



Guide utilisateur pour le dénombrement microbien dans les échantillons liquides avec les testeurs nomad

introduction

Les testeurs **nomad** sont des dispositifs simples, faciles à utiliser et prêts à l'emploi, permettant d'évaluer les niveaux de contamination microbiologique même lorsque l'accès à un laboratoire, à un équipement dédié ou à une technique experte est limité.

Les applications comprennent le dénombrement des micro-organismes dans les eaux environnementales, les eaux traitées, les eaux purifiées, les eaux de rinçage des équipements, les produits alimentaires et les boissons, les équipements de fabrication, y compris les surfaces de travail, pour la surveillance de l'hygiène, de l'environnement ou des processus.

La conception tout-en-un unique des dispositifs permet l'échantillonnage et les tests simultanés, éliminant ainsi le besoin d'un contenant stérile de transport et d'une étape de transfert de liquide aseptique.

Les testeurs **nomad** sont basés sur la méthode de dénombrement par culture et la technique de filtration sur membrane, établies. Les testeurs combinent un filtre à membrane de 0,45 µm associé à un tampon absorbant contenant des éléments nutritifs, thermoscellé dans une languette support facile à manipuler. La configuration du dispositif permet d'extraire 1 ml d'échantillon et retenir les micro-organismes à la surface du filtre, pour une mise en culture ultérieure dans sa chambre en plastique transparent. Le filtre est quadrillé pour faciliter le comptage des colonies microbiennes développées à sa surface. Chaque dispositif est emballé dans une enveloppe en plastique scellée.

Des tests isolés peuvent fournir des informations utiles lorsque son résultat est comparable à une norme ou un standard acceptés. Étant donné que les installations, les processus et les procédures diffèrent les uns des autres, des tests réguliers aboutissant à la constitution d'un historique utile pour évaluer ensuite des risques de contamination:

- Mesurer la conception sanitaire d'un équipement, des pratiques du personnel et des méthodes opérationnelles.
- Fournir des informations sur les micro-organismes présents, indicateurs de risque ou ceux nuisibles responsables de détériorations, de sorte que des mesures correctives appropriées puissent être prises pour prévenir les contaminations microbiennes potentielles.
- Agir comme un système d'alerte précoce des risques microbiologiques dans l'environnement de production et de post-production
- Aider à identifier les niches et les points chauds qui pourraient constituer une source de contamination.
- Documenter l'état sanitaire général d'une installation.
- Valider un programme de décontamination et aider à déterminer la fréquence requise pour le nettoyage et décontamination.

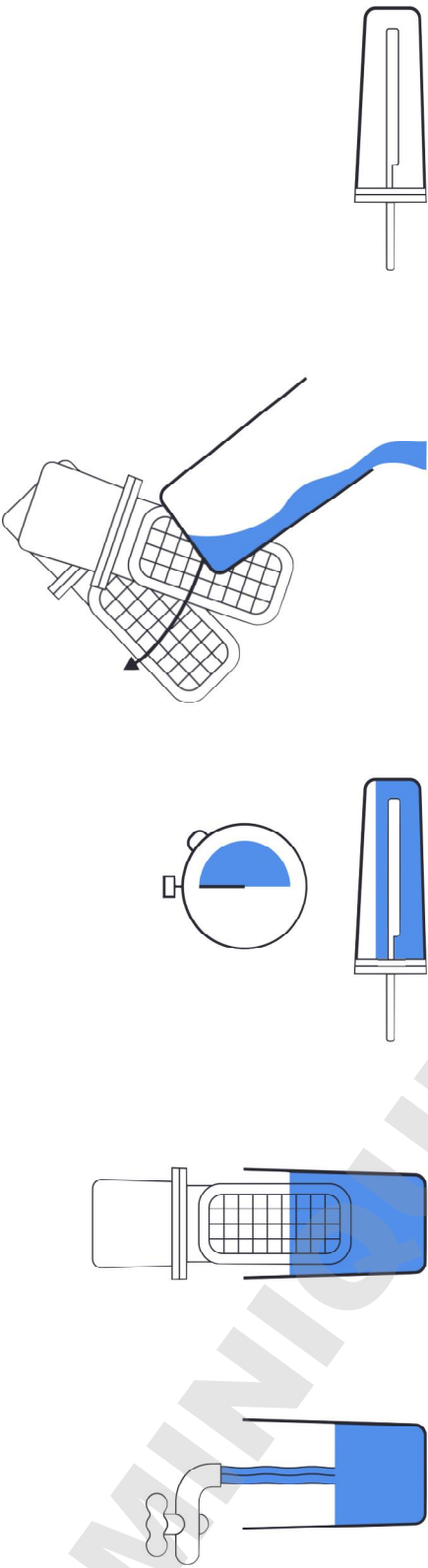
La cohérence dans l'application des protocoles de test est importante pour la constitution d'un ensemble de données solide.

