

---

---

**Microbiologie de la chaîne  
alimentaire — Méthode horizontale  
par la recherche et le dénombrement  
des *Enterobacteriaceae* —**

Partie 1:  
**Recherche des *Enterobacteriaceae***

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the  
detection and enumeration of Enterobacteriaceae —*

*Part 1: Detection of Enterobacteriaceae*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/96c5ab2f-e5b8-4848-85ce-bcdf11466f5d/iso-21528-1-2017>



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

ISO 21528-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/96c5ab2f-e5b8-4848-85ce-bcdf11466f5d/iso-21528-1-2017>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
copyright@iso.org  
www.iso.org

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
4.1    Enrichissement en milieu non sélectif.....	2
4.2    Isolement et sélection pour confirmation.....	2
4.3    Confirmation.....	2
<b>5</b> <b>Diluants, milieux de culture et réactifs</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Matériel et consommables</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>3</b>
<b>8</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>4</b>
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>4</b>
9.1    Généralités.....	4
9.2    Prise d'essai et suspension mère.....	4
9.3    Enrichissement.....	4
9.4    Isolement et sélection pour confirmation.....	4
9.4.1    Isolement.....	4
9.4.2    Sélection des colonies pour confirmation.....	4
9.5    Repiquage des colonies sélectionnées.....	5
9.6    Essais de confirmation biochimiques.....	5
9.6.1    Réaction à l'oxydase.....	5
9.6.2    Essai de fermentation.....	5
<b>10</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>5</b>
<b>11</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>5</b>
11.1    Essai interlaboratoires.....	5
11.2    Sensibilité.....	6
11.3    Spécificité.....	6
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>6</b>
<b>13</b> <b>Assurance qualité</b> .....	<b>6</b>
<b>Annexe A (informative) Dénombrement à l'aide de la technique NPP</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe B (normative) Milieux de culture et réactifs</b> .....	<b>10</b>
<b>Annexe C (informative) Études de validation de la méthode et caractéristiques de performance</b> .....	<b>16</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>19</b>

## 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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note de différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/patents](http://www.iso.org/patents)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute autre information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [www.iso.org/iso/foreword.html](http://www.iso.org/iso/foreword.html)

Le présent document a été élaboré par le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 21528-1:2004) qui a fait l'objet d'une révision technique en appliquant les modifications principales suivantes:

- la méthode NPP est devenue une Annexe informative A;
- l'étape de pré-enrichissement dans l'EPT suivie de l'enrichissement dans le milieu EE a été remplacée par un enrichissement dans de l'EPT[Z] et la confirmation a désormais lieu dans le milieu OF glucosé au lieu de la gélose au glucose;
- des essais de performance pour l'assurance qualité des milieux de culture ont été ajoutés;
- des caractéristiques de performance applicables à la présente méthode ont été ajoutées dans l'[Annexe C](#).

Une liste de toutes les parties de la série ISO 21528 est disponible sur le site Internet de l'ISO.

## Introduction

Le présent document est destiné à fournir des directives générales pour l'examen des produits non concernés par les Normes internationales existant actuellement et devant être prises en considération par les organismes élaborant des méthodes d'essai microbiologiques applicables aux aliments et aliments pour animaux. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tout leur détail, ne conviennent pas à certains produits et que, pour certains autres produits, il soit 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, les directives données et qu'il sera fait recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Les principales modifications, énumérées dans l'avant-propos, introduites dans le présent document par rapport à l'ISO 21528-1:2004, sont considérées comme majeures (voir l'ISO 17468).

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou nationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec la présente méthode horizontale. Lorsque de telles normes seront en révision, il serait souhaitable de les modifier de façon à se conformer au présent document si bien que, au final, les seules divergences restantes par rapport à la présente méthode horizontale seront celles nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

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

[ISO 21528-1:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/96c5ab2f-e5b8-4848-85ce-bcdf1466f5d/iso-21528-1-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/96c5ab2f-e5b8-4848-85ce-bcdf1466f5d/iso-21528-1-2017>

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

ISO 21528-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/96c5ab2f-e5b8-4848-85ce-bcdf1466f5d/iso-21528-1-2017>

# Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale par la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* —

## Partie 1: Recherche des *Enterobacteriaceae*

**AVERTISSEMENT** — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de recherche des *Enterobacteriaceae* ne soient réalisés que dans des laboratoires équipés à cet effet, sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit apporté à la mise au rebus de tous les éléments incubés. Il convient que les utilisateurs du présent document connaissent bien les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter de tous les aspects de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente norme d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité.

### 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode pour la recherche des *Enterobacteriaceae* avec enrichissement. Elle est applicable:

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

Cette méthode est applicable:

- lorsque les micro-organismes recherchés nécessitent une revivification par enrichissement, et
- lorsque le nombre recherché est supposé être inférieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

Des limites sont imposées aux possibilités d'application du présent document du fait que ces méthodes sont sujettes à de grandes variations (voir [l'Article 11](#)).

