
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour la recherche et le
dénombrement de *Campylobacter* spp. —**

**Partie 3:
Méthode semi-quantitative**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method
for detection and enumeration of Campylobacter spp. —
Part 3: Semi-quantitative method*

ISO/TS 10272-3:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010>



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 10272-3:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2010

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
5 Milieux de culture et réactifs	2
6 Appareillage	3
7 Échantillonnage	4
8 Préparation de l'échantillon pour essai	4
9 Mode opératoire.....	4
9.1 Généralités	4
9.2 Prise d'essai, suspension mère et dilutions	4
9.3 Enrichissement	4
9.4 Isolement	4
9.5 Confirmation des <i>Campylobacter</i> spp.	5
9.6 Identification des <i>Campylobacter</i> spp. (facultatif)	6
10 Calcul et expression des résultats	8
10.1 Mode de calcul	8
10.2 Fidélité	8
11 Rapport d'essai.....	9
Annexe A (normative) Schéma du mode opératoire	10
Annexe B (normative) Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs	11
Bibliographie.....	17

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 10272-3 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9 *Microbiologie*.

L'ISO 10272 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de Campylobacter spp.*:

- *Partie 1: Méthode de recherche*
- *Partie 2: Technique par comptage des colonies* [Spécification technique]
- *Partie 3: Méthode semi-quantitative* [Spécification technique]

Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, l'ISO 10272 peut ne pas convenir en tout point pour certains produits et, pour certains autres, il peut s'avérer nécessaire de recourir à des méthodes différentes.

Néanmoins, dans tous les cas, il convient autant que possible d'appliquer l'ISO 10272, tout écart n'étant justifié que par une absolue nécessité liée à des raisons techniques.

Lors de la prochaine révision de l'ISO 10272, toutes les informations alors disponibles relatives à la mesure dans laquelle les méthodes ont été suivies, et les raisons des écarts par rapport à celles-ci dans le cas de certains produits, seront prises en compte. L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou nationales peuvent déjà exister, lesquelles ne sont pas en conformité avec l'ISO 10272. Il est souhaitable que, lors de leur révision, de telles normes soient modifiées pour une mise en conformité avec l'ISO 10272 de sorte que, en fin de compte, les seules divergences restantes soient celles imposées pour des raisons techniques bien établies.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TS 10272-3:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010>

iTeh STANDARD PREVIEW **(standards.iteh.ai)**

ISO/TS 10272-3:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/df0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. —

Partie 3: Méthode semi-quantitative

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 10272 décrit une méthode horizontale relative pour la détermination semi-quantitative de *Campylobacter* spp.

Elle est applicable aux produits destinés à une consommation humaine ou aux aliments pour animaux et à des échantillons environnementaux dans le domaine de la production alimentaire et de la manipulation des aliments. Toutefois, il est possible que la présente partie de l'ISO 10272 ne convienne pas en tout point pour certains produits, des écarts étant rendus nécessaires par des raisons techniques. Il est possible que la présente partie de l'ISO 10272 ne s'applique pas du tout à certains autres produits.

(standards.iteh.ai)

2 Références normatives

ISO/TS 10272-3:2010

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 — Exigences générales et recommandations*

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Lignes directrices pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Lignes directrices générales d'assurance qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

ISO/TS 11133-2:2003, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

3 Termes et définitions

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

3.1

Campylobacter

(*Campylobacter* en microbiologie des aliments) microorganismes formant des colonies caractéristiques sur des milieux solides sélectifs lorsqu'ils sont incubés en microaérobie à 41,5 °C, et non à 25 °C, et présentant la mobilité caractéristique ainsi que les propriétés biochimiques et les propriétés de croissance décrites lorsque les essais sont réalisés conformément à la présente partie de l'ISO 10272

NOTE Les espèces les plus courantes sont *Campylobacter jejuni* et *C. coli*. Toutefois, d'autres espèces ont été décrites (*C. lari*, *C. upsaliensis* et quelques autres).

