

SPÉCIFICATION TECHNIQUE

**ISO/TS
26844**

**FIL/MR
215**

Première édition
2006-11-15

Lait et produits laitiers — Détermination de résidus antimicrobiens — Test de dissémination en tube

*Milk and milk products — Determination of antimicrobial residues —
Tube diffusion test*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 26844:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a1a9080-7c99-4d6a-8a7b-62db0be87597/iso-ts-26844-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a1a9080-7c99-4d6a-8a7b-62db0be87597/iso-ts-26844-2006>



Numéros de référence
ISO/TS 26844:2006(F)
FIL/MR 215:2006(F)

© ISO et FIL 2006

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 et la FIL déclinent 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 et les comités nationaux de la FIL. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central de l'ISO à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 26844:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a1a9080-7c99-4d6a-8a7b-62db0be87597/iso-ts-26844-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a1a9080-7c99-4d6a-8a7b-62db0be87597/iso-ts-26844-2006>

© ISO et FIL 2006

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 soit de l'ISO soit de la FIL, à l'une ou l'autre des adresses ci-après.

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

Fédération Internationale de Laiterie
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Bruxelles
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
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Organisme d'essai, milieux de culture, solutions étalons et échantillons témoins	2
5.1 Organisme d'essai	2
5.2 Milieu de culture	3
5.3 Préparation des solutions étalons et des échantillons témoins	5
5.4 Lait négatif (lait exempt d'antimicrobiens)	7
6 Appareillage et verrerie	7
7 Échantillonnage	7
8 Préparation de l'échantillon pour essai	8
9 Mode opératoire	8
9.1 Échantillons témoins	8
9.2 Préparation des tubes à essais	8
9.3 Incubation	8
9.4 Interprétation	9
10 Confirmation (facultative)	9
10.1 Généralités	9
10.2 Confirmation indicative de la présence de bêta-lactamines	9
10.3 Confirmation indicative des sulfamides	10
10.4 Confirmation des autres inhibiteurs	10
11 Expression des résultats	10
12 Fidélité	10
13 Rapport d'essai	10
Annexe A (informative) Données obtenues lors d'études interlaboratoires	11
Annexe B (informative) Préparation de la suspension de l'organisme d'essai	12
Bibliographie	14

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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents normatifs:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale, soit de son annulation.

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/TS 26844|FIL/RM 215 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 de laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

Avant-propos

La **FIL (Fédération internationale de laiterie)** est une fédération mondiale du secteur laitier avec un Comité National dans chacun de ses pays membres. Chaque Comité National 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 pour le lait et les produits laitiers.

Les projets de Normes internationales adoptés par les Équipes d'Action et les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux votants.

Dans d'autres circonstances, notamment lorsqu'il y a un besoin urgent de ces documents sur le marché, un Comité permanent peut décider de publier un autre type de document normatif que la FIL appelle une *Méthode révisée*. Cette méthode représente un accord entre les membres d'un Comité permanent et elle est acceptée pour publication si elle est approuvée par au moins 50 % des membres votants du comité. Une *Méthode révisée* est l'équivalent d'une ISO/PAS ou d'une ISO/TS et sera donc également publiée conjointement selon les conditions de l'ISO.

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/TS 26844|FIL/RM 215 a été élaborée par la Fédération internationale de laiterie (FIL) et par 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.

[ISO/TS 26844:2006](#)

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action Mixte ISO-FIL, *Résidus vétérinaires*, du Comité Permanent chargé des *Méthodes analytiques pour additifs et contaminants*, sous la conduite de ses chefs de projet, Messieurs H. Stegeman (NL) et J. Kerkhof (NL).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 26844:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a1a9080-7c99-4d6a-8a7b-62db0be87597/iso-ts-26844-2006>

Lait et produits laitiers — Détermination de résidus antimicrobiens — Test de dissémination en tube

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique internationale (Méthode révisée) spécifie un test d'inhibition microbiologique pour la détection d'une grande variété d'antimicrobiens dans le lait et les produits laitiers.

