
**Microbiologie des aliments — Méthodes
horizontales pour les techniques de
prélèvement sur des surfaces, au moyen
de boîtes de contact et d'écouvillons**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods
for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 18593:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5eedf775-eba6-493a-8095-20329b36bbb8/iso-18593-2004)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5eedf775-eba6-493a-8095-
20329b36bbb8/iso-18593-2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5eedf775-eba6-493a-8095-20329b36bbb8/iso-18593-2004)



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 18593:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5eedf775-eba6-493a-8095-20329b36bbb8/iso-18593-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5eedf775-eba6-493a-8095-20329b36bbb8/iso-18593-2004>

© ISO 2004

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du 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

Publié en Suisse

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 18593 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 18593:2004
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5eedf775-eba6-493a-8095-20329b36bbb8/iso-18593-2004>

Introduction

Pour évaluer le niveau de contamination au cours de la production, ou l'efficacité des protocoles de nettoyage et de désinfection, il peut être important de déterminer la présence, ou le nombre, de micro-organismes viables sur les surfaces d'ustensiles, sur les plans de travail et sur des appareils en contact avec les aliments.

Les méthodes horizontales décrites dans la présente Norme internationale comprennent une méthode de contact avec la surface au moyen de boîtes de contact et une méthode par écouvillonnage. La méthode utilisant les boîtes de contact est uniquement applicable aux surfaces planes, contrairement à la méthode par écouvillonnage qui peut convenir à tous les types de surface. Pour le prélèvement sur de grandes surfaces (> 100 cm²), il est possible d'utiliser des éponges ou étoffes stériles; cette méthode alternative est utile pour l'évaluation de la charge microbienne des surfaces. Les résultats obtenus sont souvent présentés sous forme de valeurs de notation sanitaire basées sur le nombre d'unités formant colonies (UFC) par centimètre carré présentes sur une surface d'essai.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 18593:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5eedf775-eba6-493a-8095-20329b36bbb8/iso-18593-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5eedf775-eba6-493a-8095-20329b36bbb8/iso-18593-2004>

Microbiologie des aliments — Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie des méthodes horizontales pour le prélèvement d'échantillons sur les surfaces se rencontrant dans l'environnement des industries agro-alimentaires (et d'autres transformateurs des produits alimentaires), en vue de rechercher ou de dénombrer des micro-organismes viables.

NOTE Dans le contexte de la présente Norme internationale, le terme «environnement» est compris comme tout élément entrant en contact avec le produit alimentaire ou étant susceptible de représenter une source de contamination ou de rétrocontamination, par exemple matériel, locaux, opérateurs.

2 Références normatives

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

ISO 6887-1, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*

3 Principe

3.1 Du fait que ces méthodes ne sont pas quantitativement fiables et qu'elles ne donnent pas de résultats reproductibles, il convient de ne les utiliser que dans le cadre d'une «analyse de tendances».

3.2 Une boîte de contact (ou lamelle d'immersion) remplie du milieu approprié de gélose est pressée contre la surface à soumettre à l'essai. Après incubation, une estimation de la contamination de la surface peut être obtenue par dénombrement des colonies qui se sont développées.

3.3 Avec la méthode par écouvillonnage, une zone spécifiée de la surface à étudier est délimitée (par exemple en utilisant un gabarit), puis essuyée. Les bâtonnets d'écouvillons sont introduits dans un tube (ou flacon) contenant un diluant stérile ou un neutralisant et agités manuellement.

Si la surface est essuyée avec une éponge ou une étoffe stérile (humide), le dispositif de prélèvement est conservé dans un volume connu de diluant (par exemple 100 ml pour 100 cm²).

Dans le laboratoire, la suspension mère et, si nécessaire, les dilutions décimales suivantes, sont utilisées pour déterminer le nombre de micro-organismes selon les modes opératoires décrits dans les méthodes de dénombrement des (groupes de) micro-organismes à rechercher.

NOTE Le temps d'incubation et la température sont fonction du type de micro-organisme à détecter.

3.4 Pour les milieux sélectifs, des essais de confirmation appropriés peuvent être effectués. Le nombre d'unités formant colonie de micro-organismes spécifiques par centimètre carré ou par écouvillon est calculé à partir du nombre de colonies (confirmées).

