
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Méthode horizontale
pour la recherche et le
dénombrement de *Campylobacter* spp.**

Partie 2:
Technique par comptage des colonies

(standards.iteh.ai)

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection
and enumeration of *Campylobacter* spp. —*

<https://standards.iteh.org/catalog/standards/sist/81c28657-1695-4d32-9041-0ecde457236a/iso-10272-2-2017>
Part 2: Colony-count technique



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10272-2:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f4c28657-1695-4d32-9041-0ecde457236a/iso-10272-2-2017>



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

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 Préparation des dilutions.....	2
4.3 Dénombrement.....	2
4.4 Confirmation.....	2
5 Milieux de culture et réactifs	2
6 Matériel et consommables	3
7 Échantillonnage	3
8 Préparation de l'échantillon pour essai	3
9 Mode opératoire	4
9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions.....	4
9.2 Ensemencement et incubation.....	4
9.3 Dénombrement des colonies caractéristiques.....	4
9.4 Confirmation de <i>Campylobacter</i>	4
9.4.1 Généralités.....	4
9.4.2 Sélection des colonies à confirmer.....	5
9.4.3 Examen de la morphologie et de la mobilité.....	5
9.4.4 Étude de la croissance aérobie à 25 °C.....	5
9.4.5 Recherche de l'activité de l'oxydase.....	5
9.4.6 Interprétation.....	5
9.5 Identification de l'espèce de <i>Campylobacter</i> (facultative).....	6
9.5.1 Généralités.....	6
9.5.2 Recherche de l'activité de la catalase.....	6
9.5.3 Recherche de l'hydrolyse de l'hippurate.....	6
9.5.4 Recherche de l'hydrolyse de l'acétate d'indoxyle.....	6
9.5.5 Interprétation.....	7
10 Expression des résultats	7
11 Caractéristiques de performance de la méthode	7
11.1 Étude interlaboratoires.....	7
11.2 Limite de répétabilité.....	7
11.3 Limite de reproductibilité.....	8
12 Rapport d'essai	9
Annexe A (normative) Représentation schématique du mode opératoire	10
Annexe B (normative) Milieux de culture et réactifs	11
Annexe C (informative) Études de validation des méthodes et caractéristiques de performance	16
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 (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 des 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).

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/brevets).

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 information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/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 première édition annule et remplace l'ISO/TS 10272-2:2006, qui a fait l'objet d'une révision technique. Les modifications suivantes ont été apportées:

- ajout des échantillons provenant de l'étape de production primaire au domaine d'application;
- ensemencement unique des dilutions en série plutôt qu'en double, pour respecter l'ISO 7218;
- remplacement des essais de confirmation de l'étude de la croissance microaérophile à 25 °C et de la croissance aérobie à 41,5 °C par l'étude de la croissance aérobie à 25 °C;
- ajout à l'[Annexe B](#) d'essais de performance relatifs à l'assurance qualité des milieux de culture;
- ajout des caractéristiques de performance à l'[Annexe C](#).

Une liste de toutes les parties de la série ISO 10272 est disponible sur le site Internet de l'ISO.

Introduction

Les principaux changements énumérés dans l'avant-propos qui ont été apportés au présent document par rapport à l'ISO/TS 10272-2:2006 sont considérés comme mineurs (voir l'ISO 17468).

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il se peut que la présente méthode horizontale ne convienne pas exactement, dans tous ses détails, à certains d'entre eux et que, pour certains autres, il puisse être nécessaire d'employer d'autres méthodes. Néanmoins, il est à espérer que tous les efforts seront entrepris dans tous les cas afin d'appliquer, dans la mesure du possible, la présente méthode horizontale et qu'il n'y aura d'écarts par rapport à celle-ci qu'en cas d'absolue nécessité et pour des raisons techniques.

