
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour la recherche des *Vibrio*
spp. potentiellement entéropathogènes —**

**Partie 1:
Recherche de *Vibrio parahaemolyticus* et
*Vibrio cholerae***

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. —*

Part 1: Detection of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007>



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/TS 21872-1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2007

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.....	2
4 Principe.....	2
4.1 Généralités.....	2
4.2 Premier enrichissement en milieu sélectif liquide.....	2
4.3 Second enrichissement en milieu sélectif liquide.....	2
4.4 Isolement et identification.....	2
4.5 Confirmation.....	2
5 Milieus de culture et réactifs.....	3
5.1 Milieu d'enrichissement: Eau peptonée alcaline salée (EPAS).....	3
5.2 Milieu d'isolement sélectifs solides.....	3
5.3 Gélose nutritive salée (GNS).....	3
5.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase.....	3
5.5 Gélose salée aux trois sucres et au fer (TSI).....	3
5.6 Milieu salé pour la détection de l'ornithine décarboxylase (ODC).....	3
5.7 Milieu salé pour la détection de la lysine décarboxylase (LDC).....	3
5.8 Milieu salé pour la détection de l'arginine dihydrolase (ADH).....	3
5.9 Réactif pour la recherche de la β -galactosidase.....	3
5.10 Milieu salé pour la recherche de l'indole.....	4
5.11 Eaux peptonées salées.....	4
5.12 Solution de chlorure de sodium.....	4
6 Appareillage et verrerie.....	4
7 Échantillonnage.....	4
8 Préparation de l'échantillon pour essai.....	4
9 Mode opératoire (voir Annexe A).....	4
9.1 Prise d'essai et suspension mère.....	4
9.2 Premier enrichissement sélectif.....	5
9.3 Second enrichissement sélectif.....	5
9.4 Isolement et identification.....	5
9.5 Confirmation.....	6
10 Expression des résultats.....	10
11 Rapport d'essai.....	10
Annexe A (normative) Schéma du mode opératoire.....	11
Annexe B (normative) Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs.....	12
Bibliographie.....	19

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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents normatifs:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale soit de son annulation.

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/TS 21872-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

L'ISO/TS 21872 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des Vibrio spp. potentiellement entéropathogènes*:

- *Partie 1: Recherche de Vibrio parahaemolyticus et Vibrio cholerae*
- *Partie 2: Recherche des espèces autres que Vibrio parahaemolyticus et Vibrio cholerae*

Introduction

En raison de la diversité des produits alimentaires, il est possible que cette 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, tous les efforts doivent être faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que cela est possible.

Lors du réexamen périodique de la présente Spécification technique, 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 de dérogations dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des 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 cette méthode horizontale. Lorsque ces normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner sur la présente Spécification technique et de ne conserver que les divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TS 21872-1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 21872-1:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des *Vibrio* spp. potentiellement entéropathogènes —

Partie 1:

Recherche de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae*

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de recherche des *Vibrio* spp. et particulièrement des *Vibrio cholerae* toxinogènes ne soient réalisés que dans des laboratoires équipés à cet effet et sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit pris pour se débarrasser des éléments contaminés.

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO/TS 21872 spécifie une méthode horizontale de recherche des deux principales espèces pathogènes de *Vibrio* provoquant des maladies intestinales chez l'homme: *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae*.

Elle est applicable

- aux produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale, et
- aux échantillons d'environnement prélevés dans la zone de production et de traitement des produits alimentaires.

NOTE Les raisons pour lesquelles la présente méthode peut ne pas être applicable sont signalées dans l'Introduction.

2 Références normatives

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 — Recommandations et règles générales pour les examens microbiologiques*

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*

3 Termes et définitions

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

3.1
***Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* potentiellement entéropathogènes**
micro-organismes formant des colonies caractéristiques sur des milieux sélectifs solides et possédant les caractéristiques biochimiques décrites, lorsque l'essai est réalisé selon la présente partie de l'ISO/TS 21872

3.2
recherche de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* potentiellement entéropathogènes
détermination de la présence ou de l'absence de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae*, dans une quantité spécifiée de produit, lorsque l'essai est réalisé selon la présente partie de l'ISO/TS 21872

4 Principe

4.1 Généralités

La recherche de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* nécessite quatre phases successives (voir également Annexe A).