3.2
détermination semi-quantitative
(*Campylobacter* en microbiologie des aliments) détermination du niveau de contamination par *Campylobacter* lorsqu'un faible nombre est attendu ou si le niveau de la flore associée est relativement élevé

4 Principe

4.1 Généralité. La détermination semi-quantitative du *Campylobacter* spp. implique les étapes 4.2 à 4.4 (voir Figure A.1).

4.2 Enrichissement en milieu liquide sélectif. La prise d'essai et ses dilutions décimales sont inoculées ou diluées dans le milieu d'enrichissement liquide (bouillon de Bolton) et homogénéisées.

Le milieu d'enrichissement est incubé à 37 °C durant 4 h à 6 h puis à 41,5 °C durant (44 ± 4) h.

4.3 Isolement et sélection pour confirmation. À partir des cultures obtenues en 4.2, le milieu sélectif solide gélosé modifié à base de céfopérazone, de charbon et de désoxycholate de sodium (gélose mCCD) est inoculé, incubé à 41,5 °C en atmosphère microaérophile et observé après (44 ± 4) h en vue de détecter la présence de colonies supposées être des *Campylobacter* spp. en raison de leurs caractéristiques.

4.4 Confirmation. Les colonies supposées être des *Campylobacter* spp. sont ensemencées sur un milieu non sélectif, une gélose Colombia au sang; la confirmation est ensuite obtenue à l'aide d'un examen microscopique ainsi que des essais biochimiques et des essais de croissance appropriés. En option, les espèces *Campylobacter* spp. sont identifiées par des essais biochimiques spécifiques et par des essais de sensibilité aux antibiotiques.

ISO/TS 10272-3:2010
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0fbc4f-dfe9-45b2-b08b-41f0f32d0be7/iso-ts-10272-3-2010>

5 Milieux de culture et réactifs

5.1 Généralités. Pour la pratique de laboratoire courante, voir l'ISO 7218, l'ISO/TS 11133-1 et l'ISO/TS 11133-2.

NOTE En raison du grand nombre de milieux de culture et de réactifs et à des fins de clarté du texte, leurs compositions et préparations sont données dans l'Annexe B.

5.2 Milieu d'enrichissement liquide: bouillon de Bolton. Voir B.1.

5.3 Milieu d'isolement sélectif: gélose modifiée à base de céfopérazone, de charbon et de désoxycholate de sodium (gélose mCCD). Voir B.2.

5.4 Milieux et réactifs de confirmation et d'identification.

5.4.1 Gélose Colombia au sang. Voir B.3.

5.4.2 Bouillon Brucella. Voir B.4.

5.4.3 Réactif permettant la détection d'oxydase. Voir B.5.

5.4.4 Solution de peroxyde d'hydrogène, 3 % (fraction volumique).

5.4.5 Réactifs permettant de détecter l'hydrolyse de l'hippurate. Voir B.6.

5.4.6 Gélose de Mueller Hinton au sang. Voir B.7.

5.4.7 Disques d'acide nalidixique et de céfalotine. Chaque type de disque contient 30 µg de réactif.

5.4.8 Disques d'acétate d'indoxyle. Voir B.8.

6 Appareillage

Matériel de laboratoire de microbiologie courant (voir l'ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Appareil pour la stérilisation par chaleur sèche (étuve) ou stérilisation par voie humide (autoclave). Voir l'ISO 7218.

6.2 Étuve, hotte à flux laminaire ou incubateur, pouvant être maintenu(e) à des températures comprises entre 37 °C et 55 °C.

6.3 Incubateurs, pouvant être maintenus à (25 ± 1) °C, (37 ± 1) °C et $(41,5 \pm 1)$ °C.

6.4 Bain-marie, pouvant être maintenu à (37 ± 1) °C.

6.5 Bain-marie, pouvant être maintenu à une température comprise entre 47 °C et 50 °C.

6.6 pH-mètre, d'une précision de 0,1 unité de pH à 25 °C.