**NOTE** Le dénombrement peut être effectué en calculant le nombre le plus probable (NPP) après incubation en milieu liquide. Voir [l'Annexe A](#).

### 2 Références normatives

Les documents suivants sont référencés dans le texte de sorte qu'une partie ou la totalité de leur contenu constitue les exigences 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 de la chaîne alimentaire — 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 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

### 3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

#### 3.1

##### ***Enterobacteriaceae***

micro-organisme formant des colonies caractéristiques sur gélose au cristal violet, à la bile et au glucose, fermentant le glucose et donnant une réaction oxydase négative lorsque les essais sont effectués selon les méthodes spécifiées dans le présent document

#### 3.2

##### **recherche des *Enterobacteriaceae***

détermination d'*Enterobacteriaceae* (3.1), dans une masse ou un volume déterminé de produit ou une unité de surface, lorsque les essais sont effectués conformément au présent document

### 4 Principe

#### 4.1 Enrichissement en milieu non sélectif

Ensemencement de la prise d'essai dans l'eau peptonée tamponnée (EPT), puis incubation à 37 °C (ou 30 °C) pendant 18 h.

NOTE La température d'incubation de 37 °C pour l'enrichissement et l'isolement/le dénombrement sur boîte est généralement utilisée lorsque les *Enterobacteriaceae* sont recherchées et dénombrées en tant qu'indicateur d'hygiène. Sinon, une température de 30 °C peut être choisie lorsque la détection ou le dénombrement des *Enterobacteriaceae* est entrepris(e) dans le cadre d'un procédé technologique et comprend des *Enterobacteriaceae* psychrotrophes. Dans le présent document, une température de 37 °C sera utilisée tout au long du texte.

#### 4.2 Isolement et sélection pour confirmation

Ensemencement de la gélose à la bile, au cristal violet et au glucose (VRBG) avec la culture obtenue après enrichissement dans de l'EPT, puis incubation à 37 °C. Examen après 24 h pour rechercher la présence de colonies typiques d'*Enterobacteriaceae* présumées.

#### 4.3 Confirmation

Repiquage des colonies typiques d'*Enterobacteriaceae* présumées sur milieu non sélectif et confirmation au moyen de tests de fermentation du glucose et de l'oxydase.

### 5 Diluants, milieux de culture et réactifs

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

La composition des milieux de culture et des réactifs et leur préparation sont spécifiées dans l'[Annexe B](#).

Pour les essais de performance des milieux de culture, voir l'ISO 11133 et l'[Annexe B](#).



## 6 Matériel et consommables

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si les spécifications sont appropriées. Matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218), et en particulier, ce qui suit.

**6.1 Appareil de stérilisation en chaleur sèche (four) et en chaleur humide (autoclave)**, tel que spécifié dans l'ISO 7218.

**6.2 Étuve**, réglable à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  (ou  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ).

**6.3 Enceinte de séchage** (ventilée par convection) ou **étuve** réglable entre  $25\text{ °C}$  et  $50\text{ °C}$ .

**6.4 Bain d'eau**, ou un appareil similaire, réglable entre  $47\text{ °C}$  et  $50\text{ °C}$ .

**6.5 Récipients** (par exemple flacons, tubes à essai, fioles) convenant pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture.

**6.6 Tubes à essai**, ou **flacons**, de capacité appropriée.

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

**6.8 Anses** (de 3 mm de diamètre environ) et **fils droits**, en platine iridié ou en nickel-chrome, ou **inoculateurs en verre**, ou anses ou aiguilles d'ensemencement stériles jetables.

**6.9 Pipettes graduées** ou **pipettes automatiques**, de capacités nominales de 10 ml, 1 ml et 0,1 ml.

**6.10 pH mètre**, précis à  $\pm 0,1$  unité de pH à  $25\text{ °C}$ .

**6.11 Homogénéisateur**, tel que spécifié dans l'ISO 7218.

## 7 Échantillonnage

L'échantillonnage n'entre pas dans le cadre de la méthode spécifiée dans le présent document. Voir la Norme internationale spécifique au produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique à l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

Des techniques d'échantillonnage recommandées sont données dans:

- l'ISO/TS 17728 applicable aux aliments destinés à l'alimentation humaine et animale;
- l'ISO 13307 applicable au stade de production primaire;
- l'ISO 17604 applicable aux carcasses;
- l'ISO 18593 applicable aux échantillons d'environnement.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif et non endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

## 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 est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Généralités

Voir l'ISO 7218.

### 9.2 Prise d'essai et suspension mère

En général, une quantité de prise d'essai (masse ou volume) est ajoutée à une quantité d'EPT (masse ou volume) pour produire une dilution décimale correspondante. Par exemple, une prise d'essai de 10 g est mélangée avec 90 ml d'EPT.

Le présent document a été validé pour des prises d'essai de 10 g ou 10 ml. Une prise d'essai de taille inférieure peut être utilisée, sans avoir besoin de validation/vérification supplémentaire, à condition de maintenir le même rapport entre bouillon d'enrichissement et prise d'essai. Une prise d'essai de taille supérieure à celle validée au départ peut être utilisée, si une étude de validation/vérification n'a révélé aucun effet indésirable sur la recherche des *Enterobacteriaceae*.

