

NORME
INTERNATIONALE

ISO
10273

Première édition
1994-12-15

**Microbiologie — Directives générales pour
la recherche des *Yersinia enterocolitica*
présumées pathogènes**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Microbiology — General guidance for the detection of presumptive
pathogenic Yersinia enterocolitica*

ISO 10273:1994

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a213a48-a779-41c5-af76-549fa3711162/iso-10273-1994>



Numéro de référence
ISO 10273:1994(F)

Sommaire

	Page
1	1
2	1
3	1
4	1
4.1	1
4.2	2
4.3	2
5	2
5.1	2
5.2	2
5.3	2
5.4	2
5.5	3
5.6	3
6	3
7	3
8	3
9	3
9.1	4
9.2	4
9.3	4
9.4	4
10	7
11	7

© ISO 1994

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

Annexes

A	Schéma du mode opératoire	8
B	Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs	9

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10273:1994

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a213a48-a779-41c5-af76-549fa3711162/iso-10273-1994>

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 10273 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.

ITeH STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 10273:1994

<https://standards.iteh.ai/en/standards/iso-10273-1994/iso-10273-1994-48-a779-41c5-af76-549fa3711162/iso-10273-1994>

Introduction

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen de produits non concernés par les Normes internationales existant actuellement, et à prendre en considération par les organismes élaborant des méthodes d'essais 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, ces directives, 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.

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a213a48-a779-41c5-af76-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a213a48-a779-41c5-af76-54963711162/iso-10273-1994)

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, qui ne concordent pas avec ces directives, existent peut-être déjà. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à essayer, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles 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 10273:1994

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a213a48-a779-41c5-af76-549fa3711162/iso-10273-1994>

Microbiologie — Directives générales pour la recherche des *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales concernant la recherche des *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes pour l'homme.

La présente Norme internationale est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

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 — Règles générales pour les examens microbiologiques*.

3 Définitions

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

3.1 *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes: Bactéries psychrotrophes, formant des colonies caractéristiques sur milieux sélectifs possédant les propriétés biochimiques et répondant aux critères de pathogénicité décrits lorsque l'essai est réalisé selon la présente Norme internationale.

3.2 recherche des *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes: Détermination de la présence ou de l'absence de ces bactéries dans une quantité déterminée de produit, lorsque l'essai est réalisé selon la présente Norme internationale.

4 Principe

Recherche des *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes selon les trois phases successives suivantes.

4.1 Enrichissement en milieux sélectifs liquides

Ensemencement de la prise d'essai dans deux milieux d'enrichissement:

- bouillon à la peptone, au sorbitol et aux sels biliaires (PSB), et
- bouillon à l'irgasan, à la ticarcilline et au chlorate de potassium (ITC).

Incubation entre 22 °C et 25 °C pendant 48 h pour le bouillon ITC et pendant 3 à 5 jours pour le bouillon PSB.

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

4.2 Isolement et identification

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

- gélose à la cefsulodine, à l'irgasan et à la novobiocine (CIN) et,
- gélose *Salmonella/Shigella*, au désoxycholate de sodium et au chlorure de calcium (SSDC).

Incubation à 30 °C, puis examen après 24 h et, si nécessaire, après 48 h selon le milieu, pour contrôler s'il y a présence de colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica*.

4.3 Confirmation

Sur des colonies isolées, réalisation des essais présomptifs de *Yersinia enterocolitica*, suivis des essais de confirmation biochimiques, et de critères de pathogénicité et éventuellement sérologiques.

5 Milieux de culture et réactifs

5.1 Généralités

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

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, qui inclut également des détails concernant leur répartition, leur conservation, etc.

5.2 Milieux d'enrichissement

5.2.1 Bouillon à la peptone, au sorbitol et aux sels biliaires (PSB)

Voir B.1.

5.2.2 Bouillon à l'irgasan, à la ticarcilline et au chlorate de potassium (ITC)

Voir B.2.

5.3 Milieux d'isolement

5.3.1 Gélose à la cefsulodine, à l'irgasan et à la novobiocine (CIN)

Voir B.3.

5.3.2 Gélose *Salmonella/Shigella*, au désoxycholate de sodium et au chlorure de calcium (SSDC)

Voir B.4.

5.3.3 Gélose nutritive

Voir B.5.

5.4 Milieux d'identification et réactifs

5.4.1 Milieu urée tryptophane

Voir B.6.

5.4.2 Réactif pour la recherche de la tryptophane désaminase

Voir B.7.

5.4.3 Gélose de Kligler

Voir B.8.

5.4.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase

Voir B.9.

5.4.5 Milieux de décarboxylation

5.4.5.1 Milieu de décarboxylation de la lysine

Voir B.10.

5.4.5.2 Milieu de décarboxylation de l'ornithine

Voir B.11.

5.4.6 Milieux pour la fermentation des glucides (saccharose, rhamnose ou salicine)

Voir B.12.