6.7 Récipients, en particulier des tubes de cultures de 18 mm × 180 mm et 9 mm × 180 mm, des tubes à hémolyse de 13 mm × 75 mm, des flacons avec des fermetures métalliques non toxiques et/ou des fioles de contenance adaptée, munies de couvercles appropriés.

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

6.9 Pipettes graduées à écoulement total, pourvues d'une large ouverture et d'une capacité nominale de 1 ml et de 10 ml, graduées par division de 0,1 ml, ISO 835^[1], classe A, et **pipettes Pasteur,** ISO 7712^[2].

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

6.11 Anses stériles, en platine iridié, en alliage nickel-chrome ou en matière plastique, de 3 mm de diamètre environ et des fils droits constitués des mêmes matériaux, ou une **baguette en plastique** ou une **baguette en verre**.

Ne pas utiliser une anse en alliage nickel-chrome pour l'essai de l'oxydase (voir 9.5.6).

6.12 Pincés, fines, à bouts ronds, en acier inoxydable.

6.13 Microscope, de préférence à contraste de phase (pour observer la mobilité caractéristique de *Campylobacter* spp.).

6.14 Appareil approprié pour obtenir une atmosphère microaérophile, avec des fractions volumiques en oxygène de (5 ± 2) %, en dioxyde de carbone de (10 ± 3) %, en hydrogène ≤ 10 % (facultatif), le complément étant de l'azote. Des récipients appropriés étanches aux gaz sont utilisés pour placer les boîtes de Petri et/ou les fioles ou flacons d'une contenance d'environ 350 ml employés pour le bouillon d'enrichissement, par exemple des jarres bactériologiques anaérobies.

NOTE 1 L'atmosphère microaérophile appropriée peut être obtenue au moyen de kits de génération de gaz disponibles dans le commerce en respectant scrupuleusement les instructions du fabricant, notamment celles relatives au volume de la jarre et à la capacité du kit de génération de gaz. La jarre peut également être remplie d'un mélange de gaz approprié avant l'incubation.

NOTE 2 Au lieu de l'incubation en atmosphère microaérophile, le bouillon d'enrichissement peut être incubé dans des flacons, fioles ou tubes pourvus d'un bouchon à vis et remplis dudit bouillon, en laissant un espace vide inférieur à 20 mm et en vissant hermétiquement les bouchons.

7 Échantillonnage

Il convient que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de la conservation.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 10272. Voir la Norme internationale spécifique se rapportant au produit concerné. S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées parviennent à un accord sur ce sujet.

Campylobacter spp. étant très sensible à la congélation, mais survivant mieux à basses températures, il est recommandé de conserver les échantillons à une température de $(+3 \pm 2) ^\circ\text{C}$ et de les analyser aussi vite que possible. Éviter également de laisser les échantillons se dessécher.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la partie pertinente de l'ISO 6887, traitant du produit concerné. Si l'ISO 6887 n'est pas appropriée, il est recommandé que les parties concernées parviennent à un accord sur ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Généralités

Voir Figure A.1.

9.2 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

9.2.1 Introduire une prise d'essai de x g ou x ml (minimum 15 g ou 15 ml), prélevée à partir de l'échantillon pour essai (Article 8), dans 8 fois (minimum 120 ml) son volume de milieu d'enrichissement, le bouillon de Bolton (5.2), et homogénéiser.

Il s'agit de la suspension mère.

9.2.2 Transférer 90 ml de suspension mère (9.2.1) dans un flacon de 100 ml. Cela représente 10 g de la prise d'essai. Lors de la lecture des résultats, cette dilution correspond à 10^1 .

9.2.3 Transférer 10 ml de suspension mère (9.2.1) dans un tube de culture. Lors de la lecture des résultats, cette dilution correspond à 10^0 . Après l'étape suivante de dilution (9.2.4), il reste 9 ml de cette dilution. Cela représente 1 g de la prise d'essai.

