
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour la recherche des
Escherichia coli O157**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the
detection of Escherichia coli O157*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16654:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-
2d347cb40119/iso-16654-2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001)



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 décline 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. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16654:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001>

© ISO 2001

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

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.ch
Web www.iso.ch

Imprimé en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Terme et définition	1
4 Principe	2
5 Milieux de culture, réactifs et antisérum	2
6 Appareillage et verrerie	8
7 Échantillonnage	9
8 Préparation de l'échantillon pour essai	9
9 Mode opératoire (voir l'annexe A)	9
9.1 Prise d'essai et suspension mère	9
9.2 Enrichissement	9
9.3 Séparation immunomagnétique (IMS)	9
9.4 Ensemencement sur les géloses sélectives et identification des colonies d'<i>E. coli</i> O157	10
9.5 Confirmation	11
9.6 Identification complémentaire	12
10 Assurance qualité	12
10.1 Souches de contrôle pour l'assurance qualité	12
10.2 Méthode de culture	12
11 Expression des résultats	12
12 Rapport d'essai	12
Annexe A (normative) Diagramme du mode opératoire	13
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 3.

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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente/du présent Norme internationale 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.

La Norme internationale ISO 16654 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

[ISO 16654:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001>

Introduction

En raison de la grande diversité des aliments destinés à la consommation humaine ou animale, la présente méthode horizontale peut ne pas être appropriée pour certains produits. Dans ce cas, différentes méthodes spécifiques à ces produits peuvent être utilisées lorsque cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, la méthode horizontale devra être appliquée aussi souvent que possible.

Lorsque la présente Norme internationale sera révisée, 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 justifiant toute dérogation dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et il existe peut-être déjà des normes internationales et/ou des normes nationales pour certains groupes de produits, lesquelles ne sont pas conformes à cette méthode horizontale. Il est souhaitable que lors de leur révision, ces normes soient modifiées afin de se conformer à la présente norme internationale de sorte que les seules divergences éventuelles restantes soient celles nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 16654:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16654:2001

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157

AVERTISSEMENT — Les *Escherichia coli* O157 peuvent provoquer des maladies mortelles et la dose infectante est faible. Des infections contractées en laboratoire ont été rapportées.

Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que cette méthode soit réalisée entièrement par du personnel qualifié, avec des pratiques de laboratoire appropriées et travaillant de préférence dans un laboratoire confiné. Les réglementations nationales au niveau santé et sécurité concernant ce microorganisme doivent être appliquées.

Attention lors de l'élimination de tous les matériaux contagieux.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* séro groupe O157.

Soumise aux restrictions énoncées dans l'introduction, la présente Norme internationale est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou aux produits alimentaires.

ISO 16654:2001

2 Références normatives

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001>

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

ISO 6887-1, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.*

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

3 Terme et définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, le terme et la définition suivant s'applique.

3.1

***Escherichia coli* O157 *E. coli* O157**

microorganismes formant des colonies caractéristiques à la surface du milieu différentiel sélectif utilisé dans la présente Norme internationale, produisant de l'indole et s'agglutinant spécifiquement avec un antisérum contre les antigènes O157

NOTE 1 Les souches d'*E. coli* O157 sorbitol positives ne sont pas détectées dans un milieu à base de CT-SMAC (5.2).

NOTE 2 Des souches mutantes indole négatif ont été trouvées.

4 Principe

La recherche d'*Escherichia coli* O157 implique quatre étapes successives (voir annexe A).

- a) **Enrichissement** de la prise d'essai homogénéisée dans un bouillon tryptone de soja modifié contenant de la novobiocine (mTSB + N) avec une incubation à $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 6 h puis renouvelé 12 h à 18 h.
- b) **Séparation et concentration** des microorganismes au moyen de billes immunomagnétiques revêtues d'anticorps anti *E. coli* O157.
- c) **Isolement** par cultures secondaires des billes immunomagnétiques ayant capté des bactéries sur une gélose MacConkey au sorbitol cefixime tellurite (CT-SMAC) et, au choix des utilisateurs, sur une seconde gélose d'isolement sélective.
- d) **Confirmation** des colonies sorbitol négatives isolées sur CT-SMAC et des colonies caractéristiques d'*E. coli* O157 isolées sur le second milieu d'isolement, par la recherche de la production d'indole et une agglutination du sérum anti *E. coli* O157.

NOTE Une caractérisation complémentaire, par exemple par des marqueurs de pathogénicité, des isolats positifs peut être obtenue en les transmettant à un laboratoire de référence approprié.

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5 Milieux de culture, réactifs et antisérum

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218:2001

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8b4d94-6a9f-4800-9da6-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001)

5.1 Milieu d'enrichissement: Bouillon tryptone de soja modifié à la novobiocine (mTSB + N)

Voir référence [1].

5.1.1 Bouillon tryptone de soja modifié (mTSB)

5.1.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	17,0 g
Digestat enzymatique de soja	3,0 g
D(+) glucose	2,5 g
Sels biliaires N° 3	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Di-Potassium hydrogénophosphate (K_2HPO_4)	4,0 g
Eau	1 000 ml

5.1.1.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en chauffant, si nécessaire. Ajuster le pH à l'aide du pH-mètre (6.6), si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,4 \pm 0,2$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Répartir les milieux par quantités appropriées dans des flacons ou des bouteilles (6.7).

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à $121 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 15 min.