NOTE *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* peuvent être présents en petit nombre et sont souvent accompagnés d'un nombre beaucoup plus grand d'autres micro-organismes appartenant à la famille des Vibrionacées ou à d'autres familles. Par conséquent, deux enrichissements sélectifs successifs sont nécessaires pour rechercher les organismes cibles.

4.2 Premier enrichissement en milieu sélectif liquide

Ensemencement de la prise d'essai dans le milieu d'enrichissement (eau peptonée alcaline salée, EPAS) (5.1) à température ambiante, puis incubation à 37 °C pendant 6 h ± 1 h pour les produits congelés ou à 41,5 °C pendant 6 h ± 1 h pour les produits frais.

4.3 Second enrichissement en milieu sélectif liquide

Ensemencement ensuite du milieu d'enrichissement (EPAS) avec la culture obtenue en 4.2. Incubation à 41,5 °C pendant 18 h ± 1 h.

4.4 Isolement et identification

À partir des cultures obtenues en 4.2 et en 4.3, ensemencement de deux milieux sélectifs solides:

- milieu gélosé au thiosulfate, au citrate, à la bile et au saccharose (TCBS);
- un autre milieu sélectif solide approprié, en complément du milieu TCBS, dont le choix est laissé au laboratoire et permettant la recherche de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae*.

Incubation du milieu TCBS à 37 °C, puis examen après 24 h ± 3 h. Incubation du second milieu sélectif selon les recommandations du fabricant.

4.5 Confirmation

Repiquage des colonies présumées de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* isolées en 4.4, et confirmation au moyen d'essais biochimiques appropriés.

5 Milieux de culture et réactifs

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

NOTE 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.

5.1 Milieu d'enrichissement: Eau peptonée alcaline salée (EPAS)

Voir B.1.

5.2 Milieux d'isolement sélectifs solides

5.2.1 Premier milieu: Milieu gélosé au thiosulfate, au citrate, à la bile et au saccharose (TCBS)

Voir B.2.

5.2.2 Second milieu

Le choix du second milieu est laissé au laboratoire d'essai. Il convient de suivre scrupuleusement les instructions du fabricant relatives à sa préparation.

EXEMPLES Gélose à la peptone de soja et au chlorure de triphényltétrazolium (TSAT), gélose au sodium dodécyl sulfate polymyxine saccharose (SDSPS). (Les géloses mCPC, CPC, CC ne sont pas recommandées pour l'isolement de *V. parahaemolyticus*.)

5.3 Gélose nutritive salée (GNS)

Voir B.3.

[ISO/TS 21872-1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007)

5.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase

[8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007)

Voir B.4.

5.5 Gélose salée aux trois sucres et au fer (TSI)

Voir B.5.

5.6 Milieu salé pour la détection de l'ornithine décarboxylase (ODC)

Voir B.6.

5.7 Milieu salé pour la détection de la lysine décarboxylase (LDC)

Voir B.7.

5.8 Milieu salé pour la détection de l'arginine dihydrolase (ADH)

Voir B.8.

5.9 Réactif pour la recherche de la β -galactosidase

Voir B.9.

5.10 Milieu salé pour la recherche de l'indole

Voir B.10.

5.11 Eaux peptonées salées

Voir B.11.

5.12 Solution de chlorure de sodium

Voir B.12.

6 Appareillage et verrerie

NOTE 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 (voir l'ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit:

6.1 Étuve, réglable à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.2 Étuve, ou **bain d'eau**, réglable à $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.3 Bain d'eau, réglable de 44 °C à 47 °C .