9.2.4 Procéder à une série de dilutions au 1/10 (par exemple jusqu'à 10^{-4}) à partir de la dilution 10^0 (9.2.3) en transférant 1,0 ml dans des tubes contenant 9,0 ml de bouillon de Bolton. Prélever et jeter 1,0 ml de la dilution la plus élevée, tous les tubes devant contenir 9,0 ml. Lors de la lecture des résultats, ces dilutions correspondent à 10^{-1} , 10^{-2} , etc.

9.3 Enrichissement

Incuber les prises d'essai et les dilutions (9.2.2, 9.2.3 et 9.2.4) en atmosphère microaérophile (6.14) à $37 ^\circ\text{C}$ durant 4 h à 6 h puis à $41,5 ^\circ\text{C}$ durant (44 ± 4) h.

9.4 Isolement

9.4.1 À partir de chacune des cultures obtenues dans le milieu d'enrichissement (9.3), inoculer la surface des boîtes de gélose du milieu d'isolement sélectif mCCD (5.3) au moyen d'une anse stérile (6.11).

9.4.2 Incuber les boîtes (9.4.1) à 41,5 °C en atmosphère microaérophile (6.14).

9.4.3 Après (44 ± 4) h d'incubation, examiner les boîtes pour détecter des colonies typiques et/ou supposées de *Campylobacter* spp.

Sur la gélose mCCD, les colonies typiques sont grisâtres, souvent avec un reflet métallique. Elles sont, en outre, plates et humides et présentent une tendance à s'étaler. Les colonies s'étalent moins sur des surfaces de gélose plus sèches. D'autres formes de colonies peuvent apparaître.

9.5 Confirmation des *Campylobacter* spp.

9.5.1 Généralités

Les bactéries se détériorant rapidement dans l'air, suivre sans délai le mode opératoire décrit de 9.5.2 à 9.5.6.

9.5.2 Sélection de colonies pour confirmation

9.5.2.1 Pour procéder à la confirmation, prélever sur chaque boîte (9.4.3) au moins une colonie considérée comme étant typique ou supposée être une colonie de *Campylobacter* spp., en examiner la morphologie et la mobilité par un examen microscopique (9.5.3.1) et procéder de la même façon avec au maximum quatre autres colonies si la première se révèle négative.

9.5.2.2 Ensemencer chacune des colonies sélectionnées sur une boîte de gélose Colombia au sang (5.4.1) afin de permettre le développement de colonies bien isolées. Incuber les boîtes en atmosphère microaérophile à 41,5 °C durant 24 h à 48 h. Utiliser les cultures pures pour l'examen de la morphologie, la mobilité, la croissance en microaérobie à 25 °C, la croissance en aérobie à 41,5 °C et la présence d'oxydase.

9.5.3 Examen de la morphologie et de la mobilité

9.5.3.1 Suspendre une colonie prélevée sur la gélose Colombia au sang (9.5.2.2) dans 1 ml de bouillon Brucella (5.4.2) ou dans une solution de peptone-sel et en examiner la morphologie et la mobilité au microscope (6.13).

9.5.3.2 Conserver pour les observations ultérieures toutes les cultures (9.5.2.2) révélant des bacilles courbés qui présentent une mobilité caractéristique spiralée «en tire-bouchon» (9.5.3.1).

9.5.4 Étude de la croissance à 25 °C (microaérobie)

À partir des colonies isolées en 9.5.2.2, ensemencer à l'aide d'une anse (6.11) la surface d'une gélose Colombia au sang (5.4.1)

Incuber la boîte à 25 °C en atmosphère microaérophile (6.14) durant (44 ± 4) h.

Examiner la boîte en vue de détecter une croissance visible de colonies de *Campylobacter* spp.

9.5.5 Étude de la croissance à 41,5 °C (aérobie)

À partir des colonies isolées en 9.5.2.2, ensemencer à l'aide d'une anse (6.11) la surface d'une gélose Colombia au sang (5.4.1).

Incuber la boîte à 41,5 °C en atmosphère aérobie durant (44 ± 4) h.

Examiner la boîte en vue de détecter une croissance visible de colonies de *Campylobacter* spp.