Si un programme de surveillance microbienne est en place, les pratiques existantes doivent se substituer aux recommandations fournies dans ce guide.

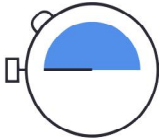
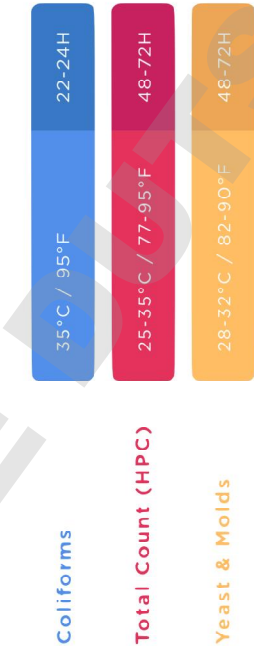
Protocole résumé - Liquides



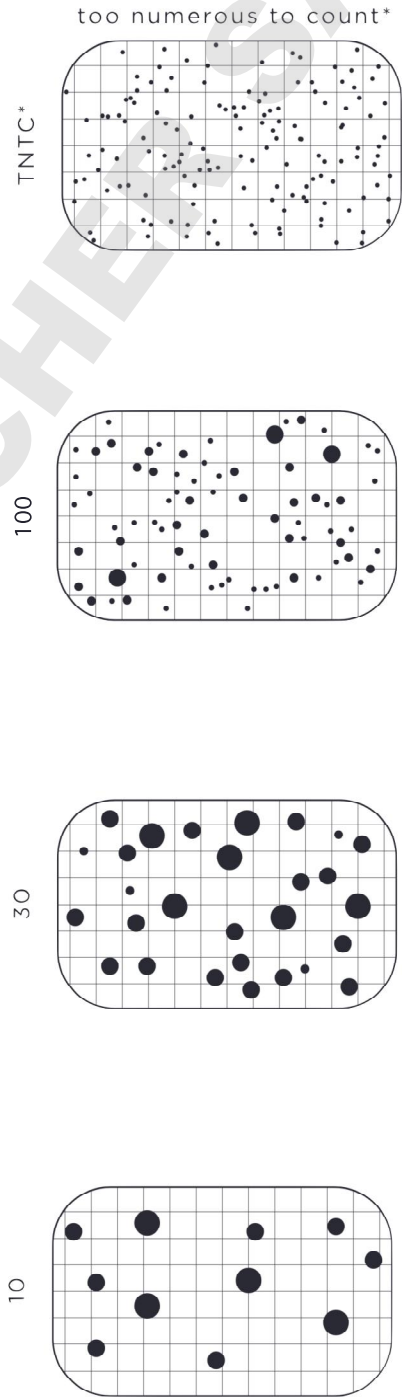
1-Tester



2-Incuber



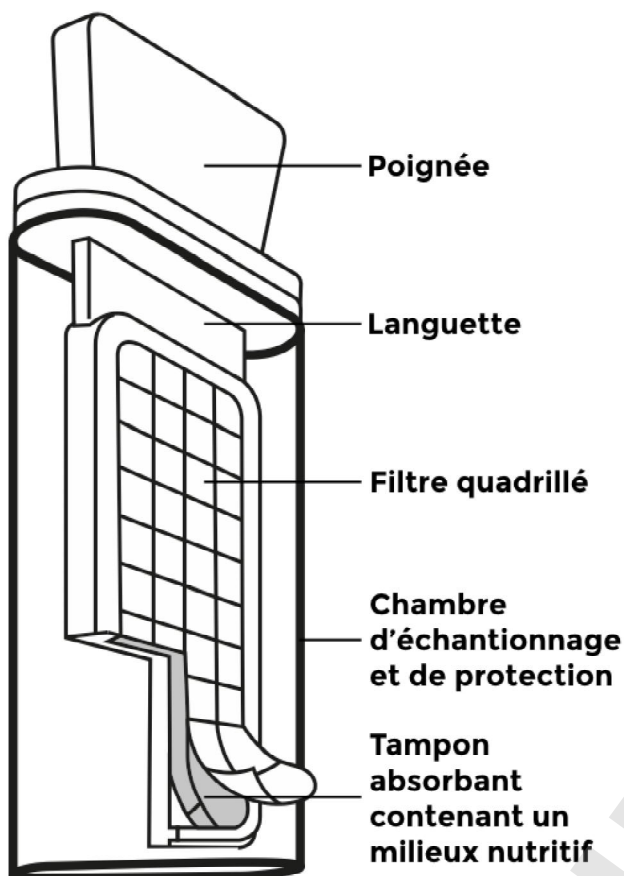
3-Compter



Sections

Protocole résumé - Liquides	2
Composants	4
Préambule	5
Échantillonnage	6
Instructions pour tester les échantillons liquides	8
Guide de culture-incubation	9
Guide de dénombrement des colonies	9
Dénombrement des colonies	11
Guide d'achat	13