3.5 Si nécessaire, la surface est nettoyée et désinfectée après le prélèvement, afin d'éliminer les traces d'éléments nutritifs restants.

4 Milieux de culture et diluant

NOTE Se reporter aux Normes internationales correspondant aux micro-organismes recherchés.

4.1 Neutralisant

En général, la base pour le neutralisant est de l'eau peptonée tamponnée, ou de la peptone sel ou tout autre diluant approprié (tel que la solution de Ringer à 25 %, un tampon phosphate à pH 7,5, ou une solution peptonée à 1 g/l).

Dans les cas où l'on suppose la présence de résidus de désinfectants, il convient d'ajouter des neutralisants appropriés au diluant et aux milieux utilisés dans les boîtes de contact pour empêcher tout effet inhibiteur des désinfectants sur la croissance des micro-organismes.

5 Appareillage et verrerie

Pour les exigences générales, voir l'ISO 7218.

Le matériel à usage unique constitue une alternative acceptable à la verrerie réutilisable s'il possède des spécifications similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

5.1 Boîtes de contact en matière plastique, de 65 mm de diamètre et remplies d'un volume contrôlé de gélose (choisie en fonction des micro-organismes recherchés), spécialement fabriquées pour le prélèvement sur des surfaces.

Le diamètre et la superficie des boîtes de contact varient en fonction de la surface destinée au prélèvement. La gélose doit former un ménisque convexe par rapport à la boîte en plastique.

NOTE Il est également possible d'utiliser tout autre dispositif (milieu nutritif dans un récipient souple ou rigide) pouvant être mis en contact avec la surface destinée au prélèvement, par exemple des lamelles d'immersion (5.2).

5.2 Lamelles d'immersion en matière synthétique, présentant une superficie comprise entre 7 cm² et 10 cm² et dont l'une des faces (ou les deux) est (sont) recouverte(s) d'une couche de milieu solide de croissance (choisi en fonction des micro-organismes recherchés).

NOTE Il existe divers milieux de croissance suivant le(s) micro-organisme(s) recherché(s).

5.3 Écouvillons, bâtonnets sécables comprenant une extrémité en coton ou en matériau synthétique (tel qu'alginat ou tissu) contenu dans un tube ou dans une enveloppe.

L'écouvillon doit être emballé individuellement et stérilisé. Le matériel doit être exempt de substances inhibitrices.

NOTE Pour certains types de surface, des résidus de coton peuvent contaminer les parties internes de ces surfaces à la suite d'un prélèvement.

5.4 Étoffe, faite en matériau tissé stérile humide, exempte de substances antimicrobiennes, emballée individuellement dans des sachets stériles en plastique, utilisée pour le prélèvement sur de grandes surfaces ($\geq 100 \text{ cm}^2$).

5.5 Éponge, carré d'éponge plane, stérile et humide, exempte de substances antimicrobiennes, emballée individuellement dans des sachets stériles en plastique, utilisée pour le prélèvement sur de grandes surfaces ($\geq 100 \text{ cm}^2$).

5.6 Récipients, tels que flacons, tubes, ballons, appropriés à la stérilisation et au stockage des milieux de culture.

5.7 Boîte réfrigérée, isolée, pouvant maintenir les échantillons à basse température pendant leur transport au laboratoire.

5.8 Pipettes graduées, à larges ouvertures et ayant une capacité nominale de 1 ml, graduées tous les 0,1 ml ou **pipettes automatiques** délivrant 100 μl et 1 000 μl .

5.9 Agitateur, pour mélanger les liquides dans les tubes à cultures.

5.10 Homogénéisateur péristaltique ou **homogénéisateur à agitation horizontale**, utilisant des sacs plastiques stériles pour préparer les suspensions mères par un mouvement péristaltique (homogénéisateur péristaltique) ou par vibration (homogénéisateur à agitation horizontale).

5.11 Boîtes de Petri, en matière plastique, de 65 mm de diamètre.

5.12 pH-mètre, ayant une précision de lecture de 0,01 unité de pH à $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, permettant de réaliser des mesurages ayant une exactitude de $\pm 0,1$ unité de pH.