5.1.2 Solution de novobiocine

5.1.2.1 Composition

Novobiocine	0,45 g
Eau	100 ml

5.1.2.2 Préparation

Dissoudre la novobiocine dans l'eau et stériliser par filtration sur membrane.

Préparer le jour de l'utilisation.

5.1.2.3 Préparation du milieu complet

Juste avant utilisation, ajouter 1 ml ou 4 ml de solution de novobiocine (5.1.2) à 225 ml ou 900 ml de milieu mTSB (5.1.1) refroidi.

La concentration finale de novobiocine est de 20 mg par litre de mTSB.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8b4d94-6a9f-4800-9da6-447610c94100/iso-16654-2001>

5.2 Premier milieu d'isolement sélectif: gélose MacConkey au sorbitol cefixime tellurite (CT-SMAC)

Voir référence [2].

5.2.1 Milieu de base

5.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	17,0 g
Digestat enzymatique de viande	3,0 g
Sorbitol	10,0 g
Sels biliaires N° 3	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	0,03 g
Violet de méthyl	0,001 g
Agar	9 g à 18 g ^a
Eau	1 000 ml

^a En fonction du pouvoir de gélification de l'agar.

5.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants de base ou la base déshydratée complète dans l'eau en chauffant jusqu'à ébullition. Ajuster le pH (6.6), si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,1 \pm 0,2$ à 25 °C.

Stériliser à l'autoclave (6.1) à 121 °C pendant 15 min.

5.2.2 Solution de tellurite de potassium

5.2.2.1 Composition

Tellurite de potassium à usage bactériologique	0,25 g
Eau	100 ml

5.2.2.2 Préparation

Dissoudre le tellurite de potassium dans l'eau et stériliser par filtration sur membrane.

Cette solution peut être stockée à température ambiante pendant un mois au maximum, mais ne doit pas être utilisée en cas de formation de précipités blancs.

5.2.3 Solution de cefixime

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.2.3.1 Composition

Cefixime	5,0 mg
Eau	100,0 ml

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001>

5.2.3.2 Préparation

Dissoudre la cefixime dans l'eau et stériliser par filtration sur membrane.

NOTE On peut avoir à dissoudre la cefixime dans de l'éthanol.

Cette solution peut être stockée à $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ pendant une semaine.

5.2.4 Milieu complet

5.2.4.1 Composition

Milieu de base (5.2.1)	1 000 ml
Solution de tellurite de potassium (5.2.2)	1,0 ml
Solution de cefixime (5.2.3)	1,0 ml

5.2.4.2 Préparation

Refroidir le milieu de base nouvellement stérilisé (5.2.1) entre 44 °C et 47 °C (6.5), ou faire fondre par chauffage à la vapeur le milieu de base préalablement stérilisé et solidifié, puis le refroidir entre 44 °C et 47 °C.

Ajouter 1 ml de solution de tellurite et 1 ml de solution de cefixime à 1 000 ml de milieu de base. Mélanger et verser par quantités d'environ 15 ml dans des boîtes de Petri stériles (6.15). Laisser solidifier.

La concentration finale est de 2,5 mg/l pour le tellurite et 0,05 mg/l pour le cefixime.

Immédiatement avant utilisation, sécher les plaques de gélose, de préférence sans leurs couvercles et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve de séchage réglée entre 25 °C et 50 °C (6.2), jusqu'à ce que la surface de la gélose soit exempte de gouttes d'eau. Ne pas les sécher plus longtemps. Les plaques de gélose peuvent aussi être séchées sous une hotte à flux laminaire, avec la surface de la gélose tournée vers le haut, pendant 30 min couvercles à demi-ouverts, ou durant une nuit, couvercles fermés.

Si elles sont préparées à l'avance, les plaques non séchées peuvent être stockées à l'abri de la lumière dans des sacs en plastique ou d'autres emballages évitant le dessèchement, dans un réfrigérateur à 3 °C ± 2 °C pendant une durée allant jusqu'à deux semaines.

5.3 Second milieu d'isolement sélectif

Utiliser une autre gélose sélective, laissée au choix du laboratoire, complémentaire de la gélose CT-SMAC et spécifiquement appropriée pour l'isolement des *Escherichia coli* O157.

Immédiatement avant utilisation, sécher les plaques de gélose, de préférence sans leurs couvercles et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve de séchage réglée entre 25 °C et 50 °C (6.2), jusqu'à ce que la surface de la gélose soit exempte de gouttes d'eau. Ne pas les sécher plus longtemps. Les plaques de gélose peuvent aussi être séchées sous une hotte à flux laminaire, avec la surface de la gélose tournée vers le haut, pendant 30 min couvercles à demi-ouverts, ou durant une nuit, couvercles fermés.

Si elles sont préparées à l'avance, les plaques non séchées peuvent être stockées à l'abri de la lumière dans des sacs en plastique ou d'autres emballages évitant le dessèchement, dans un réfrigérateur à 3 °C ± 2 °C pendant une durée n'entraînant aucune variation de sa performance.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001>

5.4 Gélose nutritive

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff8b4d94-6a9f-4800-9da6-2d347cb40119/iso-16654-2001>

5.4.1 Composition

Extrait de viande	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar	9 g à 18 g ^a
Eau	1 000 ml
^a En fonction du pouvoir de gélification de l'agar.	

5.4.2 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 ± 0,2 à 25 °C.

Transférer le liquide dans des flacons ou bouteilles (6.7) de contenance appropriée.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.