Cette méthode s'applique au lait cru, au lait traité thermiquement et au lait en poudre reconstitué.

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 (y compris les éventuels amendements) s'applique.

ISO 4833, *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes — Technique de comptage des colonies à 30 °C*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Recommandations et règles générales pour les examens microbiologiques*

ISO 13969|FIL 183, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices pour une description normalisée des méthodes microbiologiques de dépistage d'inhibiteurs microbiens*

ISO 18330|FIL 188, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices pour la description normalisée des essais immunologiques et des essais récepteur pour la détection des résidus antimicrobiens*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

substances antimicrobiennes

substances présentant une inhibition lors de la mise en œuvre du mode opératoire spécifié dans le présent document

3.2

limites de détection

niveau de concentration où l'on détecte un pourcentage donné d'échantillons positifs

EXEMPLE 95 %.

4 Principe

Un échantillon de lait est ajouté dans deux tubes à essais renfermant un milieu gélosé contenant du *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 [identique à la souche C953 du NIZO (Institut néerlandais de recherche sur les produits laitiers)]. Les tubes à essais diffèrent l'un de l'autre par leur pH, les suppléments ajoutés et les antibiotiques synergiques. L'incubation entraînant une croissance normale de l'organisme provoque un passage du pourpre au jaune de l'indicateur de pH de la gélose. Si des substances ayant un effet inhibiteur de la croissance des micro-organismes sont présentes dans le lait, la couleur de l'indicateur de pH restera pourpre.

Le tube à essais A (pH 7,0; chloramphénicol) présente une sensibilité améliorée aux résidus de tétracyclines et le tube à essais B (pH 8,0; triméthoprime) aux résidus de bêta-lactamines, macrolides, aminoglycosides, sulfamides et triméthoprime.

5 Organisme d'essai, milieux de culture, solutions étalons et échantillons témoins

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau déionisée ou encore de l'eau de pureté équivalente.

5.1 Organisme d'essai

Utiliser une suspension de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 (identique à la souche C953 du NIZO)¹⁾, ajusté à un nombre viable d'environ 5 000 000 unités formant colonie/ml (voir Annexe B pour la préparation). Contrôler la qualité de chaque nouveau lot de suspension d'organisme d'essai en déterminant la sensibilité des solutions étalons mentionnées dans le Tableau 1.

THIS STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Tableau 1 — Solutions étalons pour les essais de sensibilité de la suspension d'organisme d'essai

Solution étalon	Teneur (µg/kg de lait)
Benzylpénicilline (Pénicilline-G)	2
Sulfadiazine	150
Néomycine	30
Érythromycine	10
Oxytétracycline	100

Procéder à 5 contrôles avec les solutions étalons et le lait témoin, conformément au mode opératoire décrit à l'Article 9. Déterminer la sensibilité de la suspension d'organisme d'essai à la benzylpénicilline et à l'oxytétracycline à l'aide du tube A (5.2.5) et la sensibilité à la sulfadiazine, à la néomycine et à l'érythromycine à l'aide du tube B (5.2.6). Il convient d'obtenir un résultat positif sur la totalité des tubes à essais.

1) La suspension de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 ou de la souche C953 du NIZO est un exemple de produit disponible sur le marché. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Spécification technique et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.

5.2 Milieu de culture

Afin d'améliorer la reproductibilité de la méthode, il est recommandé d'utiliser des composants de base ou des milieux complets déshydratés pour la préparation des milieux de culture. Suivre les instructions du fabricant.

5.2.1 Milieu de base

5.2.1.1 Composants

Peptone tryptique de caséine	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose anhydre	1,0 g
Gélose	10 g à 15 g
Eau	1 000 ml

NOTE Le milieu de base déshydraté est disponible dans le commerce sous forme de gélose de numération («Plate Count Agar», milieu PCA).

5.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants dans de l'eau en les chauffant pour mettre la totalité en solution. Ajuster le pH de manière qu'il soit de $7,0 \pm 0,2$ après stérilisation.

Passer le milieu à l'autoclave à $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, pendant 15 min.