Lors du prochain réexamen périodique du présent document, 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 des méthodes d'essai ne peut être instantanée et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou nationales ne concordant pas avec la présente méthode horizontale existent peut-être déjà. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec les spécifications du présent document et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 10272-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f4c28657-1695-4d32-9041-0ecde457236a/iso-10272-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f4c28657-1695-4d32-9041-0ecde457236a/iso-10272-2-2017>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 10272-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f4c28657-1695-4d32-9041-0ecde457236a/iso-10272-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f4c28657-1695-4d32-9041-0ecde457236a/iso-10272-2-2017>

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. —

Partie 2: Technique par comptage des colonies

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de dénombrement de *Campylobacter* ne soient effectués que dans des laboratoires correctement équipés, sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit apporté à l'élimination de tous les matériaux incubés. Il convient que les personnes qui utilisent le présent document connaissent les pratiques classiques de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les aspects de la sécurité (s'il y en a) qui sont liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode horizontale de dénombrement de *Campylobacter* spp. Il s'applique:

- aux produits destinés à la consommation humaine;
- aux produits destinés à l'alimentation des animaux;
- aux échantillons environnementaux prélevés dans les secteurs de la production et de la manutention des aliments; et
- aux échantillons au stade de la production primaire tels que les matières fécales des animaux, la poussière et les prélèvements de surface.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des 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

Campylobacter

microorganismes formant des colonies caractéristiques sur des milieux sélectifs solides lorsqu'ils sont incubés en atmosphère microaéroophile à 41,5 °C et possédant la mobilité et la morphologie caractéristiques, ainsi que les propriétés biochimiques et de croissance décrites lorsque les essais sont réalisés conformément au présent document

Note 1 à l'article: Le présent document vise les espèces *Campylobacter* thermotolérantes pertinentes pour la santé humaine. Les espèces le plus souvent rencontrées et les plus pertinentes pour la santé humaine sont *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*. D'autres espèces ont toutefois été décrites (*Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, et autres).

3.2

dénombrement de *Campylobacter*

détermination du nombre d'unités formant colonies (ufc) de *Campylobacter* (3.1) par gramme, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif d'échantillonnage lorsque l'essai est réalisé conformément au présent document

4 Principe

4.1 Généralités

Le dénombrement de *Campylobacter* exige trois étapes successives telles que spécifiées dans l'[Annexe A](#).

4.2 Préparation des dilutions

Pour la préparation des dilutions décimales de la prise d'essai, voir l'ISO 6887.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f4c28657-1695-4d32-9041-0ecde457236a/iso-10272-2-2017>

4.3 Dénombrement

Ensemencement du milieu sélectif solide à base de gélose modifiée à la céfopérazone, au charbon et au désoxycholate (gélose mCCD) par une quantité spécifiée de prise d'essai si le produit est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Préparation d'autres géloses dans les mêmes conditions à partir de dilutions décimales de la prise d'essai ou de la suspension mère.

Incubation des boîtes en atmosphère microaéroophile à 41,5 °C et examen au bout de 44 h afin de consigner le nombre de colonies présumées de *Campylobacter*.

4.4 Confirmation

Examen au microscope de la morphologie et de la mobilité des colonies présumées de *Campylobacter*, repiquage de ces colonies sur un milieu non sélectif (gélose au sang), puis confirmation par recherche de l'activité de l'oxydase et test de croissance aérobique à 25 °C. Identification facultative des espèces de *Campylobacter* par des tests biochimiques et/ou des méthodes moléculaires spécifiques.

Calcul du nombre d'unités formant colonies (ufc) de *Campylobacter* par unité de prise d'essai à partir du nombre confirmé de colonies caractéristiques par boîte.

5 Milieux de culture et réactifs

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218 et l'ISO 11133.

La composition des milieux de culture et des réactifs ainsi que leur préparation sont décrites à l'[Annexe B](#).

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

6 Matériel et consommables

Le matériel jetable est une alternative acceptable à la verrerie réutilisable si ses spécifications sont appropriées.

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

6.1 Étuves, réglables à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

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

6.3 Anses stériles, de 10 µl et 1 µl de volume, et **aiguille** ou **fil à ensemercer**.

L'anse en nickel-chrome ne convient pas au test de l'oxydase (voir [9.4.5](#)).

