

NORME
INTERNATIONALE

ISO
8523

Première édition
1991-10-01

**Microbiologie — Directives générales pour la
recherche des *Enterobacteriaceae* avec
pré-enrichissement**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Microbiology — General guidance for the detection of
Enterobacteriaceae with pre-enrichment*

ISO 8523:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ea0d3e0d-0afe-4511-ae5a-cac75e7c48c0/iso-8523-1991>



Numéro de référence
ISO 8523:1991(F)

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 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.

La Norme internationale ISO 8523 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ea0d3e0d-0afe-4511-ae5a-cac75e7c48c0/iso-8523-1991>

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale.

© ISO 1991

Droits de reproduction réservés. 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'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Introduction

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen microbiologique de produits alimentaires non concernés par les Normes internationales existant actuellement et pour être prises en considération par les organismes élaborant des méthodes d'essai microbiologiques destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux.

En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes.

Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois qu'il sera possible, les directives données et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec ces directives. Dans le cas où d'autres Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, elles devront être appliquées¹⁾ Cependant, il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles vraiment nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

Afin de s'adapter aux usages nationaux, cette méthode donne le choix entre la température d'incubation de 35 °C ou de 37 °C.

NOTE 1 La technique décrite dans la présente Norme internationale peut être appliquée en vue d'un dénombrement pour la technique NPP. Pour cela, il est nécessaire de réaliser l'essai présence-absence décrit dans la présente Norme internationale en double à différentes dilutions, par exemple comme décrit dans la spécification du produit. Pour l'interprétation des résultats, il convient d'utiliser les tables de l'ISO 7218.

1) Pour les viandes et produits à base de viande, voir ISO 5552:1979, *Viandes et produits à base de viande — Recherche et dénombrement des Enterobacteriaceae (Méthodes de référence)*.

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8523:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ea0d3e0d-0afe-4511-ae5a-cac75e7c48c0/iso-8523-1991>

Microbiologie — Directives générales pour la recherche des *Enterobacteriaceae* avec pré-enrichissement

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales en vue de la recherche des *Enterobacteriaceae* avec pré-enrichissement pour les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

2 Référence normative

La norme suivante contient des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, l'édition indiquée était en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente de la norme indiquée ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 7218:1985, *Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques*.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

3.1 *Enterobacteriaceae*: Micro-organismes fermentant le glucose et donnant une réaction oxydase négative lorsque l'essai est effectué selon la méthode prescrite dans la présente Norme internationale.

3.2 recherche des *Enterobacteriaceae*: Détermination de la présence ou de l'absence de ces micro-organismes dans une quantité déterminée de produit, lorsque les essais sont effectués selon la méthode prescrite dans la présente Norme internationale.

4 Principe

En général, la recherche des *Enterobacteriaceae* nécessite quatre étapes successives (voir aussi annexe A).

4.1 Pré-enrichissement en milieu non-sélectif liquide

Ensemencement de la prise d'essai dans l'eau peptonée tamponnée (servant également de diluant), puis incubation à 35 °C ou 37 °C pendant 16 h à 20 h.

La température doit faire l'objet d'un accord entre les parties concernées et doit être notée dans le rapport d'essai.

4.2 Enrichissement en milieu sélectif liquide

À partir de la culture obtenue en 4.1, ensemencement d'un bouillon d'enrichissement.

Incubation à 35 °C ou 37 °C, selon accord, pendant 24 h.

4.3 Isolement et identification

À partir des cultures obtenues en 4.2, ensemencement d'un milieu sélectif solide (gélose à la bile, au cristal violet et au glucose).

Incubation à 35 °C ou 37 °C, selon accord, puis examen après 24 h, pour contrôler s'il y a présence de colonies d'*Enterobacteriaceae* présumées en raison de leurs caractéristiques.

4.4 Confirmation

Repiquage des colonies d'*Enterobacteriaceae* présumées (4.3) sur milieu non sélectif, et confirmation au moyen des essais biochimiques appropriés.

5 Milieux de culture et réactifs

5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218.

5.2 Milieux de culture

5.2.1 Eau peptonée tamponnée (Milieu de pré-enrichissement non sélectif).

5.2.1.1 Composants

Peptone	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogénophosphate de sodium (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	9,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Eau	1 000 ml

5.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu aseptiquement dans des flacons de capacité adéquate (6.5), de façon à avoir les quantités nécessaires pour l'essai.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 20 min.

5.2.2 Bouillon tamponné à la bile, au vert brillant et au glucose (milieu EE) (milieu d'enrichissement).

5.2.2.1 Composants

Peptone	10,0 g
Glucose	5,0 g
Hydrogénophosphate de sodium (Na ₂ HPO ₄)	6,45 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	2,0 g
Bile de bœuf desséchée	20,0 g
Vert brillant	0,015 g
Eau	1 000 ml

5.2.2.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant le tout à ébullition. Ne pas chauffer le milieu plus de 30 min. Refroidir le milieu rapidement.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après ébullition il soit de 7,2 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture par quantités de 10 ml dans des tubes stériles (6.5).