Le milieu de base ainsi préparé peut être conservé pendant 3 mois maximum, s'il est stocké à l'abri de la lumière à une température comprise entre 0 °C et $+5\text{ °C}$.

5.2.2 Solution de pourpre de bromocrésol

5.2.2.1 Composants

Pourpre de bromocrésol	250 mg
Éthanol à 96 %	5 ml
Eau	100 ml

5.2.2.2 Préparation

Dissoudre le pourpre de bromocrésol dans l'éthanol. Compléter à 100 ml avec de l'eau.

La solution de pourpre de bromocrésol peut être conservée pendant 6 mois maximum, si elle est stockée à l'abri de la lumière à une température comprise entre 0 °C et $+5\text{ °C}$.

5.2.3 Solution de chloramphénicol (CAP)

5.2.3.1 Composants

Chloramphénicol	20,0 mg
Méthanol	5 ml
Eau	100 ml

5.2.3.2 Préparation

Dissoudre le chloramphénicol dans le méthanol. Compléter à 100 ml avec de l'eau.

La solution de chloramphénicol peut être conservée pendant 1 mois maximum, si elle est stockée à l'abri de la lumière à une température comprise entre 0 °C et +5 °C.

5.2.4 Solution de triméthoprime (TMP)

5.2.4.1 Composants

Triméthoprime	25,0 mg
Éthanol à 96 %	5 ml
Eau	1 000 ml

5.2.4.2 Préparation

Dissoudre le triméthoprime dans l'éthanol. Compléter avec de l'eau à 1 000 ml.

La solution de TMP peut être conservée pendant 1 mois maximum, si elle est stockée à l'abri de la lumière à une température comprise entre 0 °C et +5 °C.

5.2.5 Tubes à essais A (pH 7)

Faire fondre le milieu de base (5.2.1). Refroidir le milieu dans un bain-marie (6.3) à 63 °C ± 1 °C. Ajouter 1,5 ml de solution de CAP (5.2.3) et 2 ml de solution de pourpre de bromocrésol (5.2.2) à 100 ml de milieu de base préchauffé, tout en conservant ce dernier dans le bain-marie réglé à 63 °C. Bien homogénéiser le milieu.

En maintenant le milieu dans le bain-marie réglé à 63 °C, ajuster le pH à 7,0 ± 0,1 à cette température (voir 6.5) en utilisant du NaOH à 1 mol/l ou du HCl à 1 mol/l.

Par 100 ml de milieu, ajouter ensuite une quantité (environ 2 ml) de suspension d'organisme d'essai (5.1) telle que, en l'absence de substances antimicrobiennes, le changement de couleur mentionné plus haut se produise après incubation dans le bain-marie à 63 °C pendant 4 h et 15 min ± 30 min.

Homogénéiser le milieu d'essai, le répartir par prises de 1 ml dans des tubes (6.4) et le laisser se solidifier.

Les tubes à essais A peuvent être conservés à une température comprise entre 0 °C et +5 °C pendant 3 jours maximum, à condition d'être couverts (avec un parafilm, par exemple) afin d'éviter l'évaporation.

5.2.6 Tubes à essais B (pH 8)

Faire fondre le milieu de base (5.2.1). Refroidir le milieu au bain-marie (6.3) à 63 °C ± 1 °C. Ajouter 0,6 ml de solution de TMP (5.2.4) et 2 ml de solution de pourpre de bromocrésol (5.2.2) à 100 ml de milieu de base préchauffé, tout en conservant ce dernier dans le bain-marie réglé à 63 °C. Bien homogénéiser le milieu.

En maintenant le milieu dans le bain-marie réglé à 63 °C, ajuster le pH à 8,00 ± 0,02 à cette température (voir 6.5) en utilisant du NaOH à 1 mol/l ou du HCl à 1 mol/l. En ajustant le pH du milieu, veiller à ce qu'il ne dépasse pas 8,05.

Par 100 ml de milieu, ajouter ensuite une quantité (environ 2 ml) de suspension d'organisme d'essai (5.1) telle que, en l'absence de substances antimicrobiennes, le changement de couleur mentionné plus haut se produise après incubation dans le bain-marie à 63 °C pendant 4 h et 15 min ± 30 min.