6.4 Microscope, de préférence à contraste de phase, pour observer la morphologie et le mouvement caractéristiques des *Campylobacter*.

6.5 Appareillage approprié à la culture en atmosphère microaéroophile, permettant de maintenir tout au long de l'incubation une teneur de $5\% \pm 2\%$ en oxygène, de $10\% \pm 3\%$ en dioxyde de carbone, $\leq 10\%$ en hydrogène (facultatif) et le complément en azote.

Une atmosphère microaéroophile appropriée peut être obtenue en utilisant des jarres étanches aux gaz et des sachets générateurs de gaz (suivre rigoureusement les instructions du fabricant). Alternativement, il est possible d'injecter dans la jarre ou l'étuve, avant l'incubation, un mélange gazeux avec les proportions des différents gaz appropriés.

6.6 Boîtes de Petri stériles, d'un diamètre de 90 mm environ et (facultatif) de grande taille (diamètre d'environ 140 mm), de préférence dotées d'aérations pour faciliter l'incubation microaéroophile.

6.7 Réfrigérateurs, réglables à $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

7 Échantillonnage

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

Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO/TS 17728 pour les aliments, dans l'ISO 13307 pour l'échantillonnage au stade de production primaire, dans l'ISO 17604 pour l'échantillonnage sur les carcasses et dans l'ISO 18593 pour l'échantillonnage des surfaces.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, et il convient que l'échantillon n'ait pas été endommagé ou altéré lors du transport ou du stockage.

Étant donné que les *Campylobacter* sont très sensibles à la congélation, mais qu'ils survivent bien à basse température, il convient de ne pas congeler les échantillons à analyser, mais de les conserver à 3 °C ([6.7](#)) et de les analyser le plus rapidement possible. Par ailleurs, éviter la déshydratation des échantillons.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai à partir de l'échantillon de laboratoire, conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné: voir l'ISO 6887 (toutes les parties). En l'absence de

Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir l'ISO 6887 et la Norme internationale spécifique du produit concerné.

Préparer une seule série de dilutions décimales à partir de la prise d'essai si le produit est liquide et à partir de la suspension mère dans le cas des autres produits.

9.2 Ensemencement et incubation

9.2.1 À l'aide d'une pipette stérile, transférer 0,1 ml de suspension mère (ou de l'échantillon si le produit est liquide) (9.1) sur la gélose mCCD (B.3). Répéter l'opération autant de fois que nécessaire pour les autres dilutions décimales. Si seule la suspension mère est utilisée, préparer également des géloses en double en utilisant une boîte de gélose supplémentaire.

Si, pour certains produits, il est nécessaire d'estimer de faibles nombres de *Campylobacter*, la limite de dénombrement peut être abaissée d'un facteur de 10 en examinant 1,0 ml de suspension mère. Répartir 1,0 ml d'inoculum à la surface du milieu gélosé soit dans une grande boîte de Petri (140 mm), ou dans trois boîtes de gélose de taille standard (90 mm). Dans les deux cas, préparer le tout en double en utilisant deux grandes boîtes ou six boîtes de taille standard.

9.2.2 À l'aide d'un étaleur stérile, étaler uniformément l'inoculum aussi rapidement que possible à la surface de la boîte de gélose, sans toucher les parois de la boîte de Petri avec l'étaleur.

NOTE Le séchage des boîtes est critique pour l'obtention de boîtes pouvant être dénombrées. Chaque laboratoire doit utiliser sa propre méthode normalisée pour obtenir un séchage correct des boîtes.

9.2.3 Incuber les boîtes (9.2.2) à 41,5 °C (6.1) en atmosphère microaérophile (6.5).

9.3 Dénombrement des colonies caractéristiques

9.3.1 Après 44 h ± 4 h d'incubation, examiner les boîtes (9.2.3) afin de rechercher la présence de colonies caractéristiques et/ou suspectes de *Campylobacter*.