Ne pas stériliser le milieu.

Le milieu peut être conservé 1 semaine au maximum entre 0 °C et + 5 °C.

5.2.3 Gélose à la bile, au cristal violet et au glucose.

5.2.3.1 Composants

Peptone	7,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Sels biliaires	1,5 g
Glucose	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,002 g
Agar-agar	8 g à 18 g ¹⁾
Eau	1 000 ml

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

5.2.3.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant le tout à ébullition.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après ébullition il soit de 7,4 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture dans des tubes ou dans des flacons stériles (6.5) de 500 ml de capacité maximale.

Ne pas stériliser le milieu.

Préparer ce milieu extemporanément.

5.2.3.3 Préparation des boîtes de gélose

Transférer immédiatement environ 15 ml du milieu de culture, refroidi à environ 45 °C dans des boîtes de Petri (6.7), et laisser se solidifier.

Juste avant l'emploi, sécher les boîtes de gélose, de préférence couvercle enlevé et la surface de la

gélose tournée vers le bas, dans une étuve (6.3), jusqu'à séchage de la surface de la gélose.

Si elles ont été préparées à l'avance, les boîtes de gélose non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température ambiante ou plus de 1 jour entre 0 °C et + 5 °C.

5.2.4 Gélose nutritive.

5.2.4.1 Composants

Extrait de viande de bœuf	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar-agar	8 g à 18 g ¹⁾
Eau	1 000 ml
1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

5.2.4.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des flacons (6.5) de 500 ml de capacité maximale.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 20 min.

5.2.4.3 Préparation des boîtes de gélose

Transférer des quantités d'environ 15 ml du milieu de culture, fondu puis refroidi à environ 45 °C, dans des boîtes de Petri (6.7) et laisser se solidifier.

Juste avant l'emploi, sécher les boîtes de gélose, de préférence couvercle enlevé et la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve (6.3) jusqu'à séchage de la surface de la gélose.

Si elles ont été préparées à l'avance, les boîtes de gélose non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température ambiante ou plus de 1 jour entre 0 °C et + 5 °C.

5.2.5 Gélose glucosée.

5.2.5.1 Composants

Tryptone	10,0 g
Extrait de levure	1,5 g
Glucose	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Pourpre de bromocrésol	0,015 g
Agar-agar	8 g à 18 g ¹⁾
Eau	1 000 ml
1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

5.2.5.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture par quantités de 15 ml dans des tubes (6.5).

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 20 min.

Maintenir les tubes en position verticale.

Le milieu peut être conservé 1 semaine au maximum entre 0 °C et + 5 °C.

Juste avant l'emploi, chauffer dans de l'eau bouillante ou sous courant de vapeur pendant 15 min, puis refroidir rapidement à la température d'incubation.

5.3 Réactif pour l'essai à l'oxydase

5.3.1 Composants

Dichlorhydrate de <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl- <i>p</i> -phénylène diamine	1,0 g
Eau	1 000 ml

5.3.2 Préparation

Dissoudre le réactif dans l'eau froide.

Préparer le réactif immédiatement avant usage.

NOTE 2 Des disques prêts à l'emploi peuvent être utilisés.

6 Appareillage et verrerie

NOTE 3 Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment:

6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

Voir l'ISO 7218.

6.2 **Étuve**, réglable à $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ou $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, selon la température convenue.

6.3 **Enceinte de séchage ou étuve**, réglable entre $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $55\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.4 **Bain d'eau**, réglable à $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.5 **Réceptacles**, par exemple, tubes à essais, fioles et flacons convenant pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture.

6.6 **Tubes à essais**, de dimensions $16\text{ mm} \times 160\text{ mm}$ et $20\text{ mm} \times 200\text{ mm}$, ou fioles de capacité appropriée.

6.7 **Boîtes de Petri**, en verre ou en matière plastique, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

6.8 **Anse bouclée**, d'un diamètre d'environ 3 mm, et **fil droit** en platine iridié ou en nickel-chrome, et/ou **baguette** de verre.

NOTE 4 L'attention est attirée en 9.5.4.1 sur le fait que le nickel-chrome ne convient pas pour l'essai à l'oxydase.

6.9 **Pipettes graduées**, à écoulement total, de capacité nominale de 1 ml graduées en 0,1 ml et dont l'orifice d'écoulement a un diamètre de 2 mm à 3 mm.

6.10 **pH-mètre**, précis à $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C .

7 Échantillonnage

L'échantillonnage doit avoir été effectué conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de Norme internationale spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique du produit

concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire (voir figure A.1 — annexe A)

9.1 Généralités

À titre de guide pour mettre en œuvre le mode opératoire, voir l'ISO 7218.

