

NORME
INTERNATIONALE

ISO
10272

Première édition
1995-10-15

**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour la recherche de
Campylobacter thermotolérants**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
detection of thermotolerant Campylobacter*

ISO 10272:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6e72f560-0ff-f443c-b8df-774147276589/iso-10272-1995>



Numéro de référence
ISO 10272:1995(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 10272 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Les annexes A et B font partie intégrante de la présente Norme internationale.

© ISO 1995

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'éditeur.

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

Imprimé en Suisse

Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que cette méthode horizontale ne convienne pas exactement, dans tous ses détails, 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, cette méthode horizontale, 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 cette méthode horizontale aura été suivie 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 être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales qui ne concordent pas avec cette méthode horizontale existent peut-être. Il serait souhaitable que, lorsque de telles normes viendront en révision, elles soient alignées sur la présente Norme internationale, si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10272:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6e72f560-0ff-f-443c-b8df-774147276589/iso-10272-1995>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche de *Campylobacter* thermotolérants

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode horizontale pour la recherche de *Campylobacter* thermotolérants.

La présente Norme internationale est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, avec les quelques restrictions signalées dans l'introduction.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent 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, les éditions indiquées étaient 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 les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique*.

ISO 7218:—¹⁾, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*.

3 Définitions

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

1) À publier. (Révision de l'ISO 7218:1985)

3.1 *Campylobacter* thermotolérants: Micro-organismes formant des colonies caractéristiques sur milieux sélectifs solides lorsqu'ils sont incubés à 42 °C et possédant la mobilité caractéristique et les propriétés biochimiques décrites lorsque l'essai est exécuté conformément à la présente Norme internationale.

3.2 recherche de *Campylobacter* thermotolérants: Détermination de la présence ou de l'absence de ces micro-organismes dans une quantité déterminée de produit, lorsque l'essai est exécuté conformément à la présente Norme internationale.

4 Principe

En général, la recherche de *Campylobacter* thermotolérants nécessite les phases suivantes (voir dans l'annexe A pour une représentation schématique du mode opératoire):

4.1 Enrichissement en milieu liquide

Ensemencement de la prise d'essai dans un des deux milieux d'enrichissement liquides suivants:

- bouillon de Preston, ou
- bouillon de Park et Sanders, lorsque l'échantillon ou le produit dont il est issu a subi un traitement physique, par exemple une congélation, pouvant entraîner un stress bactérien.

Incubation en atmosphère microaérophile (5 % d'oxygène et, par exemple, 10 % de dioxyde de carbone et 85 % d'azote):

- à 42° C pendant 18 h pour le bouillon de Preston;

— à 32 °C pendant 4 h, puis à 37 °C pendant 2 h et enfin, à 42 °C pendant 40 h à 42 h pour le bouillon de Park et Sanders.

NOTE 1 Sachant que les germes de *Campylobacter* sont particulièrement sensibles, il est recommandé de ne pas congeler les échantillons, de les conserver à $+3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et de mener l'analyse le plus rapidement possible.

4.2 Isolement et identification

À partir des cultures obtenues en 4.1, ensemencement de milieux solides:

— gélose Karmali et un autre milieu sélectif solide [gélose Butzler modifiée; gélose Skirrow; gélose à la céfopérazone, au charbon et au désoxycholate (CCDA) ou gélose Preston].

Incubation à 42 °C en atmosphère microaérophile (5 % d'oxygène et, par exemple, 10 % de dioxyde de carbone et 85 % d'azote) et examen après 48 h, 72 h et éventuellement, 5 jours, pour contrôler s'il y a présence de colonies présumées être des *Campylobacter* thermotolérants en raison de leurs caractéristiques visibles.

4.3 Confirmation

Repiquage des colonies présumées être des *Campylobacter* thermotolérants et qui ont été isolées en 4.2, puis confirmation au moyen d'essais biochimiques appropriés.

5 Milieux de culture et réactifs

5.1 Généralités

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

NOTE 2 En raison du nombre important de milieux de culture et de réactifs, il a été jugé préférable, pour la clarté du texte, de donner leur composition et leur préparation dans l'annexe B.

5.2 Milieux d'enrichissement liquides

5.2.1 Bouillon de Preston

Voir B.1.

5.2.2 Bouillon de Park et Sanders

Voir B.2.

5.3 Milieux d'isolement sélectifs

5.3.1 Gélose Karmali

Voir B.3.

5.3.2 Gélose Butzler modifiée

Voir B.4.

5.3.3 Gélose Skirrow

Voir B.5.

5.3.4 Gélose à la céfopérazone, au charbon et au désoxycholate (CCDA)

Voir B.6.

5.3.5 Gélose Preston

Voir B.7.

5.4 Milieux d'identification et réactifs

5.4.1 Bouillon *Brucella*

Voir B.8.

