
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour la recherche de *Yersinia
enterocolitica* présumées pathogènes**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the detection of presumptive pathogenic Yersinia enterocolitica*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 10273:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003>



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 10273:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003>

© ISO 2003

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.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
4.1 Généralités	2
4.2 Enrichissement en milieux sélectifs liquides	2
4.3 Isolement et identification	2
4.4 Confirmation	2
5 Réactifs et milieux de culture	2
6 Appareillage et verrerie	4
7 Échantillonnage	5
8 Préparation de l'échantillon pour essai	5
9 Mode opératoire (voir Annexe A)	6
9.1 Prise d'essai et suspension mère	6
9.2 Enrichissement	6
9.3 Isolement et identification	6
9.4 Confirmation	7
10 Rapport d'essai	13
Annexe A (normative) Schéma du mode opératoire	14
Annexe B (normative) Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs	15
Annexe C (informative) Caractéristiques biochimiques, à 30 °C, des <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>, des <i>Yersinia enterocolitica</i> et d'autres espèces biochimiques apparentées	31
Annexe D (informative) Schéma de biotypage de <i>Yersinia enterocolitica</i>	32
Bibliographie	33

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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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 du présent document 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.

L'ISO 10273 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 10273:1994), dont le Paragraphe 9.4 a fait l'objet d'une révision technique.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003>

Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que la présente méthode horizontale ne soit pas applicable dans tous ses détails à certains d'entre eux. Dans ce cas, des méthodes différentes, spécifiques à ces produits, pourront être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, il convient que tous les efforts soient faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible.

Lors du prochain réexamen périodique de la présente Norme internationale, il sera tenu compte de toutes les évolutions intervenues depuis sa publication et, notamment, dans quelle mesure cette méthode horizontale aura été suivie ainsi que les raisons des dérogations dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation de toutes les méthodes d'essai ne peut être réalisée de façon immédiate; de ce fait, il peut déjà exister des Normes internationales et/ou nationales pour certains groupes de produits, qui ne concordent pas avec la présente méthode horizontale. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec les prescriptions de la présente Norme internationale et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 10273:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10273:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche de *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes

ATTENTION — L'application de la présente Norme internationale peut impliquer l'utilisation de matériels et d'équipements dangereux, ainsi que le recours à des opérations dangereuses. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de mettre en œuvre les pratiques appropriées de sécurité et de santé. L'utilisateur doit également déterminer les limitations d'ordre réglementaires.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode horizontale pour la recherche des *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes chez l'homme. La présente Norme internationale est applicable aux

- produits pour l'alimentation humaine et animale, et aux
- échantillons d'environnement pour la production et la distribution des aliments.

iTeh STANDARD PREVIEW

2 Références normatives (standards.iteh.ai)

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 6887 (toutes les parties), *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*, ainsi que Amd.1:2001

ISO 8261, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

***Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes**

bactéries psychrotrophes formant des colonies caractéristiques sur des milieux solides sélectifs, possédant des propriétés biochimiques répondant aux critères de pathogénicité décrits lorsque l'essai est réalisé conformément à la présente Norme internationale

3.2
recherche de *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 conformément à la présente Norme internationale

4 Principe

4.1 Généralités

La recherche de *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes nécessite les trois étapes successives suivantes.

4.2 Enrichissement en milieux sélectifs liquides

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

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

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

NOTE L'enrichissement en bouillon ITC a été proposé par Wauters (voir la référence [1]) pour isoler les *Yersinia enterocolitica* biotype 4/sérotype O:3 et non le biotype 1B/sérotype O:8, le biotype 2/sérotype O:9 (voir la référence [2]) et le biotype 2/sérotype O:5,27. L'isolement des *Yersinia enterocolitica* biotype 2/sérotype O:9 requiert l'utilisation d'un milieu ITC exempt de chlorate et contenant 80 % de la concentration originale en chlorure de magnésium et en vert malachite (voir la référence [3]).

4.3 Isolement et identification

ISO 10273:2003
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003>

À partir des cultures obtenues en 4.2, isolement sur les deux milieux de culture solides sélectifs suivants:

- gélose à la cefsulodine, à l'Irgasan™ et à la novobiocine (CIN) (voir la référence [7]);
- 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 utilisé, pour vérifier la présence éventuelle de colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica*.