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

NOTE La reconnaissance des colonies de *Campylobacter* est, dans une large mesure, une question d'expérience et leur apparence peut varier quelque peu, non seulement d'une souche à l'autre, mais également entre deux lots du milieu de culture sélectif utilisé.

9.3.2 Sélectionner les boîtes (9.3.1) contenant moins de 150 colonies caractéristiques ou suspectes; compter les colonies et consigner le nombre de colonies présumées par boîte. Sélectionner ensuite au hasard cinq colonies pour les repiquer aux fins des tests de confirmation (9.4).

9.4 Confirmation de *Campylobacter*

9.4.1 Généralités

Les *Campylobacter* s'altérant rapidement à l'air libre, suivre sans tarder le mode opératoire décrit de 9.4.2 à 9.4.5.

Pour pouvoir distinguer clairement une réaction de confirmation positive d'une réaction de confirmation négative, il est utile de vérifier ce point avec des souches de contrôles positif et négatif bien caractérisées, en utilisant, par exemple, les souches de contrôle appropriées suivantes: *Campylobacter jejuni* WDCM 00005 (contrôle positif)^[10] et *Escherichia coli* WDCM 00013 (contrôle négatif).

Pour remplacer ou bien venir en complément des essais de confirmation et d'identification décrits dans le présent document, d'autres essais (analyses PCR, méthodes sérologiques, spectrométrie de masse à temps de vol avec désorption-ionisation par impact laser assistée par matrice (MALDI-TOF-MS), etc.) peuvent être utilisés, à condition de vérifier l'applicabilité de cet autre mode opératoire (voir l'ISO 7218).

9.4.2 Sélection des colonies à confirmer

9.4.2.1 Pour les tests de confirmation, sélectionner cinq colonies présumées de chaque boîte retenue pour le dénombrement (9.3.2).

9.4.2.2 Ensemencer en stries chacune des colonies sélectionnées sur une gélose au sang non sélective, par exemple une gélose au sang Columbia (B.4) de façon à obtenir des colonies bien isolées. Incuber les boîtes en atmosphère microaérophile (6.5) à 41,5 °C (6.1) pendant 24 h à 48 h. Utiliser les colonies nouvellement obtenues, bien isolées, pour examiner la morphologie et la mobilité (9.4.3), constater l'absence de croissance aérobie à 25 °C (9.4.4) et la présence d'une activité de l'oxydase (9.4.5).

NOTE Il est possible d'examiner au préalable la colonie suspecte à la recherche d'une morphologie et d'une motilité caractéristiques avant ensemencement en stries sur la gélose au sang.

9.4.3 Examen de la morphologie et de la mobilité

9.4.3.1 Examiner au microscope (6.4) la morphologie et la mobilité d'une colonie nouvellement obtenue sur chacune des boîtes individuelles (9.4.2.2).

9.4.3.2 Conserver, pour les observations ultérieures, toutes les cultures (9.4.2.2) dans lesquelles se trouvent des bacilles incurvés, dont le mouvement de déplacement en vrille est caractéristique (9.4.3.1).

9.4.4 Étude de la croissance aérobie à 25 °C

À partir des colonies isolées en 9.4.2.2, ensemencer à l'aide d'une anse (6.3) la surface d'une gélose au sang non sélective, par exemple une gélose au sang Columbia (B.4).

Incuber la boîte à 25 °C (6.1) en atmosphère aérobie pendant 44 h ± 4 h.

Examiner la boîte afin de s'assurer de l'absence de tout développement de colonies.

9.4.5 Recherche de l'activité de l'oxydase

À l'aide d'une anse (6.3), prélever une partie d'une colonie bien isolée sur chacune des boîtes individuelles (9.4.2.2) et la déposer sur un papier filtre imbibé de réactif de l'oxydase (B.5); l'apparition d'une coloration mauve, violette ou bleu foncé après environ 10 s indique une réaction positive. Si un kit commercial pour la recherche de l'oxydase est utilisé, suivre les instructions du fabricant.

9.4.6 Interprétation

Les *Campylobacter* donnent les résultats fournis dans le [Tableau 1](#).