

---

---

**Microbiologie de la chaîne  
alimentaire — Recherche des larves  
de *Trichinella* dans la viande par une  
méthode de digestion artificielle**

*Microbiology of the food chain — Detection of *Trichinella* larvae  
in meat by artificial digestion method*

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

[ISO 18743:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cbd5f83b-b854-4408-b1fa-19c5b972b9f1/iso-18743-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cbd5f83b-b854-4408-b1fa-19c5b972b9f1/iso-18743-2015>



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

ISO 18743:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cbd5f83b-b854-4408-b1fa-19c5b972b9f1/iso-18743-2015>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2015, 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>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
4.1 Généralités.....	2
4.2 Taille de l'échantillon.....	2
4.3 Broyage de l'échantillon de muscle.....	2
4.4 Préparation du liquide de digestion.....	3
4.5 Digestion de la viande hachée.....	3
4.6 Filtration du liquide de digestion.....	3
4.7 Sédimentation du liquide de digestion.....	3
4.8 Examen microscopique.....	3
4.9 Vérification des résultats.....	4
<b>5</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>4</b>
<b>6</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>4</b>
<b>7</b> <b>Prélèvement d'échantillons, étiquetage et transport</b> .....	<b>5</b>
<b>8</b> <b>Préparation des échantillons</b> .....	<b>5</b>
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>6</b>
9.1 Généralités.....	6
9.2 Broyage.....	6
9.3 Préparation du liquide de digestion.....	6
9.4 Digestion de la viande hachée dans le bœcher en verre.....	6
9.5 Filtration du liquide de digestion.....	7
9.6 Sédimentation du liquide de digestion dans l'ampoule à décanter.....	7
9.7 Collecte des sédiments primaire et secondaire.....	7
9.8 Examen microscopique.....	8
<b>10</b> <b>Documentation</b> .....	<b>8</b>
<b>11</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>9</b>
<b>12</b> <b>Mesures de sécurité</b> .....	<b>9</b>
<b>Annexe A (normative) Prélèvement d'échantillons</b> .....	<b>10</b>
<b>Annexe B (normative) Échantillons congelés</b> .....	<b>12</b>
<b>Annexe C (informative) Méthode de digestion artificielle utilisant l'agitateur magnétique</b> .....	<b>13</b>
<b>Annexe D (informative) Exemple de fiche technique de laboratoire pour consigner les données lors de la recherche par digestion d'échantillons regroupés</b> .....	<b>15</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>16</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 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](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/brevets](http://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 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: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cbd5183b-b854-4408-b11a-19c5b972b9f1/iso-18743-2015).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

## Introduction

Le genre *Trichinella* spp. est l'agent pathogène responsable de la trichinellose humaine, une maladie qui présente un risque pour la santé publique et, par conséquent, représente également un problème économique dans le domaine de la production porcine. En raison de l'importance zoonotique de cette infection dans de nombreux pays, les efforts se sont essentiellement concentrés sur la maîtrise et/ou l'éradication de *Trichinella* chez le porc domestique, qui est la principale source d'infection humaine dans le monde. Les méthodes de digestion permettant la détection des larves de *Trichinella* dans les échantillons de muscle de porcs et d'autres espèces animales sensibles destinées à la consommation humaine (par exemple, chevaux, sangliers, morses et ours) sont efficaces pour prévenir la trichinellose clinique chez l'homme. En raison des limites de sensibilité des méthodes de digestion, il est possible que ces dernières ne détectent pas les animaux infectés par un très petit nombre de larves dans les échantillons de muscle, ce qui peut constituer un risque d'infections subcliniques chez l'homme.

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

[ISO 18743:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cbd5f83b-b854-4408-b1fa-19c5b972b9f1/iso-18743-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cbd5f83b-b854-4408-b1fa-19c5b972b9f1/iso-18743-2015>

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

ISO 18743:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cbd5f83b-b854-4408-b1fa-19c5b972b9f1/iso-18743-2015>

# Microbiologie de la chaîne alimentaire — Recherche des larves de *Trichinella* dans la viande par une méthode de digestion artificielle

**AVERTISSEMENT** — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter de tous les problèmes 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 et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode de détection de larves musculaires de *Trichinella* spp. dans la viande provenant de carcasses individuelles d'animaux destinées à la consommation humaine. Elle est applicable à l'examen de viande d'espèces animales domestiques et sauvages qui peuvent être infectées par des nématodes du genre *Trichinella*.

Cette méthode ne permet pas d'identifier l'espèce ou le génotype des parasites détectés; l'identification de l'espèce ou du génotype peut être réalisée à l'aide de méthodes moléculaires.

La méthode décrite dans la présente Norme internationale est destinée à être utilisée en association avec les lignes directrices du Manuel des tests de diagnostic et des vaccins de l'OIE et celles émises par la Commission internationale sur la trichinellose (ICT) pour la recherche de *Trichinella* et l'inspection de carcasses destinées à la consommation humaine, sauf s'il a été prouvé par d'autres moyens que l'animal ne risquait pas d'avoir été exposé à *Trichinella*.

La méthode de digestion artificielle utilisant un agitateur magnétique est considérée comme la méthode normalisée puisqu'il a été démontré, lors d'études de validation, qu'elle donne les résultats les plus fiables.

**NOTE** Si l'équivalence avec la méthode décrite dans la présente Norme internationale peut être documentée, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour l'analyse.