5.13 Gabarit, fabriqué en un matériau résistant à la corrosion (par exemple un cadre en acier inoxydable, pouvant contenir une superficie de 20 cm^2 à 100 cm^2), facile à nettoyer et stérilisable.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5eedf775-eba6-493a-8095-20329b36bbb8/iso-18593-2004>

6 Techniques de prélèvement

6.1 Généralités

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif de la surface soumise à l'essai et n'ayant pas été modifié pendant le transport et le stockage ou par des résidus de désinfectants.

Les désinfectants sont généralement formulés pour un temps de désinfection par contact de 5 min à 15 min. Attendre le temps donné sur la notice d'utilisation du désinfectant, avant d'étudier la surface au moyen des écouvillons ou des boîtes de contact pour évaluer l'efficacité du programme de nettoyage et de désinfection (ou toute autre disposition conformément aux spécifications des désinfectants).

Il n'est pas possible de prescrire un neutralisant qui soit adapté à toutes les situations. En général, le sorbitane mono-oléate (30 g/l) et la lécithine (3 g/l) sont utiles pour neutraliser les résidus de désinfectants absorbés (tels que les composés d'ammonium quaternaire, amphotéricides). Le thiosulfate de sodium (5 g/l) est un bon neutralisant pour les produits à base d'halogènes. Dans le cas des désinfectants à base de peroxyde, il est possible d'utiliser la catalase ou la peroxydase comme neutralisant. Une unité de ces enzymes catalyse la décomposition de 1 μmol de peroxyde d'hydrogène par minute à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et à un pH de $7,0 \pm 0,2$. Un certain nombre de neutralisants de désinfectants sont recommandés dans les normes EN 1276 [1], EN 1650 [2], EN 13697 [3] et EN 13704 [4].

Les composants d'un neutralisant pouvant être utilisé dans la plupart des situations sont donnés dans le Tableau 1. Préparer dans une solution de peptone (1 g/l) et de chlorure de sodium (8,5 g/l), verser dans les tubes ou les flacons et stériliser pendant 15 min à $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tableau 1 — Neutralisant pouvant être utilisé dans la plupart des situations

Composant	Concentration
Sorbitane mono-oléate (Polysorbate 80)	30 g/l
Lécithine	3 g/l
Thiosulfate de sodium	5 g/l
L-Histidine	1 g/l
Saponine	30 g/l

6.2 Méthode à la boîte de contact

Après retrait hors des conteneurs de transport, presser la surface de gélose de la boîte de contact ou de la lamelle d'immersion fermement contre la surface d'essai, sans décrire de mouvement latéral. D'après la littérature, on sait que les meilleurs résultats obtenus avec les boîtes de contact nécessitent un temps de contact de 10 s et une pression telle que celle exercée par une masse de 500 g. Fermer les boîtes de contact ou les lamelles d'immersion immédiatement après l'ensemencement et les replacer dans le conteneur de transport.

6.3 Méthodes par écouvillonnage et à l'étoffe/éponge

6.3.1 Méthode par écouvillonnage

Sortir un écouvillon de son emballage stérile et en humidifier l'extrémité en le plongeant dans un tube contenant le diluant. Presser l'extrémité de l'écouvillon contre la paroi du tube pour éliminer l'eau en excès. Placer l'extrémité de l'écouvillon sur la surface à étudier et tracer des stries sur une surface estimée entre 20 cm² et 100 cm², tout en faisant tourner l'écouvillon entre le pouce et l'index, dans deux directions perpendiculaires l'une par rapport à l'autre.

Mettre l'écouvillon dans le tube avec le diluant et rompre ou couper le bâtonnet dans des conditions aseptiques.

6.3.2 Méthode à l'étoffe/éponge

Ouvrir le sachet en plastique ou le récipient contenant l'étoffe ou l'éponge.

Retirer l'étoffe ou l'éponge de façon aseptique avec des pinces stériles ou des gants stériles. Mouiller l'étoffe ou l'éponge avec une quantité suffisante (mais sans excès) de diluant; dans le cas d'une surface humide, cela n'est pas nécessaire.

Retourner l'étoffe ou l'éponge dans le sachet et fermer celui-ci de manière à garantir l'absence de fuites.

Échantillonner la surface dans deux directions perpendiculaires, en changeant la face de l'étoffe ou de l'éponge. Introduire l'étoffe ou l'éponge dans le récipient stérile, introduire le diluant et fermer. Ajouter un volume connu de diluant, suffisant pour que l'étoffe ou l'éponge reste humide jusqu'au moment de l'analyse.