9.2 Prise d'essai et suspension mère

Pour la préparation de la suspension mère, utiliser le milieu de pré-enrichissement (5.2.1) comme diluant.

En général, pour préparer la suspension mère, introduire une prise d'essai de 1 g dans le tube contenant 10 ml du milieu de pré-enrichissement (5.2.1), ce qui correspond au rapport prise d'essai/milieu de pré-enrichissement spécifié dans la présente méthode. Une dilution de 10^{-1} est ainsi obtenue.

Si la prise d'essai prescrite n'est pas de 1 g, utiliser la quantité nécessaire de milieu de pré-enrichissement pour obtenir approximativement une dilution de 10^{-1} (masse à volume). Par exemple, si l'on doit examiner 0,1 g du produit, introduire 1 ml d'une dilution de 10^{-1} de l'échantillon pour essai dans un tube contenant 10 ml de milieu de pré-enrichissement.

NOTE 5 Les produits alimentaires séchés, en poudre, peuvent nécessiter une opération de réhydratation spéciale pour améliorer le recouvrement des *Enterobacteriaceae*. Consulter à cet effet la Norme internationale relative au produit examiné. En l'absence d'une telle norme, il est recommandé que les parties concernées parviennent à un accord à ce sujet.

9.3 Pré-enrichissement non sélectif

Incuber la suspension mère ou la prise d'essai (9.2) à 35 °C ou 37 °C pendant au moins 16 h et au plus 20 h. La température doit faire l'objet d'un accord entre les parties concernées et doit être notée dans le rapport d'essai.

9.4 Enrichissement sélectif

9.4.1 Transférer 1 ml de la culture obtenue en 9.3 dans un tube contenant 10 ml du milieu d'enrichissement (5.2.2).

9.4.2 Incuber le milieu ensemencé (9.4.1) à 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 18 h à 24 h.

9.5 Isolement et identification

9.5.1 Ensemencement

Ensemencer, en stries, une anse (6.8) du milieu d'enrichissement incubé (9.4.2) sur le milieu sélectif (5.2.3) et incubé la boîte pendant 24 h à 35 °C ou 37 °C (selon accord).

9.5.2 Sélection des colonies pour confirmation

À partir de chacune des boîtes incubées (9.5.1) présentant un développement de colonies caractéristiques rouge-foncé (avec un halo de précipité rouge foncé), prélever au hasard cinq de ces colonies en vue des essais de confirmation biochimique (9.5.4) à effectuer après une sub-culture (9.5.3).

NOTE 6 Certains *Enterobacteriaceae* peuvent provoquer une décoloration de leurs colonies et du milieu. Par conséquent, si aucune colonie typique n'est présente, prélever cinq colonies blanchâtres pour confirmation.

9.5.3 Sub-culture des colonies sélectionnées

Ensemencer, en stries, sur des boîtes de gélose nutritive (5.2.5) chacune des colonies sélectionnées en vue de la confirmation (9.5.2).

Incuber ces boîtes pendant 24 h à 35 °C ou 37 °C (selon accord).

Sélectionner une colonie bien isolée à partir de chacune des boîtes incubées en vue des essais de confirmation biochimique (9.5.4).

9.5.4 Essais de confirmation biochimique

9.5.4.1 Essai à l'oxydase

À l'aide d'une anse bouclée ou d'un fil en platine iridié ou d'une baguette de verre (6.8), prendre une fraction de chacune des colonies bien isolées (9.5.3) et la déposer en stries sur le papier filtre humecté de réactif à l'oxydase (5.3) ou sur un disque

disponible dans le commerce. Il ne faut pas utiliser d'anse en nickel-chrome, ni de fil métallique.

Considérer l'essai comme négatif si la couleur du papier filtre humecté de réactif n'a pas viré dans les 10 s.

Pour les disques prêts à l'emploi, se conformer aux indications du fabricant.

9.5.4.2 Essai de fermentation

Repiquer les mêmes colonies que celles mentionnées en 9.5.4.1 par piqûre à l'aide d'un fil droit (6.8), dans des tubes contenant le milieu glucosé (5.2.4). Incuber ces tubes pendant 24 h à 35 °C ou 37 °C (selon accord).

Si une couleur jaune se développe dans la totalité du contenu du tube, la réaction est considérée comme positive.

10 Expression des résultats

Si l'une des colonies caractéristiques (9.5.2) est oxydase-négative et glucose-positif, la prise d'essai doit être considérée comme renfermant des *Enterobacteriaceae*.

Selon les résultats obtenus aux essais de confirmation, indiquer «présence ou absence d'*Enterobacteriaceae*, selon la quantité examinée, dans x g de produit» (c'est-à-dire d'*Enterobacteriaceae* en fonction de la quantité de produit examiné).

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée, la température d'incubation et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.