Homogénéiser le milieu d'essai, le répartir par prises de 1 ml dans des tubes (6.4) et le laisser se solidifier.

Les tubes à essais B peuvent être conservés à une température comprise entre 0 °C et +5 °C pendant 3 jours maximum, à condition d'être couverts (avec un parafilm, par exemple) afin d'éviter l'évaporation.

5.3 Préparation des solutions étalons et des échantillons témoins

Corriger toutes les pesées en fonction de la pureté et de la teneur en sel conformément à l'ISO 13969|FIL 183.

Pour la préparation des solutions étalons et des échantillons témoins, on peut supposer que 1 ml de solution est égal à 1 g de solution.

5.3.1 Solutions étalons et échantillons témoins de benzylpénicilline

Compte tenu de la stabilité limitée de la benzylpénicilline, il est conseillé de préparer toutes les solutions étalons de benzylpénicilline extemporanément et de congeler directement les échantillons témoins de lait le même jour, à une température inférieure à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.1.1 Solution mère de benzylpénicilline

Dissoudre $20,0\text{ mg} \pm 0,1\text{ mg}$ de benzylpénicilline dans 1 000 ml d'eau, puis homogénéiser. La solution mère de benzylpénicilline ainsi préparée contient 20 mg/l de benzylpénicilline.

La solution mère de benzylpénicilline peut être conservée pendant 2 jours maximum, si elle est stockée à une température comprise entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.1.2 Solution fille de benzylpénicilline

Diluer 10 ml de solution mère de benzylpénicilline (5.3.1.1) avec de l'eau à 1 000 ml, puis homogénéiser. La solution fille de benzylpénicilline ainsi obtenue contient 200 $\mu\text{g/l}$ de benzylpénicilline.

5.3.1.3 Échantillon témoin de lait à la benzylpénicilline

Diluer 1 ml de solution fille de benzylpénicilline (5.3.1.2) à 100 ml avec du lait négatif (5.4), puis homogénéiser. L'échantillon témoin de lait ainsi préparé contient 2 $\mu\text{g/l}$ de benzylpénicilline.

L'échantillon témoin de lait à la benzylpénicilline peut être conservé pendant 2 mois maximum, s'il est stocké dans des tubes à essais (6.4), à une température inférieure à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

NOTE 1 mg de pénicilline G potassique pure équivaut à 1 595 unités internationales de pénicilline G. 1 mg de pénicilline G sodique pure équivaut à 1 670 unités internationales de pénicilline G.

5.3.2 Solutions étalons et échantillons témoins d'oxytétracycline

5.3.2.1 Solutions mère d'oxytétracycline

Dissoudre $5,0\text{ mg} \pm 0,1\text{ mg}$ d'oxytétracycline dans 10 ml de solution de HCl à 0,1 mol/l. Compléter à 100 ml avec de l'eau, puis homogénéiser. La solution mère d'oxytétracycline ainsi préparée contient 50 mg/l d'oxytétracycline.

La solution mère d'oxytétracycline peut être conservée pendant 1 semaine maximum, si elle est stockée à l'abri de la lumière à une température comprise entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.2.2 Solution fille d'oxytétracycline

Diluer 10 ml de solution mère d'oxytétracycline (5.3.2.1) à 100 ml avec de l'eau, puis homogénéiser. La solution fille d'oxytétracycline ainsi obtenue contient 5 000 $\mu\text{g/l}$ d'oxytétracycline.

5.3.2.3 Échantillon témoin de lait à l'oxytétracycline

Diluer 2 ml de solution fille d'oxytétracycline (5.3.2.2) à 100 ml avec du lait négatif (5.4), puis homogénéiser. L'échantillon témoin de lait ainsi préparé contient 100 $\mu\text{g/l}$ d'oxytétracycline.

L'échantillon témoin de lait à l'oxytétracycline peut être conservé pendant 3 mois maximum, s'il est stocké dans des tubes à essais (6.4), à une température inférieure à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.