5.4.2 Gélose Columbia au sang

Voir B.9.

5.4.3 Réactif pour la recherche de l'oxydase

Voir B.10.

5.4.4 Gélose au citrate de fer(III) et aux trois sucres (gélose TSI)

Voir B.11.

5.4.5 Solution de peroxyde d'hydrogène, à 3 %

5.4.6 Réactifs pour la recherche de l'hydrolyse de l'hyppurate

Voir B.12.

5.4.7 Gélose Mueller Hinton au sang

Voir B.13.

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, en particulier, ce qui suit.

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

Voir l'ISO 7218.

6.2 Enceinte de séchage ou étuve, ventilée par convection, réglable entre $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $55\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.3 Étuve, réglable à $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.4 Bains d'eau, réglables à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $32\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ou **étuves** réglables à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $32\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.5 Bain d'eau, réglable à $47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.6 pH-mètre, ayant une précision de lecture de $\pm 0,01$ unité de pH à 25 °C .

6.7 Récipients, notamment **tubes à essai** de $18\text{ mm} \times 180\text{ mm}$ et de $9\text{ mm} \times 180\text{ mm}$, **tubes à hémolyse** de $13\text{ mm} \times 75\text{ mm}$, **flacons** avec des fermetures métalliques non toxiques et/ou **fioles** de capacités appropriées, avec des couvercles appropriés ou fermés par des tampons de coton de façon à permettre un passage de gaz et à réaliser une atmosphère microaérophile, si nécessaire.

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

6.9 Pipettes à écoulement total, à larges ouvertures, de capacités nominales de 1 ml et 10 ml , graduées respectivement en $0,1\text{ ml}$ et $0,5\text{ ml}$, et **pipettes Pasteur**.

6.10 Poires en caoutchouc, ou tout autre système de sécurité pouvant s'adapter aux pipettes graduées.

6.11 Anses bouclées, d'environ 3 mm de diamètre, et **fils droits**, en platine iridié ou en nickel-chrome, ou **baguette de verre**.

NOTE 4 Le nickel-chrome ne convient pas pour l'essai de recherche de l'oxydase (voir 9.5.5.1).

6.12 Pincettes, fines, à bout rond, en acier inoxydable.

6.13 Microscope, si possible à contraste de phase (pour observer le mouvement caractéristique des *Campylobacter*).

6.14 Appareillage approprié, pour la culture en atmosphère microaérophile et permettant de maintenir des teneurs constantes en oxygène de 5% et, par exemple, en dioxyde de carbone de 10% et en azote de 85% tout au long de l'incubation.

NOTE 5 Il convient d'utiliser des récipients appropriés hermétiques capables de contenir les boîtes de Petri et/ou fioles ou flacons d'environ 350 ml de capacité, utilisés pour les milieux d'enrichissement; par exemple, flacons bactériologiques anaérobies. Une atmosphère microaérophile ayant une teneur en oxygène de 3% à 6% peut être obtenue en utilisant un appareillage de production de gaz disponible sur le marché (suivre précisément les instructions du fabricant, en particulier celles relatives au volume du flacon et à la capacité de l'appareillage). Alternativement, le barbotage des flacons avant l'incubation dans un mélange de gaz contenant 5% d'oxygène, 10% de dioxyde de carbone et 85% d'azote peut être effectué.

7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique sur l'échantillonnage du produit concerné, 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

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

9.1.1 Voir l'ISO 6887 et la Norme internationale concernant le produit à examiner.

9.1.2 En général, pour préparer la suspension mère, introduire une quantité x de prise d'essai (masse ou volume) dans un volume de $9x$ du milieu d'enrichissement, bouillon de Preston (5.2.1) ou bouillon de Park et Sanders (5.2.2), de façon à obtenir un rapport prise d'essai/milieu d'enrichissement de $1/10$ (rapport masse/volume ou volume/volume).

9.2 Isolement direct

Pour les produits suspectés de contenir une quantité importante de *Campylobacter* thermotolérants, procéder à un isolement en ensemencant à l'aide d'une anse bouclée (6.11), la suspension mère non incubée (9.1.2) sur la surface de la gélose Karmali (5.3.1) et d'un autre milieu (5.3.2, 5.3.3, 5.3.4 ou 5.3.5).

Incuber à 42 °C en atmosphère microaérophile (6.14) et examen après 48 h, 72 h et, éventuellement, 5 jours, pour contrôler s'il y a présence de colonies présumées être des *Campylobacter* thermotolérants.

Procéder ensuite comme décrit en 9.4.3 et 9.5.

9.3 Enrichissement

9.3.1 Si le bouillon de Preston est utilisé, incuber la suspension mère (9.1.2) à 42 °C en atmosphère microaérophile (6.14) pendant 18 h.