4.4 Confirmation

Sur des colonies isolées, recherche des colonies susceptibles d'être des *Yersinia enterocolitica* préalablement isolées et confirmation au moyen d'essais biochimiques, d'essais de biotypage, d'essais visant à rechercher des critères de pathogénicité et, éventuellement, d'essais sérologiques.

5 Réactifs et milieux de culture

Voir l'ISO 7218 pour les pratiques courantes de laboratoire.

Voir l'ISO/TS 11133-1 pour des exigences spécifiques en matière d'assurance de la qualité et de performance des milieux de culture.

NOTE L'ISO/TS 11133-2, traitant des lignes directrices relatives aux essais de performance des milieux de culture, est en préparation.

Du fait de la grande diversité de milieux de culture et de réactifs, et par souci d'une lisibilité plus aisée du texte de la présente Norme internationale, leur composition est donnée dans l'Annexe B, laquelle détaille également leurs conditions de répartition, de stockage, etc.

5.1 Milieux d'enrichissement

5.1.1 Bouillon à la peptone, au sorbitol et aux sels biliaries (PSB).

Voir Article B.1.

5.1.2 Bouillon à l'Irgasan™, à la ticarcilline et au chlorate de potassium (ITC).

Voir Article B.2.

5.2 Milieu d'isolement

5.2.1 Gélose à la cefsulodine, à l'Irgasan™ et à la novobiocine (CIN) (voir la référence [7]).

Voir Article B.3.

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

Voir Article B.4.

5.2.3 Gélose nutritive.

Voir Article B.5.

5.3 Milieux d'identification et réactifs

5.3.1 Milieu urée-indole.

Voir Article B.6.

5.3.2 Réactif pour la recherche de l'indole.

Voir Article B.7.

5.3.3 Gélose de Kligler.

Voir Article B.8.

5.3.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase.

Voir Article B.9.

5.3.5 Milieux de décarboxylation

5.3.5.1 Milieu de décarboxylation de la lysine.

Voir Article B.10.

5.3.5.2 Milieu de décarboxylation de l'ornithine.

Voir Article B.11.

5.3.6 Milieux de fermentation des glucides (saccharose, rhamnose, tréhalose et xylose).

Voir Article B.12.

5.3.7 Milieu au citrate de Simmons.

Voir Article B.13.

5.3.8 Milieu Tween™-estérase.

Voir Article B.14.

5.3.9 Gélose à la bile et à l'esculine.

Voir Article B.15.

5.3.10 Gélose trypto-caséine-soja.

Voir Article B.16.

5.3.11 Gélose trypto-caséine-soja, pour la recherche de pyrazinamidase.

Voir Article B.17.

5.3.12 Solution de sulfate de fer(II) ammoniacal, pour la recherche de la pyrazinamidase.

Voir Article B.18.

5.3.13 Gélose trypto-caséine-soja au magnésium et à l'oxalate

Voir Article B.19.

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.4 Solution saline.

Voir Article B.20.

[ISO 10273:2003
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9da8cb1a-ec14-46b9-a82c-5286374ac294/iso-10273-2003)

5.5 Solution d'hydroxyde de potassium en solution saline.

Voir Article B.21.

5.6 Bouillon à l'infusion de veau.

Voir Article B.22.

5.7 Glycérol stérile.

Voir Article B.23.

6 Appareillage et verrerie

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 Appareil pour stérilisation en chaleur sèche (four) ou appareil pour stérilisation en chaleur humide (autoclave).

Voir l'ISO 7218.

6.2 Étuves, réglables respectivement à 22 °C ± 1 °C, à 25 °C ± 1 °C, à 30 °C ± 1 °C et à 37 °C ± 1 °C.

