les volumes déterminés des dilutions à examiner.

Verser dans chaque boîte le volume de milieu prescrit en 5.2.6. Le temps qui s'écoule entre le moment où l'on a distribué l'inoculum dans une boîte et celui où le milieu est coulé ne doit pas excéder 15 min. Mélanger soigneusement et immédiatement le milieu fondu et l'inoculum, de façon à obtenir une répartition homogène des micro-organismes dans la masse du milieu. Laisser refroidir et solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

Prévoir une deuxième couche de gélose non nutritive ou identique à celle du milieu de culture utilisé dans l'analyse en vue d'éviter la croissance des colonies envahissantes.

Placer, après solidification complète du milieu, les boîtes à incuber selon les indications données en 9.2.1.3.

9.2.1.2 Technique par étalement

Étaler de façon uniforme et le plus rapidement possible l'inoculum à la surface du milieu contenu dans les boîtes de Petri préparées selon 5.2.6. L'étalement peut être réalisé à l'aide d'un étaleur stérile en verre ou en matière plastique stérile.

Lorsque l'inoculum étalé a été totalement absorbé par le milieu, procéder à l'incubation comme décrit en 9.2.1.3.

9.2.1.3 Incubation

Incuber les boîtes ensemencées retournées à la température appropriée. En principe, une étuve à air est suffisante. Si une déshydratation excessive se produit (par exemple à 55 °C ou dans le cas d'une forte circulation d'air), envelopper les boîtes sans serrer dans des sacs en matière plastique avant l'incubation.

Si l'on exige de faibles variations de température, mettre les boîtes dans un récipient étanche placé dans un bain d'eau thermostaté.

NOTE — Il peut être utile dans certains cas de prévoir des boîtes ensemencées en double, qui seront conservées à +4 °C pour les comparer lors du dénombrement avec les boîtes ensemencées incubées, afin de ne pas confondre des particules du produit examiné avec des colonies.

Après incubation, les boîtes doivent être, si possible, immédiatement examinées. Sinon, elles peuvent être conservées, sauf spécification contraire, au maximum 48 h à +4 °C.

9.2.1.4 Interprétation des résultats

9.2.1.4.1 Choix des boîtes à examiner

Les boîtes ne répondant pas aux exigences formulées dans la méthode particulière doivent être systématiquement écartées. En général, on écarte les boîtes qui ne présentent pas de colonies bien séparées sur au moins la moitié de la surface.

9.2.1.4.2 Expression des résultats

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il faut compter au moins une boîte contenant entre 15 et 150 colonies par boîte.

Calculer le nombre de micro-organismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de la formule

$$\frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

où

$\sum C$ est la somme des colonies sur toutes les boîtes comptées;

d est la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont obtenus (par exemple 10^{-2});

n_1 est le nombre de boîtes dans la première dilution comptée;

n_2 est le nombre de boîtes dans la seconde dilution comptée;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte.

9.2.1.4.3 Limites de confiance

Voir tableau 1.

Tableau 1 — Limites de confiance des estimations des petits nombres

Nombre de micro-organismes	Limites de confiance au niveau 95 %	
	inférieure	supérieure
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

9.2.2 Dénombrement lors de l'utilisation d'un milieu liquide

NOTE — Deux systèmes d'ensemencement sont possibles.

Les systèmes les plus usités dits « symétriques » comprennent le même nombre de tubes pour chaque dilution, les rapports de volume entre deux dilutions étant en général de 1 à 10. Ces systèmes sont surtout utilisés lorsqu'il ne s'agit pas uniquement de vérifier qu'une certaine limite n'est pas dépassée, mais également de déterminer le nombre de micro-organismes présents.

Les systèmes dits « dissymétriques » comprennent différents nombres de tubes pour différentes dilutions. Ces systèmes sont utilisés en particulier pour apprécier des concentrations dans une zone bien délimitée.

9.2.2.1 Ensemencement

Introduire, à l'aide d'une pipette, dans les fioles et tubes correspondants l'inoculum mesuré.

Utiliser une nouvelle pipette à chaque manipulation.

9.2.2.2 Incubation

Disposer les tubes ensemencés dans une étuve ou, de préférence, dans un bain d'eau thermostaté.

9.2.2.3 Interprétation des résultats

Dans les systèmes symétriques (voir la note en 9.2.2), choisir trois dilutions successives dont la dilution la plus faible correspondant à la concentration la plus grande d'échantillon ensemencé est considérée comme la « dilution de base ».

— S'il existe une ou plusieurs dilutions successives pour lesquelles tous les tubes sont reconnus positifs selon la Norme internationale spécifique, retenir comme dilution de base celle correspondant à la concentration d'échantillon la plus faible (ou à la plus forte dilution effectuée).

— S'il n'existe pas de dilution pour laquelle tous les tubes sont reconnus positifs selon la Norme internationale spécifique, retenir les trois dilutions contenant la plus grande concentration de l'échantillon.

Dans les systèmes dissymétriques (voir la note en 9.2.2), tous les tubes ensemencés doivent être pris en compte.

9.2.2.4 Tables NPP

Reporter la combinaison retenue en 9.2.2.3 dans la table NPP correspondant à la technique d'ensemencement utilisée, afin de déterminer un indice NPP.

De nombreuses tables ont été publiées. À titre informatif, l'annexe en reproduit certaines pour quelques séries couramment utilisées.

9.2.2.5 Expression des résultats

À partir de l'indice NPP lu dans la table, déterminer la concentration en micro-organismes la plus probable dans une quantité de référence donnée de l'échantillon à l'aide de la formule suivante

$$C_s = N \frac{F}{V} V_s$$

où

C_s est la concentration la plus probable en micro-organismes dans la quantité de référence V_s ;

N est l'indice NPP lu dans la table pour la dilution de base V ;