9.3.2 Si le bouillon de Park et Sanders est utilisé, incuber la suspension mère (9.1.2) à 32 °C en atmosphère microaérophile (6.14) pendant 4 h, puis ajouter la solution d'antibiotiques B (B.2.4) à une concentration de 5 % (V/V). Incuber à 37 °C en atmosphère microaérophile pendant 2 h, puis à 42 °C pendant 40 h à 42 h.

9.4 Isolement et identification

9.4.1 Ensemencer, à l'aide d'une anse bouclée (6.11), la surface du premier milieu d'isolement sélectif, la gélose Karmali (5.3.1), avec la culture obtenue dans le milieu d'enrichissement (9.3.1 ou 9.3.2).

Opérer de même avec le second milieu d'isolement sélectif choisi (5.3.2, 5.3.3, 5.3.4 ou 5.3.5).

9.4.2 Incuber les boîtes (9.4.1) à 42 °C en atmosphère microaérophile (6.14).

9.4.3 Après 24 h, ou plus généralement, 48 h et même 3 jours à 5 jours d'incubation, examiner les boîtes afin de rechercher la présence de colonies caractéristiques de *Campylobacter* thermotolérants.

Sur la gélose Karmali, les colonies caractéristiques sont grises, humides et plates, avec une tendance à l'étalement. Sur les géloses Butzler et Skirrow, les colonies caractéristiques apparaissent grises à brunes, et peuvent être de tailles différentes sur les deux milieux.

9.5 Confirmation

Comme les germes ne survivent qu'en atmosphère microaérophile, appliquer le mode opératoire décrit de 9.5.1 à 9.5.2.4 sans délai.

9.5.1 Sélection des colonies pour la confirmation

Sélectionner pour les essais de confirmation, un total de cinq colonies typiques et/ou suspectes sur l'ensemble des boîtes ensemencées (9.2, 9.4.3). S'il y en a moins de cinq, retenir toutes les colonies.

9.5.2 Examen de la morphologie et de la mobilité

9.5.2.1 À partir d'une colonie bien isolée, réaliser une coloration de Gram sur chacune des boîtes (9.4.3).

9.5.2.2 Mettre en suspension séparément chacune des colonies sélectionnées en 9.5.1 dans 1 ml de bouillon *Brucella* (5.4.1).

9.5.2.3 Examiner au microscope (6.13) la morphologie et la mobilité de chacune des colonies retenues.

9.5.2.4 Retenir, pour les observations ultérieures, toutes les suspensions (9.5.2.2) dans lesquelles on observe des bacilles incurvés Gram négatif (9.5.2.1) dont le mouvement de déplacement en vrille est caractéristique (9.5.2.3).

9.5.3 Examen de la morphologie sur une culture de Gram

Ensemencer, à l'aide d'une anse bouclée (6.11), la surface d'une gélose Columbia au sang (5.4.2) avec chaque suspension retenue (9.5.2.4) afin de permettre le développement de colonies bien isolées.

Incuber les boîtes ensemencées à 42 °C en atmosphère microaérophile (6.14) pendant 24 h et utiliser les cultures pures pour les essais biochimiques.

9.5.4 Examen de la croissance à 25 °C

À partir des colonies isolées en 9.5.3, ensemencer, à l'aide d'une anse bouclée (6.11), un tube de bouillon *Brucella* (5.4.1).

Incuber à 25 °C en atmosphère microaérophile (6.14) pendant 2 jours à 5 jours.

Examiner s'il y a ou non croissance.

9.5.5 Essais biochimiques

9.5.5.1 Recherche de l'oxydase

À l'aide de l'anse bouclée ou d'un fil en platine iridié ou d'une baguette de verre (6.11), prendre une fraction de colonie bien isolée de chaque boîte (9.5.3) et la déposer en stries sur un papier filtre humecté de réactif pour la recherche de l'oxydase (5.4.3). L'apparition d'une couleur bleue intense, mauve ou violette dans les 10 s indique une réaction positive. Si un test de l'oxydase disponible dans le commerce est utilisé, suivre les instructions du fabricant.

Confirmer les résultats avec des contrôles positifs ou négatifs.

9.5.5.2 Gélose TSI (5.4.4)

À l'aide du fil (6.11), ensemencer la gélose avec chacune des colonies sélectionnées en 9.5.3.

Ensemencer en stries longitudinales la pente du milieu et le culot par piqure jusqu'au fond de la gélose.

Incuber à 42 °C en atmosphère microaérophile (6.14) pendant 24 h et prolonger jusqu'à 5 jours si nécessaire.