Composants



Un testeur est composé de deux parties:

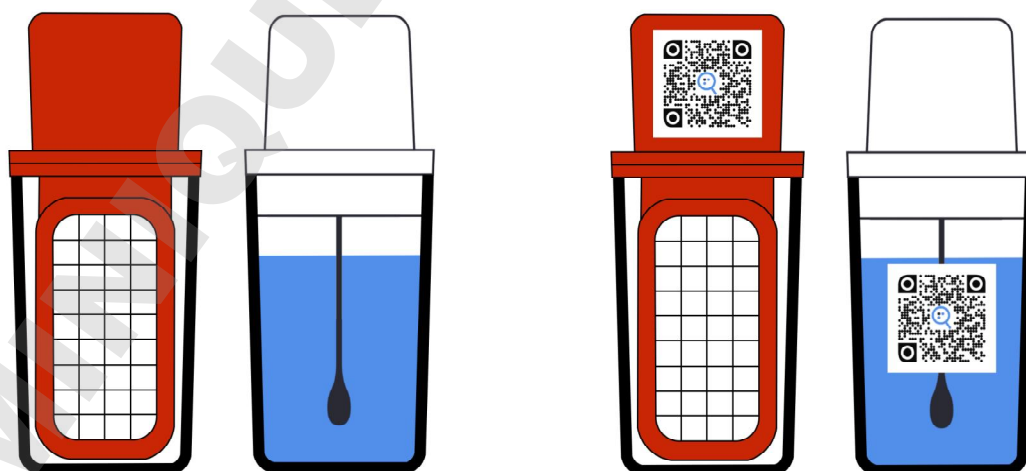
- Une chambre en plastique externe utilisée pour collecter des échantillons de liquide et comme enveloppe protectrice pour la languette. Chaque chambre porte 2 marques de graduation, une pour la collection d'échantillons de 18 ml, une autre marque de 1,8 ml facilitant les dilutions au 1/10^{ème}.
- Une poignée de test en plastique associée à une languette avec un filtre rétentif quadrillé et un tampon absorbant.
- Le tampon contient le milieu nutritif déshydraté pour assurer la croissance des organismes recherchés.
- Le filtre à membrane de 0,45 µm est lié au tampon absorbant contenant le milieu de culture et thermoscellé dans une languette facile à manipuler.
- Chaque ensemble de testeur est emballé dans une enveloppe en plastique scellée.

Un écouvillon se compose de deux parties:

- Un capuchon en plastique relié à un coton-tige,

- Une chambre externe, identique à la chambre du testeur, contenant 18 ml d'une solution tampon stérile de dilution et de neutralisation.

Un kit de test pour surfaces combine un testeur et un écouvillon



nomad Standard

nomad Lab-Less*

* À utiliser avec l'application mobile **nomad** Lab-Less actuellement en développement.

Si vous souhaitez être informé de la disponibilité de **nomad** Lab-Less, consulter la section «Rester en contact» de notre site.

Instructions

Préambule

- A. Il est recommandé de neutraliser les échantillons contenant du **chlore résiduel** avec du thiosulfate de sodium (0,1 ml d'une solution à 10% de thiosulfate pour 120 ml d'échantillon ou de 10 mg de thiosulfate pour 100 ml d'échantillon) avant de procéder aux essais avec les testeurs.
- B. Lorsque des dénombrements exacts ne sont pas nécessaires, les échantillons contenant jusqu'à 300 unités formant colonie (microorganismes se développant en colonies i.e. u.f.c.) par ml peuvent être testés sans dilution. Pour des comptages exacts, tout échantillon contenant plus de 100 u.f.c. / ml doit être dilué. Si un niveau de dilution de 1:10 est requis, remplir simplement la chambre du testeur avec le liquide jusqu'à la ligne graduée inférieure (1,8 ml), ajouter de l'eau (ou un tampon) stérile jusqu'à la ligne supérieure (18 ml), insérer la languette du testeur et procéder avec le test.
- C. Pour la plupart des échantillons aqueux, la languette du testeur doit être immergée dans l'échantillon pendant 20 secondes. Pour certaines applications, telles que les échantillons visqueux, la languette peut nécessiter une immersion jusqu'à 2 minutes pour permettre à la partie aliquote de 1 mL d'imbiber complètement le tampon absorbant. Si la membrane entière est correctement humidifiée, le filtre apparaîtra en gris foncé avec le testeur pour flore totale (rouge) ainsi qu'avec le testeur pour levures et moisissures (jaune) et en gris très clair avec le testeur pour coliformes (bleu).
- D. Ne pas immerger la languette plus longtemps que nécessaire, sinon une perte de milieu à travers la membrane et dans l'échantillon pourrait se produire.
- E. Les dilutions d'échantillons doivent être effectuées préférentiellement avec un tampon phosphate stérile (pH 7,2). Si cela n'est pas disponible, de l'eau du robinet stérile et sans chlore peut être utilisée.
- F. **Les échantillons pâteux** peuvent être testés selon la méthode suivante:
- Peser une quantité donnée du solide dans un sac stérile.
 - Verser un volume connu et supérieur à 20 ml d'eau ou de tampon phosphate stérile dans le sac.
 - Sceller le sac et pétrir avec les doigts pendant une durée connue et au moins 2 minutes. Laisser les solides se déposer.
 - Verser 18 ml de la couche liquide supérieure dans le boîtier de la chambre du testeur (remplir jusqu'au repère supérieur).
 - Tester de la manière habituelle.
- G. **Les échantillons solides** peuvent être testés selon la méthode suivante:
- Peser une quantité donnée du solide dans un sac stérile.
 - Verser un volume connu et au moins 20 ml d'eau stérile ou de tampon phosphate dans le sac.
 - Fermer le sac et agiter vigoureusement pendant une durée connue et au moins 2 minutes. Laisser les solides se déposer.
 - Verser 18 ml de la couche liquide supérieure dans le boîtier de la chambre du testeur (remplir jusqu'au repère supérieur).
 - Tester de la manière habituelle.