- 6.3 Enceinte de séchage** ou **four**, avec ventilation par convection et pouvant être réglé(e) à une température comprise entre $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
- 6.4 Bains d'eau** ou **étuves**, réglables respectivement à $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, à $24\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, de préférence équipé(e)s d'un agitateur adapté.
- 6.5 Bain d'eau**, pouvant être réglé à une température comprise entre 44 °C et 47 °C .
- 6.6 Tubes à essai**, de dimensions respectivement $18\text{ mm} \times 180\text{ mm}$, $9\text{ mm} \times 180\text{ mm}$ et $12\text{ mm} \times 50\text{ mm}$.
- 6.7 Flacons et/ou fioles**, de capacités appropriées.
- 6.8 Boîtes de Petri**, en verre ou en matière plastique, de diamètre compris entre 90 mm et 100 mm .
- 6.9 Pipettes graduées à écoulement total**, de capacités nominales de 10 ml et de 1 ml , à large ouverture et graduées en $0,1\text{ ml}$.
- 6.10 Poires en caoutchouc, ou tout autre système microbiologiquement sûr**, pouvant s'adapter aux pipettes graduées.
- 6.11 Anse bouclée**, de diamètre d'environ 3 mm , **fils droits** en platine iridié et/ou en nickel/chrome, **baguettes en verre** et **pipettes Pasteur**.
- Il est possible d'utiliser des anses bouclées et des fils droits en matière plastique, stériles et à usage unique. La composition en nickel/chrome n'est pas appropriée pour l'essai de recherche de l'oxydase (voir 9.4.3.5).
- 6.12 pH-mètre**, permettant de lire à $\pm 0,1$ unité pH près, à une température de 25 °C .
- 6.13 Éclairage**, approprié pour une transillumination oblique.
- 6.14 Loupe** ou **stéréomicroscope**.
- 6.15 Homogénéisateur péristaltique**.

7 Échantillonnage

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

Il est déconseillé de congeler les échantillons avant de les analyser, bien que des *Yersinia* spp. aient été retrouvées dans des produits congelés.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique pour l'échantillonnage du produit concerné, il convient 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 au produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il convient que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire (voir Annexe A)

9.1 Prise d'essai et suspension mère

9.1.1 Voir la partie pertinente de l'ISO 6887, ou voir l'ISO 8261 ou toute autre Norme internationale spécifique au produit à examiner.

9.1.2 En règle générale, pour préparer la suspension mère, ajouter une quantité (x) de prise d'essai [de masse ou de volume connu(e)] à un volume connu de bouillon PSB (B.1) de manière à obtenir une dilution au dixième (rapport masse/volume ou volume/volume). Homogénéiser la suspension à l'aide d'un homogénéisateur péristaltique (6.15) pendant 2 min.

9.1.3 Préparer de la même manière une seconde suspension mère à l'aide du bouillon ITC (B.2) de manière à obtenir une dilution au centième (rapport masse/volume ou volume/volume).

9.2 Enrichissement

Incuber les deux suspensions mères (9.1.2 et 9.1.3) comme suit:

- a) bouillon PSB: à une température comprise entre 22 °C et 25 °C pendant une durée de 48 h à 72 h avec agitation, ou pendant 5 jours sans agitation;
- b) bouillon ITC: à 25 °C pendant 48 h.

9.3 Isolement et identification

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

9.3.2 En utilisant le milieu de culture PSB (9.2), ensemencer, à l'aide d'une anse (6.11), la surface d'une boîte de gélose CIN (B.3) afin d'obtenir des colonies bien séparées.

9.3.3 À l'aide d'une pipette stérile (6.9), transférer 0,5 ml du milieu de culture PSB (9.2) dans 4,5 ml de solution d'hydroxyde de potassium (B.21) puis mélanger (voir la référence [5]). Au bout de $20 \text{ s} \pm 5 \text{ s}$, ensemencer immédiatement, à l'aide d'une anse (6.11), la surface d'une boîte de gélose CIN (B.3) afin d'obtenir des colonies bien séparées.

9.3.4 En utilisant le milieu de culture ITC (9.2), ensemencer, à l'aide d'une anse (6.11), la surface d'une boîte de gélose SSDC (B.4) afin d'obtenir des colonies bien séparées.