Interpréter les réactions de la façon suivante: [ISO 10272:1995](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6e72f560-0ff1-443c-b8df-774147276589/iso-10272-1995)

Culot

Jaune	glucose positif (fermentation du glucose)
Rouge ou inchangé	glucose négatif (pas de fermentation du glucose)
Noir	formation de sulfure d'hydrogène (H ₂ S)
Bulles ou fissures	formation de gaz à partir du glucose

Pente de la gélose

Jaune	lactose et/ou saccharose positifs [un ou les deux sucres utilisé(s)]
Rouge ou inchangée	lactose et saccharose négatifs (aucun sucre utilisé)

9.5.5.3 Recherche de la catalase

Déposer une anse de culture prélevée sur la gélose (9.5.5.2) dans une goutte de solution de peroxyde d'hydrogène (5.4.5) sur une lame porte-objet propre.

L'essai est positif si des bulles apparaissent dans les 30 s.

9.5.5.4 Recherche de la sensibilité à l'acide nalidixique et à la céphalotine²⁾

Ensemencer, à l'aide d'une anse bouclée (6.11), les colonies isolées en 9.5.2.4 dans une suspension de densité 0,5 sur l'échelle de Mac Farland dans le bouillon *Brucella*.

Diluer ensuite cette suspension au 1/10 dans le même bouillon.

Inonder la surface d'une boîte de gélose Mueller Hinton à 5 % de sang (5.4.7) avec la suspension.

Laisser en contact 5 min, puis rejeter l'excès de suspension.

Sécher les boîtes à l'étuve (6.2) à 37 °C pendant 10 min.

Placer à la surface de la gélose un disque d'acide nalidixique (30 µg) et un disque de céphalotine (30 µg).

Incuber à 37 °C en atmosphère microaérophile (6.14) pendant 24 h.

Interpréter la croissance bactérienne de la façon suivante: [ISO 10272:1995](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6e72f560-0ff1-443c-b8df-774147276589/iso-10272-1995)

— une croissance au contact du disque est classée comme **résistante**;

— une présence d'une zone d'inhibition de la croissance (quelle que soit l'importance de la zone) est classée comme **sensible**.

9.5.5.5 Recherche de l'hydrolyse de l'hippurate²⁾

Dans un tube à hémolyse (6.7) contenant 0,4 ml de la solution d'hippurate de sodium (5.4.6), ensemencer, à l'aide d'une anse bouclée (6.11), les colonies isolées en 9.5.3, en prenant soin de ne pas incorporer de gélose.

Agiter pour homogénéiser et incuber 2 h dans un bain d'eau (6.4) réglé à 37 °C.

Ajouter avec précaution 0,2 ml de la solution de ninhydrine (B.12.2) au-dessus de la solution d'hippurate de sodium. Ne pas agiter.

Interpréter, après une nouvelle incubation de 10 min dans un bain d'eau réglé à 37 °C.

2) Ces essais sont adaptés pour différencier les espèces *Campylobacter* thermotolérants.

Une couleur violette foncée indique une réaction positive.

Une couleur violette pâle ou l'absence de changement de couleur indique une réaction négative.

9.6 Interprétation des résultats

Les *Campylobacter* thermotolérants donnent les résultats suivants:

Campylobacter spp.

Morphologie (9.5.2.3)	petits bacilles incurvés
Mobilité (9.5.2.3)	caractéristique
Gram (9.5.3)	—
Oxydase (9.5.5.1)	+
Glucose (9.5.5.2)	—
Lactose (9.5.5.2)	—
Saccharose (9.5.5.2)	—
Gaz (9.5.5.2)	—

Conclure à la présence de *Campylobacter* spp. si une colonie au moins présente les caractéristiques ci-dessus.

Parmi les *Campylobacter* spp. présentant une croissance à 42 °C, certaines espèces constituent le groupe des thermotolérants dont les plus fréquemment rencontrés sont les *Campylobacter jejuni* et les

Campylobacter coli. Cependant, d'autres espèces ont été décrites (*Campylobacter lari* et *Campylobacter upsaliensis*); les caractéristiques données dans le tableau 1 permettent de les différencier.

10 Expression des résultats

Selon l'interprétation des résultats, indiquer la présence ou l'absence de *Campylobacter* thermotolérants dans une prise d'essai de x g ou x ml de produit.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer

- la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué, si elle est connue,
- la méthode utilisée,
- la température d'incubation choisie, et
- les résultats d'essai 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 d'essai.

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

Tableau 1

Caractéristiques	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Croissance à 25 °C (9.5.4)	—	—	—	—
H ₂ S (TSI) (9.5.5.2) ¹⁾	—	(+)	—	—
Acide nalidixique (9.5.5.4)	S	S	R	S
Hydrolyse de l'hippurate (9.5.5.5)	+	—	—	—
Catalase (9.5.5.3)	+	+	+	— ou faible
Céphalotine (9.5.5.4)	R	R	R	S

Légende: + = positif; — = négatif; (+) = faiblement positif; S = sensible; R = résistant.

1) Faible développement d'H₂S dans l'eau de condensation au bout de 5 jours.

Annexe A (normative)

Représentation schématique du mode opératoire