Échantillonnage

La collecte d'échantillons de nourriture, d'eau et de l'environnement peut avoir lieu dans divers endroits. Chaque emplacement et protocole d'échantillonnage sera associé à ses propres risques. Il est important de procéder à une évaluation de ces risques et de mettre en place des mesures de contrôle appropriées avant de procéder à tout échantillonnage.

Exemples de dangers:

- Sols humides présentant un risque de glissade
- Travailler en hauteur lorsque des échelles / marches sont nécessaires pour atteindre les points d'échantillonnage
- Travailler dans des espaces confinés lors de l'échantillonnage de pièces mécaniques difficiles à atteindre
- Exposition aux aérosols lors de l'échantillonnage des tours de refroidissement et des douches
- Exposition à des produits chimiques irritants, corrosifs ou toxiques
- Exposition à des pièces mécaniques en mouvement
- Travailleurs isolés dans des zones telles que des locaux techniques

A. Échantillonnage d'un liquide en contenant (bouteille, flacon, robinet, cuve de stockage...)

1. Attraper la poignée entre l'index et le majeur, avec la languette coté arrière de la main. La dégager de la chambre (facilité par un mouvement d'avant en arrière de la poignée). Tenir ensuite la chambre entre le pouce et l'index. En procédant ainsi, une main est libre pour manipuler les contenant d'échantillon ou et d'autres actions de collecte d'échantillons.
2. Verser 18 ml d'échantillon dans la chambre, jusqu'à la marque haute
3. Si le niveau de l'échantillon dépasse 18 ml, incliner la chambre à un angle d'environ 45 °. L'excédent d'échantillon sera ainsi vidé.
4. Procéder aux tests comme suggéré ci-dessous

B. Échantillonnage à partir d'une vanne d'échantillonnage ou d'un point d'utilisation, par exemple, un robinet

1. Nettoyer ou désinfecter la vanne d'échantillonnage, par exemple avec un chiffon jetable propre (et du détergent si nécessaire) ou immerger l'extrémité du robinet dans une solution désinfectante appropriée pendant 2 à 3 minutes, puis rincer à débit élevé le port d'échantillonnage, par ex. pendant 1 minute ou 1 litre. Il est également possible d'utiliser un flacon laveur pour vaporiser un désinfectant approprié sur l'extérieur et l'intérieur du bec d'un robinet. Laisser agir 2-3 minutes avant de rincer.
2. Dégager la languette de la chambre comme indiqué ci-dessus (A.1)
3. Remplir la chambre jusqu'à la marque haute
4. Si le niveau de l'échantillon dépasse 18 ml, incliner la chambre à un angle d'environ 45 °. L'excédent d'échantillon sera ainsi vidé.
5. Procéder aux tests comme suggéré ci-dessous

C. Echantillonnage d'une masse liquide

1. Noter que cette procédure implique que la chambre du dispositif soit plongée dans le corps échantillonné, contaminant potentiellement le corps échantillonné avec des micro-organismes déposés sur la partie externe du dispositif pendant la manipulation ou avec des désinfectants si les surfaces extérieures de la chambre ont été décontaminées. Si le corps du liquide est destiné à la production, s'assurer que la procédure de prélèvement n'affecte pas négativement le processus.