5.4.7 Milieu au citrate de Simmons

Voir B.13.

5.4.8 Gélose à la bile et à l'esculine

Voir B.14.

5.4.9 Gélose caséine-soja

Voir B.15.

5.4.10 Gélose caséine-soja pour la recherche de la pyrazinamidase

Voir B.16.

5.4.11 Solution de sulfate de fer(II) ammoniacal pour la révélation de la pyrazinamidase

Voir B.17.

5.4.12 Gélose caséine-soja au magnésium et à l'oxalate

Voir B.18.

5.5 Solution saline

Voir B.19.

5.6 Solution d'hydroxyde de potassium en solution saline

Voir B.20.

6 Appareillage et verrerie

NOTE 1 Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si les 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 Étuve, réglable à $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ou à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

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

6.4 Bains d'eau ou **étuves**, réglables entre $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, avec éventuellement un système d'agitation approprié.

6.5 Bain d'eau, réglable entre $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ et $50\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

6.6 Tubes à essai, de $18\text{ mm} \times 180\text{ mm}$, $9\text{ mm} \times 180\text{ mm}$ et $12\text{ mm} \times 50\text{ mm}$.

6.7 Fioles et/ou **flacons**, de capacité appropriée.

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

6.9 Pipettes à écoulement total, à large ouverture, de capacités nominales de 10 ml et 1 ml, graduées en 0,1 ml.

6.10 Poires en caoutchouc, ou tout autre système de pipetage microbiologiquement sûr.

6.11 Anse bouclée, d'environ 3 mm de diamètre, **fil droit**, en platine iridié ou en nickel-chrome, et/ou **baguette de verre** (pipettes Pasteur).

NOTES

2 Des anses stériles en plastique à usage unique peuvent être également utilisées.

3 Le nickel-chrome ne convient pas pour l'essai à l'oxydase (voir 9.4.2.4).

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

6.13 Éclairage, approprié pour une transillumination oblique.

6.14 Loupe ou **microscope**

6.15 Homogénéisateur péristaltique (stomacher)

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'y a pas de Norme internationale spécifique traitant de 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'y a pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

Voir le schéma en annexe A.

9.1 Prise d'essai et suspensions initiales

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

9.1.2 En général, pour préparer la première suspension initiale, introduire une quantité (x) de prise d'essai (masse ou volume) dans un volume connu de bouillon PSB (5.2.1), de façon à obtenir un rapport prise d'essai/milieu d'enrichissement de 1/10 (rapport masse/volume ou volume/volume). Homogénéiser la suspension en utilisant un homogénéisateur péristaltique.

9.1.3 Préparer la seconde suspension initiale, en opérant de la même façon avec le bouillon ITC (5.2.2), de façon à obtenir un rapport prise d'essai/milieu d'enrichissement de 1/100 (rapport masse/volume ou volume/volume).

9.2 Enrichissement

Incuber les deux suspensions initiales (9.1.2 et 9.1.3) de la façon suivante:

- a) milieu PSB à 22 °C ou à 25 °C pendant 48 h à 72 h avec agitation ou pendant 5 jours sans agitation;
- b) milieu ITC à 25 °C pendant 48 h.

9.3 Isolement et identification

Après incubation des milieux d'enrichissement (9.2), procéder comme suit.

9.3.1 À partir de la culture obtenue sur milieu PSB [9.2 a)] ensemercer à l'aide d'une anse (6.11) la surface d'une boîte de gélose CIN (5.3.1) et étaler de façon à obtenir des colonies bien séparées.

9.3.2 Avec une pipette stérile (6.9), transférer 0,5 ml de la culture obtenue sur milieu PSB [9.2 a)] dans 4,5 ml de solution d'hydroxyde de potassium (5.6) et agiter. Au bout de 20 s, ensemercer à l'aide d'une anse (6.11) la surface d'une boîte de gélose CIN (5.3.1) afin d'obtenir des colonies bien séparées.

9.3.3 À partir de la culture obtenue sur milieu ITC [9.2 b)] ensemercer à l'aide d'une anse (6.11) la surface d'une boîte de gélose SSDC (5.3.2) afin d'obtenir des colonies bien séparées.

9.3.4 Retourner les boîtes (9.3.1 à 9.3.3) et les placer dans l'étuve (6.2) réglée à 30 °C.

9.3.5 Après 24 h d'incubation, examiner les boîtes à la loupe (6.14) ou en transillumination oblique afin de rechercher la présence de colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica*:

- a) Sur la gélose CIN, les colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica* sont petites (≤ 1 mm), lisses, à centre rouge, à bord translucide et, lorsqu'elles sont observées sous transillumination oblique (6.13), sont finement granuleuses et non irisées.
- b) Sur gélose SSDC, les colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica* sont petites (≤ 1 mm) et grises avec un bord flou et lorsqu'elles sont observées sous transillumination oblique, sont très finement granuleuses et non irisées.