9.3.5 Retourner les boîtes (9.3.2 à 9.3.4) et les placer dans l'étuve (6.2) réglée à 30 °C.

9.3.6 Après 24 h d'incubation, examiner les boîtes à la loupe (6.14), de préférence équipée d'un éclairage de transillumination oblique (6.13), afin de rechercher la présence de colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica* de la manière suivante.

- a) Sur une gélose CIN, les colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica* sont petites ($\leq 1 \text{ mm}$) et lisses, avec un centre rouge et un bord translucide; lorsqu'elles sont examinées en transillumination oblique (6.13), elles sont finement granuleuses et non irisées.
- b) Sur une gélose SSDC, les colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica* sont petites ($\leq 1 \text{ mm}$) et de couleur grise avec un bord indiscernable; lorsqu'elles sont examinées en transillumination oblique, elles sont non irisées et très finement granuleuses.

NOTE La transillumination oblique permet de distinguer les colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica* des colonies très similaires de *Pseudomonas*.

9.3.7 Si le développement des colonies est lent, si la coloration est faible ou si aucune colonie caractéristique n'est observée, prolonger l'incubation des boîtes jusqu'à 48 h, puis les réexaminer.

9.4 Confirmation

9.4.1 Généralités

Des kits d'identification biochimique miniaturisés, actuellement disponibles dans le commerce et permettant d'identifier les *Yersinia enterocolitica*, peuvent être utilisés. Certains kits n'identifient pas avec précision les différentes espèces de *Yersinia* telles que les *Yersinia mollaretii* et les *Yersinia bercovieri* (anciens biotypes des *Yersinia enterocolitica* 3A et 3B) ainsi que les *Yersinia intermedia* qui sont identifiées comme des colonies de *Yersinia enterocolitica*. Dans ce dernier cas, l'essai de Mucate doit être réalisé afin de bien distinguer ces différentes espèces. Certains auteurs proposent une amélioration des pouvoirs de discrimination des tests d'identification biochimique miniaturisés (voir les références [6] et [7]).

9.4.2 Sélection des colonies en vue de la confirmation

9.4.2.1 Pour les essais de confirmation, sélectionner dans chaque boîte de milieu sélectif (9.3.2 à 9.3.4) cinq colonies caractéristiques ou suspectes.

Si dans l'une des boîtes, il y a moins de cinq colonies, retenir toutes les colonies caractéristiques ou suspectes.

Ensemencer les colonies sélectionnées sur la surface des boîtes de gélose nutritive (B.5) de manière à permettre le développement de colonies bien séparées.

Incuber les boîtes ensemencées à 30 °C pendant 24 h.

Après incubation, examiner la pureté de la culture des boîtes. Si des cultures mixtes sont présentes, repiquer chaque type de colonie dans d'autres boîtes de gélose nutritive et incuber conformément aux instructions ci-avant.

Pour les essais de confirmation biochimique et de pathogénicité, utiliser uniquement des cultures pures.

9.4.2.2 Les plasmides qui déterminent une partie des facteurs de pathogénicité de *Yersinia* peuvent être perdus spontanément au cours de cultures réalisées au-dessus de 30 °C ou au cours de cultures très longues avec passage en laboratoire au-dessous de 30 °C.

Par conséquent, préparer ces plasmides à une conservation sous forme de culture congelée en commençant par repiquer immédiatement chaque culture pure dans un bouillon à infusion de veau (B.22).

Incuber pendant 24 h à 48 h à une température comprise entre 22 °C et 25 °C.

Ajouter 10 % de glycérol stérile (B.23), bien mélanger et congeler, si possible à -70 °C.

9.4.3 Essais présomptifs

9.4.3.1 Généralités

À l'aide d'un fil droit (6.11), inoculer les milieux spécifiés en 9.4.3.2 à 9.4.3.4 et rechercher l'oxydase conformément aux instructions données en 9.4.3.5 avec chacune des cultures obtenues à partir des colonies sélectionnées en 9.4.2.

9.4.3.2 Recherche de l'uréase

Utiliser un inoculum important pour ensemencer le bouillon juste au-dessous de la surface du milieu urée-indole (B.6).

Incuber à 30 °C pendant 24 h, de préférence dans un bain d'eau.