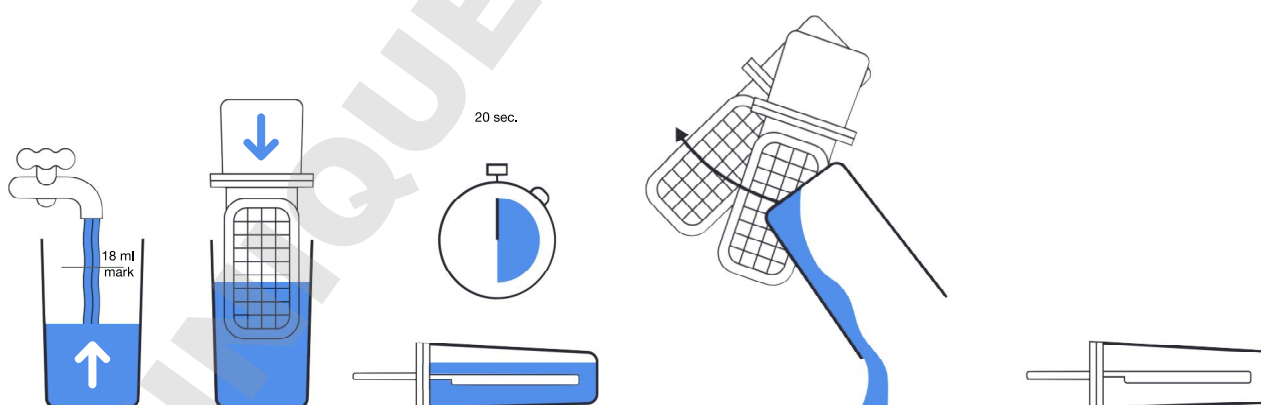
2. Noter que plonger la languettes directement dans le corps du liquide peut entraîner une dispersion inégale des micro-organismes sur la surface du filtre et affecter le résultat. Il est préférable de prélever l'échantillon dans la chambre, puis d'y plonger la languette.
3. Choisir un emplacement sur le plan d'eau, le plus représentatif possible de toute la masse d'eau. Un endroit/site approprié, lorsqu'un seul prélèvement est effectué, peut être l'endroit où la vitesse de l'eau sera probablement la plus basse et éloignée des entrées ou des sorties. Il peut être considéré de prélever des échantillons à partir de «points morts» potentiels dans la circulation eau / liquide, ou la contamination est potentiellement la plus élevée.
4. Ouvrir le dispositif. Attraper la poignée entre l'index et le majeur, avec la languette coté arrière de la main. La dégager de la chambre (facilité par un mouvement d'avant en arrière de la poignée). Tenir ensuite la chambre entre le pouce et l'index de l'autre main. En procédant ainsi, la main tenant la languette est libre pour d'autres actions associées à la collecte d'échantillons.
5. Immerger la chambre avec son ouverture dirigée vers le bas, dans l'eau avec un mouvement continu s'éloignant du corps et parallèlement au bord du plan d'eau, jusqu'à immersion complète (pour les grands plans d'eau, environ 200-400 mm) sous la surface, Incliner la chambre pour lui permettre de se remplir puis retirez-la de l'eau.
6. Incliner la chambre à un angle d'environ 45 °. L'excédent d'échantillon sera ainsi vidé.
7. Procéder aux tests comme suggéré ci-dessous

Instructions pour tester les échantillons liquides

1. Ouvrir l'emballage du testeur, en extraire le dispositif.
2. Écrire sur le boîtier du testeur avec un marqueur indélébile : la date, le type et le lieu de l'échantillonnage.
3. Retirer délicatement la "languette" de son boîtier. Pour faciliter le retrait de la languette, tenir la chambre du testeur avec la membrane face à vous et tirer la poignée vers vous. Si les deux mains sont nécessaires pour l'échantillonnage, attraper la poignée entre l'index et le majeur, avec la languette coté arrière de la main. La dégager de la chambre (facilité par un mouvement d'avant en arrière de la poignée). En procédant ainsi, la main tenant la languette est libre pour d'autres actions associées à la collecte d'échantillons.

Eviter de toucher la surface du filtre quadrillée à tout moment.

4. Verser l'échantillon de liquide dans la chambre en remplissant jusqu'au repère supérieur de 18 ml.
5. Placer la languette sur la chambre et la laisser tomber dans le liquide. Enfoncer la languette fermement dans la chambre et poser le dispositif horizontalement avec la membrane vers le bas sur une surface plane. S'assurer que la membrane est uniformément mouillée. Le dispositif ne doit pas être agité pendant cette étape. Attendre 20 secondes pour que l'échantillon soit aspiré à travers le filtre et s'assurer que la bulle sortant de l'évent ait cessé de grossir avant de retirer la languette de l'échantillon. Le filtre doit apparaître en gris uniforme. Si l'échantillon est visqueux, la languette doit rester dans la chambre plane pendant un temps supplémentaire (jusqu'à 2 minutes).
6. Enlever la languette et, en tenant fermement la poignée, éliminer l'excès de liquide en secouant vigoureusement. Vider la chambre et réinsérer la languette. Pour éviter que la languette ne se dessèche pendant l'incubation, l'enfoncer fermement dans le chambre pour former un joint hermétique.
7. Incuber le testeur, filtre en bas, en se basant par défaut, sur la durée et la température indiquées dans le tableau du "Guide de culture-incubation".
8. Pour le dénombrement des colonies, se reporter à la section «Guide de comptage des colonies».