NOTE La validation peut être effectuée conformément aux documents appropriés de l'ISO 16140 (toutes les parties). La vérification applicable au regroupement d'échantillons peut être réalisée conformément au protocole décrit dans l'ISO 6887-1:2017, Annexe D.

### 9.3 Enrichissement

Incuber la suspension mère (9.2) à 37 °C pendant 18 h ± 2 h.

Poursuivre le mode opératoire en procédant à l'isolement et à la sélection des colonies pour confirmation (9.4).

### 9.4 Isolement et sélection pour confirmation

#### 9.4.1 Isolement

À l'aide d'une anse (6.8), ensemercer, en stries, à partir du milieu d'enrichissement incubé (voir en 9.3), la surface d'une boîte contenant le milieu sélectif (B.2) et incuber la boîte à 37 °C (voir la note dans l'Article 4) pendant 24 h ± 2 h.

#### 9.4.2 Sélection des colonies pour confirmation

Les colonies caractéristiques sont de couleur rose à rouge ou violette (avec ou sans halo de précipitation).

Marquer les colonies suspectes provenant des boîtes incubées (voir en 9.4.1). Choisir au moins une colonie typique ou suspecte pour le repiquage (voir en 9.5) et les essais de confirmation biochimiques (voir en 9.6). Si elle est négative, choisir jusqu'à quatre colonies suspectes de plus.

Si plus d'un type morphologique est présent parmi les colonies, sélectionner une colonie de chaque morphologie pour en faire le repiquage.

Certaines *Enterobacteriaceae* peuvent causer une décoloration de leurs colonies ou du milieu. Par conséquent, si aucune colonie caractéristique n'est présente, choisir les colonies blanchâtres pour la confirmation.

## 9.5 Repiquage des colonies sélectionnées

Ensemencer, en stries, sur un milieu non sélectif (par exemple, des boîtes de gélose nutritive) (B.3) chacune des colonies sélectionnées pour la confirmation (voir en 9.4.2).

Incuber ces boîtes à 37 °C pendant 24 h ± 2 h.

Sélectionner une colonie bien isolée à partir de chacune des boîtes incubées en vue des essais de confirmation biochimiques (voir en 9.6).

## 9.6 Essais de confirmation biochimiques

### 9.6.1 Réaction à l'oxydase

À l'aide d'une anse ou d'un fil en platine iridié ou d'un inoculateur en verre (6.8), prélever une fraction de chaque colonie bien isolée (voir en 9.5) et la déposer sur un morceau de papier filtre humecté de réactif à l'oxydase (B.5) ou sur un disque ou une bandelette disponible dans le commerce. Il ne faut pas utiliser d'anse ni de fil en nickel-chrome.

Considérer l'essai comme négatif si la couleur du papier filtre ne devient pas bleu foncé-pourpre dans les 10 s.

Pour les disques ou bandelettes prêt(e)s à l'emploi, se conformer aux instructions du fabricant.

### 9.6.2 Essai de fermentation

Repiquer, par piqûre à l'aide d'un fil droit (6.8), les mêmes colonies que celles sélectionnées en 9.6 qui ont donné un résultat négatif à l'essai de l'oxydase dans des tubes contenant le milieu OF glucosé (B.4). Recouvrir la surface du milieu avec au moins 1 cm d'huile minérale stérile (B.6).

Incuber ces tubes à 37 °C pendant 24 h ± 2 h.

Si une couleur jaune se développe dans la totalité du contenu du tube, la réaction est considérée comme positive.

## 10 Expression des résultats

Si l'une des colonies caractéristiques sélectionnées (voir en 9.4.2) d'un repiquage (voir en 9.4.1) est oxydase négative et glucose positive, l'échantillon à partir duquel le repiquage a été obtenu est considéré comme contenant des *Enterobacteriaceae*. Selon l'interprétation des résultats, indiquer si des *Enterobacteriaceae* sont détectées ou non dans une prise d'essai de  $x$  g ou  $x$  ml de produit, ou sur la surface prélevée, ou dans des objets entiers (par exemple, chaussettes de prélèvement).

## 11 Fidélité

### 11.1 Essai interlaboratoires

Les caractéristiques de performance de la méthode ont été déterminées lors d'un essai interlaboratoires pour déterminer la spécificité, la sensibilité et la LOD<sub>50</sub> de la méthode. Les données sont récapitulées dans l'Annexe C. Les valeurs extraites de l'essai interlaboratoires peuvent ne pas s'appliquer aux types de produits alimentaires autres que ceux données dans l'Annexe C.

NOTE Dans le présent document, le terme «type» est associé au terme «aliment» pour améliorer la lisibilité du présent document. Cependant, le terme «aliment» peut être remplacé par «aliment pour animaux» et par les autres secteurs de la chaîne alimentaire tels que mentionnés dans le domaine d'application du présent document.