6.4 Bain d'eau, réglable à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Il est recommandé d'utiliser des bains d'eau (6.2, 6.3 et 6.4) contenant un agent antibactérien.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/82733588-9317-4824-a9c5-8d87720565c7/iso-ts-21872-1-2007>

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 partie de l'ISO/TS 21872. Voir 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.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 6887 et/ou à l'ISO 8261 ainsi que la Norme internationale concernant le produit à examiner. 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 Annexe A)

9.1 Prise d'essai et suspension mère

Pour la préparation de la suspension mère, utiliser le premier milieu d'enrichissement (EPAS) spécifié en 5.1.

Utiliser une prise d'essai (x g or x ml) selon la sensibilité requise et homogénéiser dans $9x$ ml (ou $9x$ g) de milieu d'enrichissement.

En cas de grandes quantités, il est recommandé de chauffer l'EPAS à 37 °C avant ensemencement avec la prise d'essai.

Si la dilution et l'incubation ne peuvent pas être réalisées le même jour, l'échantillon dilué doit être conservé jusqu'au lendemain à une température de 5 °C ± 3 °C.

Afin de réduire la somme de travail d'examen, lorsque l'on doit examiner plus d'une prise d'essai de 25 g provenant d'un lot déterminé de produit alimentaire et lorsque l'on dispose de preuves indiquant qu'un mélange (réunissant les prises d'essai) ne modifie pas les résultats en ce qui concerne ce produit en particulier, les prises d'essai peuvent être mélangées.

EXEMPLE Si l'on doit examiner 10 prises d'essai de 25 g, il est possible de combiner ces 10 unités afin d'obtenir un échantillon composite de 250 g et d'ajouter 2,25 l de milieu d'enrichissement.

Le nombre de cellules de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* pathogènes diminue sensiblement lors du stockage à des températures de réfrigération. Il convient donc d'éviter, dans la mesure du possible, de stocker les échantillons et, dans une moindre mesure, les suspensions à ces températures, et sinon de les y maintenir un minimum de temps.

9.2 Premier enrichissement sélectif

Incuber la suspension mère (9.1) à 37 °C pendant 6 h ± 1 h pour les produits congelés ou à 41,5 °C pendant 6 h ± 1 h pour les produits frais, séchés ou salés.

Il est recommandé de porter une attention particulière lorsque l'on applique la méthode complète à des produits à haute teneur en sel, car la concentration finale en sel dans le milieu peut en altérer les caractéristiques (voir l'ISO 6887-4).

9.3 Second enrichissement sélectif

ISO/TS 21872-1:2007

9.3.1 Transférer 1 ml de la culture, obtenue en 9.2 et prélevée en surface, dans un tube contenant 10 ml d'EPAS (5.1).

9.3.2 Incuber l'EPAS à 41,5 °C pendant 18 h ± 1 h.

9.4 Isolement et identification

9.4.1 À partir des cultures obtenues dans l'EPAS (9.2 et 9.3.2), ensemencer avec une anse la surface d'une boîte de gélose TCBS (5.2.1), de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

Procéder de la même façon avec le second milieu d'isolement sélectif (5.2) en utilisant une nouvelle anse.

9.4.2 Retourner les boîtes de gélose. Dans le cas des boîtes de gélose TCBS (9.4.1), les placer dans une étuve (6.1) réglée à 37 °C. Pour le second milieu d'isolement, suivre les instructions du fabricant.

9.4.3 Après 24 h ± 3 h d'incubation, examiner les boîtes (9.4.1 et 9.4.2) afin de rechercher la présence de colonies caractéristiques de *Vibrio* spp. présumés pathogènes. Marquer leur position sur le dessous de la boîte.

Il existe deux morphologies caractéristiques des colonies de *Vibrio* spp. sur gélose TCBS (5.2.1), comme suit:

- les colonies caractéristiques de *V. parahaemolyticus* sont lisses, vertes (saccharose négatif) et d'un diamètre de 2 mm à 3 mm;
- les colonies caractéristiques de *V. cholerae* sont lisses, jaunes (saccharose positif) et d'un diamètre de 2 mm à 3 mm.