Guide de culture-incubation

Lors de l'utilisation du testeur bleu, c'est-à-dire lors de l'analyse des coliformes, il faut respecter la durée et la température indiquées ci-dessous. Les autres testeurs peuvent être incubés à d'autres températures que celles indiquées ci-dessous, par exemple à température ambiante, à condition que cette température soit suivie de manière constante. Les points médians de ces plages sont préférables.

Le temps d'incubation (sauf les coliformes) doit être d'au moins 48 heures.

Les périodes d'incubation excédant celles indiquées seront dictées par des contraintes pratiques.

La période d'incubation doit être reproductible d'une fois à l'autre pour un même test.

Incubation		
	Température (°C / °F)	Durée (Heures)
Bleu (Coliformes)	35 / 95	22-24
Rouge (Flore Totale)	25 / 77	72
ou	35 / 95	48
Microorganismes stressés par un traitement thermique, chimique ou manque de nutriments.	Température ambiante	3-7 jours
Jaune (Levures et Moisissures)	28 / 82	72
ou	32 / 90	48

Guide de dénombrement des colonies

- Une fois l'incubation terminée, retirer la languette de sa chambre et examiner la surface du filtre, de préférence à l'aide d'une loupe lumineuse (5X à 10 X).
- Un smartphone peut également être utilisé comme loupe, de l'une des deux manières suivantes:
- Utilisation de la fonction appareil photo avec zoom maximal
- Prendre une photo à une distance de 4 pouces ou de 10 cm, puis zoomer sur la photo. Cette approche permet également de réaliser le dénombrement plus tard ou par une autre personne. S'assurer que la date, le type d'échantillon et le lieu d'échantillonnage marqués sur la poignée ou la chambre sont visibles sur la photo.
- L'apparence des colonies microbiennes variera en fonction du type de dispositif utilisé et des organismes récupérés.
- Généralement ils apparaîtront comme suit:

Testeurs **nomad** Bleus:

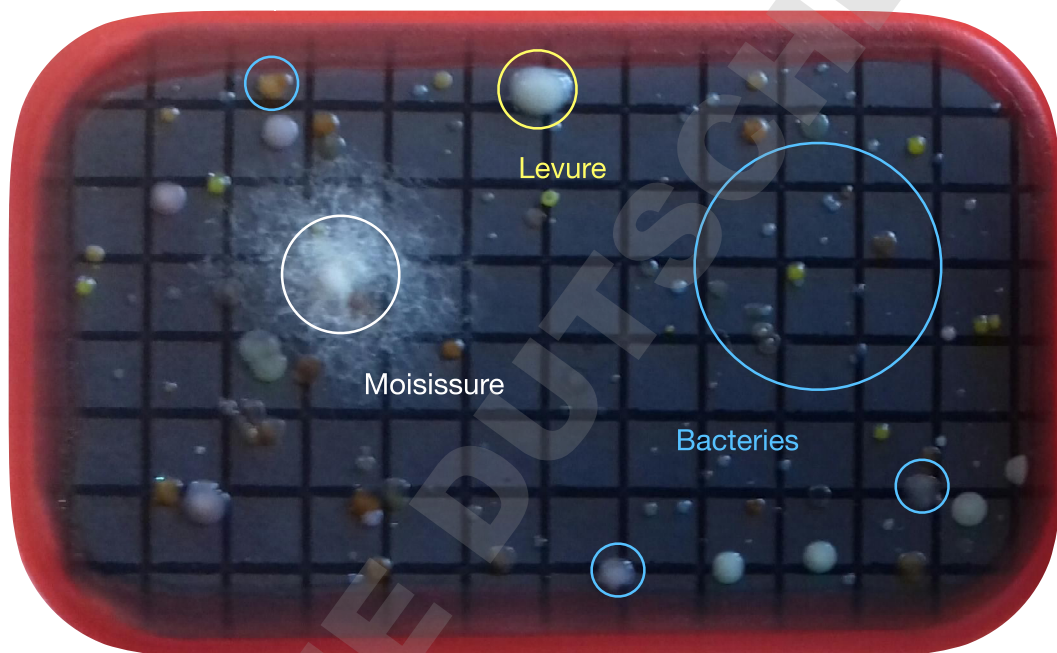
- Les colonies de coliformes sont bleues ou bleues / vertes.
- Les colonies non coliformes peuvent être vertes, grises ou crème.