9.3.6 Si le développement des colonies est lent, si la coloration est faible ou s'il n'y a pas de colonie caractéristique, prolonger l'incubation des boîtes jusqu'à 48 h, puis les réexaminer.

9.4 Confirmation

NOTE 4 Les galeries miniaturisées d'identification biochimique actuellement disponibles dans le commerce et permettant d'identifier les *Yersinia enterocolitica*, peuvent être utilisées.

9.4.1 Choix des colonies pour les confirmations

Pour les confirmations, prélever, à partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs (voir 9.3.1 à 9.3.3), cinq colonies considérées comme typiques ou suspectes.

S'il se trouve une boîte avec moins de cinq colonies typiques ou suspectes, retenir toutes les colonies typiques ou suspectes.

Ensemencer les colonies sélectionnées sur la surface de boîtes de gélose nutritive (5.3.3), de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

Incuber les boîtes ainsi ensemençées à 30 °C pendant 24 h.

Conserver les géloses nutritives entre 0 °C et + 5 °C pour les essais de confirmation biochimique et de pathogénicité.

Utiliser des cultures pures pour les confirmations biochimiques et de pathogénicité.

9.4.2 Tests présomptifs

À l'aide d'un fil droit ou d'une baguette de verre (6.11), inoculer les milieux spécifiés en 9.4.2.1 à

9.4.2.3 et réaliser la recherche de l'oxydase décrite en 9.4.2.4 avec chacune des cultures obtenues à partir des colonies retenues en 9.4.1.

9.4.2.1 Milieu de l'uréase

Ensemencer le milieu liquide (5.4.1) juste au-dessous de la surface.

Incuber à 30 °C pendant 24 h.

Une couleur rose-violette indique une réaction uréase positive.

Une couleur jaune orangé indique une réaction uréase négative.

9.4.2.2 Recherche de la tryptophane désaminase

Ajouter à la culture obtenue en 9.4.2.1, trois gouttes du réactif (5.4.2) pour la recherche de la tryptophane désaminase.

Une couleur brune indique une réaction positive.

9.4.2.3 Gélose de Kligler (5.4.3)

Ensemencer en stries la pente (B.8.2) de la gélose et le culot par piqûre jusqu'au fond de la gélose.

Incuber à 30 °C pendant 24 h à 48 h.

Interpréter les modifications du milieu de la façon suivante.

Culot

jaune:	glucose positif (fermentation du glucose)
rouge ou inchangé:	glucose négatif (pas de fermentation du glucose)
noir:	formation de sulfure d'hydrogène
bulles ou fissures:	formation de gaz à partir du glucose

Pente de la gélose

jaune:	lactose positif (utilisation du lactose)
rouge ou inchangée:	lactose négatif (pas d'utilisation du lactose)

9.4.2.4 Recherche de l'oxydase

À l'aide de la baguette de verre (6.11), prendre une fraction de chacune des colonies caractéristiques re-

tenues (9.4.1) et ensemercer par stries sur le papier-filtre humecté de réactif (5.4.4) ou sur un disque disponible dans le commerce. Il ne faut pas utiliser d'anse ni de fil en nickel chrome (voir 6.11, note 3).

Considérer l'essai comme négatif si la couleur n'a pas viré au mauve, violet ou bleu intense dans les 10 s.

9.4.3 Essais de confirmation biochimique

9.4.3.1 Sélection des colonies et mode opératoire

9.4.3.1.1 Poursuivre l'identification des colonies présentant les caractéristiques suivantes:

- Recherche de l'uréase: positif,
- Recherche de la tryptophane désaminase: négatif,
- Fermentation du glucose: positif,
- pas de formation de gaz à partir du glucose,
- Fermentation du lactose: négatif,
- pas de formation de H₂S,
- Recherche de l'oxydase: négatif.

NOTES

5 Certaines souches de *Yersinia enterocolitica* lactose positif ont été isolées en particulier dans les produits laitiers. Elles ne sont en général pas pathogènes en l'état actuel de nos connaissances.

6 Des souches uréase négative ont été trouvées, mais aucune n'est connue pour être pathogène.

7 Pour la formation de gaz à partir du glucose, quelques bulles peuvent être produites. Bien que *Yersinia* soit habituellement considérée comme fermentant les glucides sans production de gaz, quelques souches de *Yersinia enterocolitica* (comme *Y. enterocolitica* biovar 3) peuvent produire une ou deux bulles (faible production de gaz).

9.4.3.1.2 À l'aide de l'anse bouclée, du fil droit ou d'une baguette de verre (6.11), ensemercer les milieux spécifiés en 9.4.3.2 à 9.4.3.5 avec chacune des cultures obtenues à partir des colonies isolées (9.4.1) sur gélose nutritive et sélectionnées en 9.4.3.1.1.

9.4.3.2 Milieu de décarboxylation de la lysine (5.4.5.1)

Ensemencer le milieu liquide juste au-dessous de la surface.

Incuber à 30 °C pendant 24 h.