En alternative, procéder comme suit. Ouvrir le sachet en plastique contenant l'étoffe ou l'éponge. Saisir l'éponge à travers le sachet et retourner le sachet sur la main. Utiliser l'éponge pour recueillir l'échantillon suivant la description ci-dessus et transférer l'étoffe ou l'éponge dans un sachet en plastique stérile. Fermer le sachet de manière à garantir l'absence de fuites.

7 Transport

Transférer, de préférence en moins de 4 h, les échantillons obtenus par la méthode par écouvillonnage dans une boîte réfrigérée à une température comprise entre 1 °C et 4 °C. Examiner dans le laboratoire dès que possible, mais au plus tard dans un délai de 24 h, conformément au mode opératoire donné dans l'Article 8.

Transporter, de préférence en moins de 4 h, les boîtes de contact et/ou les lamelles d'immersion de telle manière que toute contamination soit évitée.

8 Mode opératoire

8.1 Méthode à la boîte de contact

Incuber les boîtes de contact ou les lamelles d'immersion en fonction du type de micro-organisme à énumérer (voir la Note à l'Article 4).

La méthode à la boîte de contact ne doit pas être utilisée pour la détection spécifique de micro-organismes pathogènes.

8.2 Méthode par écouvillonnage (y compris méthode à l'étoffe/éponge)

Mélanger intimement le contenu des tubes qui contiennent les écouvillons au moyen d'un agitateur (5.9) pendant 30 s en réglant la vitesse de telle sorte que la paroi du tube soit humidifiée jusqu'à une hauteur de 2 cm à 3 cm en partant du haut.

Ajouter aux sachets en plastique qui contiennent les étoffes ou les éponges une certaine quantité de diluant ou de neutralisant (4.1), en fonction de la grandeur de la surface étudiée (par exemple 100 ml pour 100 cm²). Ensuite, traiter le contenu des sachets dans un homogénéisateur péristaltique (5.10) pendant 1 min ou dans un homogénéisateur à agitation horizontale (5.10) pendant 30 s. Cela constitue la suspension mère.

Si l'on présume que le nombre de micro-organismes sera élevé, préparer d'autres dilutions décimales dans du diluant à l'eau peptonée de façon à obtenir une quantité dénombrable de colonies (voir l'ISO 6887-1).

Conformément aux méthodes de dénombrement utilisées (voir les Normes internationales appropriées), ensemercer en double des boîtes de milieux avec la suspension mère en utilisant 1 ml d'inoculum dans le cas de boîtes contenant un produit liquide, et 0,1 ml d'inoculum dans le cas de boîtes contenant un produit à étaler. Traiter les dilutions suivantes de la même manière. Retourner les boîtes et incuber pendant la durée et à la température appropriées à chaque milieu.

Comme alternative à la méthode d'étalement sur boîte décrite ci-dessus, il est possible d'utiliser la méthode d'étalement de gouttes sur boîte. En commençant par la dilution la plus élevée, utiliser des pipettes stériles pour transférer des aliquotes de 0,05 ml des suspensions mères (écouvillons, étoffes ou éponges) et des dilutions suivantes aux secteurs appropriés du milieu de culture marqué sur la partie inférieure de la boîte de gélose (en double, en utilisant les mêmes dilutions pour les différentes boîtes de gélose). Chaque boîte de gélose préséchée peut être utilisée pour appliquer des gouttes à un maximum de six dilutions différentes. Utiliser la technique de pipettage inverse par dépression complète du piston pour des gouttes d'aliquotes de 0,05 ml, et inoculer les boîtes par dépression du piston jusqu'au premier stop seulement. Maintenir les boîtes de gélose à l'horizontale (couvercle vers le haut) jusqu'à ce que la surface soit sèche.

Si l'on utilise la méthode de l'écouvillonnage pour mettre en évidence la présence de micro-organismes spécifiques (par exemple *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella* spp.), il est recommandé d'étudier une surface mesurant au moins 100 cm², mais de préférence environ 1 000 cm². Transférer l'écouvillon, l'étoffe ou l'éponge dans le bouillon d'enrichissement approprié et bien mélanger.