Testeurs **nomad** Rouges:

- Les colonies de bactéries apparaissent luisantes et translucides ou transparentes, de forme circulaire ou irrégulière, avec des couleurs variant de incolore à blanc, jaune crème ou parfois pigmentées.
- Les colonies de moisissures apparaissent souvent gris filamenteux blanchâtre, avec des bords flous. Ils se transforment généralement en une couleur différente, du centre vers l'extérieur
- Les colonies de levure apparaissent satinées, opaques, de couleur blanche ou peuvent devenir vertes avec le temps.

Testeurs **nomad** Jaunes:

- Les colonies de moisissures apparaissent blanches, vertes ou brunes / noires et filamenteuses.
- Des colonies bactériennes peuvent apparaître mais sont généralement plus petites et plus brillantes et transparentes que les colonies de levure.



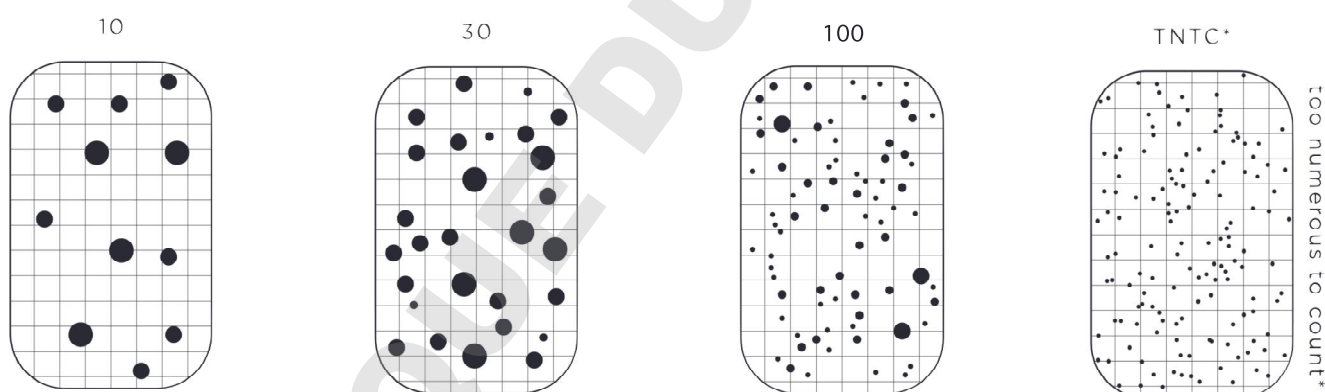
Dénombrement des colonies

- Les colonies qui poussent à la surface du filtre sont comptées comme des organismes individuels.
- En enregistrant votre dénombrement avec le testeur bleu pour les coliformes, ne compter que les colonies bleues.
Les coliformes et les coliformes fécaux sont généralement rapportés sous forme d'un nombre par échantillon de 100 ml. Par conséquent, dans les échantillons non dilués, compter le nombre de colonies bleues obtenues et multiplier ce résultat par 100. Si l'échantillon est dilué, multiplier le nombre de 100 ml et par le facteur de dilution approprié.
- Pour tous les autres échantillons, le nombre par ml est généralement accepté pour l'enregistrement des résultats. Par conséquent, pour les échantillons non dilués, le nombre de colonies observées sur le filtre sera le nombre enregistré sous la forme : nombre de c.f.u. / ml.
Pour les échantillons dilués, le nombre obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution.

Par exemple:

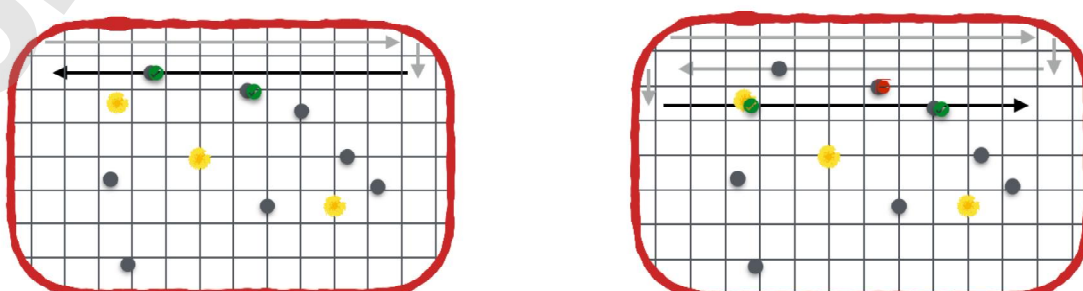
- Nombre de colonies sur le filtre = 60
- Dilution de l'échantillon = 1:10 (le facteur de dilution est 10)
- Nombre par mL d'échantillon = $60 \times 10 = 600$ u.f.c. / ml (unités formant colonies)

Une estimation rapide du nombre d'u.f.c. peut être réalisée en comparant le filtre aux exemples présentés ci-dessous.



Technique de comptage précise

En partant d'un coin du filtre quadrillé, suivre les quadrillages dans le sens de la longueur et compter les colonies rencontrées. Lorsqu'une colonie s'est développée sur une ligne, pour éviter les doubles comptages, ne compter la colonie que la première fois, c'est-à-dire lors du premier passage.



Sinon, en partant d'un coin du filtre quadrillé, suivre les quadrillages dans le sens de la longueur et, à l'aide d'un stylo multi-surface, marquer chaque position de colonie par un point sur la chambre. Une fois que toute la surface du filtre a été observée, compter les points.

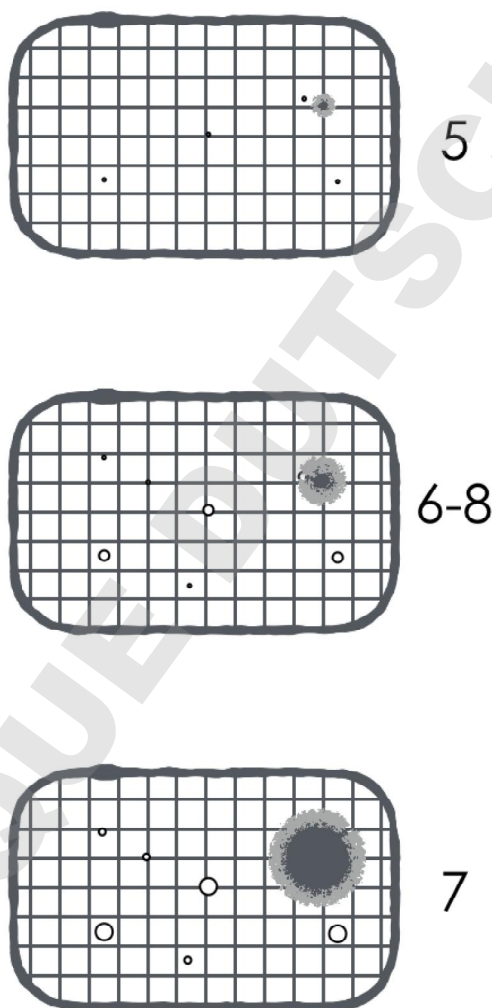
Lectures multiples

Certaines populations de micro-organismes croissent plus vite que d'autres.

Pour améliorer la qualité du résultat, il peut être souhaitable d'effectuer des lectures supplémentaires à des périodes d'incubation correspondant aux 2/3 et 4/3 de la durée d'incubation recommandée.

Ces lectures supplémentaires permettent:

- d'améliorer le dénombrement des populations à croissance lente dont les colonies sont difficiles à voir et à dénombrer après une période d'incubation normale
- de réduire les dénombrements équivoques du fait que certaines colonies à croissance rapide se chevauchent, se rejoignent ou se confondent avec d'autres.



Dans cette illustration, les observations sont effectuées sur un testeur pour flore totale incubé à température ambiante.

Avant la période d'incubation recommandée, une moisissure s'est développée rapidement et a potentiellement envahi une colonie de bactéries à proximité.

En outre, une petite colonie est apparue tardivement, proche d'une ligne, et pourrait être négligée.

Le décompte final est de 8, alors que 8 colonies individuelles ne sont faciles à observer sur aucune des lectures individuelles.

Dans ce cas, l'utilisation d'un marqueur multi-surface pour marquer chaque colonie avec un point est recommandée.

Guide d'achat

Testeurs nomad pour liquides

Description	Couleur	Qté/Pk	Référence
Testeur Flore Totale	Rouge	25	NTRD TTC 25
Testeur Coliformes	Bleu	25	NTRD COL 25
Testeurs Levures et Moisissures	Jaune	25	NTRD YM0 25

Kits écouvillon nomad pour surfaces

Description	Couleur	Qté/Pk	Référence
Kit Testeur Flore Totale et écouvillon dans tampon de neutralisation stérile	Rouge	25	NTRK TTC 25
Kit Testeur Coliformes et écouvillon dans tampon de neutralisation stérile	Bleu	25	NTRK COL 25
Kit Testeur levures et Moisissures et écouvillon dans tampon de neutralisation stérile	Jaune	25	NTRK YM0 25
Ecouvillon dans tampon de neutralisation stérile	Translucide	25	NTRD SWB 25

Remarque: ce guide est censé être complet et précis au moment de sa publication. Il peut être sujet à changement sans préavis. Ce document ne constitue aucun engagement de quelque nature que ce soit de la part de Pinqkerton, qui ne saurait être tenu responsable des dommages accessoires ou indirects liés à l'utilisation de ce manuel.