## 2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à 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 7218:2007, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

Commission internationale sur la trichinellose (ICT), « Quality Assurance in Digestion Testing Programs for *Trichinella* », *Recommendations and Guidelines*. 2012

Organisation mondiale de la santé animale (OIE), chapitre 2.1.16 — « Trichinellose », *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* 7<sup>ème</sup> éd. 2012

## 3 Termes et définitions

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

**3.1**  
**larves musculaires de *Trichinella***  
**LM**

premier stade larvaire (L1) des nématodes du genre *Trichinella* qui est localisé dans les muscles striés de tous les animaux sensibles et qui peut infecter les hommes

Note 1 à l'article: Ces larves ont une longueur d'environ 0,7 mm à 1,1 mm et une largeur de 0,03 mm.

**3.2**  
**test de digestion**

méthode de détection des larves de *Trichinella* dans le tissu musculaire par une étape de digestion enzymatique pour libérer les larves du tissu musculaire suivie d'une étape de filtration et de sédimentation, et enfin d'une détection des larves collectées par microscopie

**3.3**  
**larves par gramme**  
**lpg**

nombre de larves de *Trichinella* présentes dans un gramme de tissu musculaire

## 4 Principe

### 4.1 Généralités

La méthode de digestion artificielle, qui est reconnue comme la méthode de référence internationale (voir l'OIE, Manuel terrestre 2012, chapitre 2.1.16 – Trichinellose, page 307), repose sur la dégradation enzymatique de fibres musculaires dans un liquide constitué de pepsine et d'acide chlorhydrique, suivie d'une série d'étapes de sédimentation et de rinçage; des méthodes équivalentes validées peuvent également être utilisées. La performance de l'analyse est fortement influencée par la taille de l'échantillon (des échantillons de 1 g permettront une détection fiable d'infections  $\geq 3$  lpg et des échantillons de 3 g à 5 g permettront une détection fiable d'infections  $\geq 1$  lpg), par le type de muscle sélectionné, par la méthode utilisée et par les compétences du technicien réalisant l'analyse. Une sensibilité d'au moins une à trois larves par gramme doit être obtenue pour protéger la santé humaine; par conséquent, il convient de prélever un échantillon de muscle de taille appropriée dans un muscle de prédilection de l'animal concerné. Il n'existe pas de contrôle qualité interne pouvant être utilisé lors de la mise en œuvre de la méthode. Certains éléments clés relatifs à son principe d'utilisation sont donnés ci-dessous (voir 4.2 à 4.9).

### 4.2 Taille de l'échantillon

Dans le cadre de l'inspection sanitaire de carcasses d'animaux destinées à la consommation humaine, l'échantillon doit être prélevé sur des sites de prédilection (voir l'Annexe A) et la taille de l'échantillon doit être basée sur une évaluation de risques, conformément à la prescription de l'autorité compétente, mais elle ne doit pas être inférieure à 1 g par carcasse.

### 4.3 Broyage de l'échantillon de muscle

Les échantillons de viande sont hachés à l'aide d'un mixeur ou d'un broyeur afin d'augmenter la surface pour la dégradation enzymatique. Le mode opératoire de mélange ou de broyage doit être ajusté de façon à optimiser l'efficacité de la digestion.

NOTE Un broyage insuffisant peut induire une mauvaise digestion, alors qu'un broyage excessif peut endommager ou abîmer les larves musculaires.

#### 4.4 Préparation du liquide de digestion

La pepsine est disponible dans le commerce sous forme de poudre, de granulés et de liquide. L'activité de la pepsine doit être certifiée et la pepsine doit être conservée conformément aux recommandations du fabricant.

NOTE L'utilisation de pepsine sous forme liquide peut être avantageuse car elle peut réduire les risques professionnels tels que les réactions allergiques du personnel de laboratoire.

#### 4.5 Digestion de la viande hachée

Les larves viables de *Trichinella* sont résistantes au liquide de digestion contenant la pepsine et l'acide chlorhydrique et peuvent ainsi être récupérées exemptes de tissu musculaire. Les larves mortes de *Trichinella* peuvent être détruites par la digestion artificielle.

Pour favoriser une digestion efficace et rapide, un rapport maximal de 1:20 entre la viande et le liquide de digestion, et une température de  $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , doivent être maintenus tout au long de l'étape de digestion. La durée de la digestion requise doit être d'au moins 30 min, mais dans le cas d'échantillons de muscle moins digestibles, notamment ceux provenant de carcasses d'animaux sauvages, ou de la langue de nombreuses espèces animales (voir l'[Annexe A](#)), il convient d'augmenter la durée de digestion sans qu'elle ne dépasse toutefois 60 min au total, sauf en cas de validation pour une matrice d'échantillons donnée.

NOTE Si les conditions de durée et de température sont inférieures aux valeurs requises, la digestion du tissu musculaire peut être incomplète. À l'inverse, une température élevée (plus de  $50\text{ °C}$ ) ou une durée de digestion prolongée peut détruire les larves ou inactiver la pepsine.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

#### 4.6 Filtration du liquide de digestion

Après digestion, le liquide de digestion doit être filtré sur un tamis d'une taille de maille spécifique ([6.11](#)), pour retenir le tissu non digéré tout en laissant passer les larves. Avant d'être utilisés, les tamis doivent être exempts de débris et préalablement humidifiés pour laisser passer rapidement le liquide de digestion.

19c5b972b9f1/iso-18743-2015

#### 4.7 Sédimentation du liquide de digestion

La sédimentation des larves est effectuée dans une ampoule à décanter (première sédimentation) et dans une éprouvette en verre (deuxième sédimentation). Les larves sont collectées lors de ces première et deuxième sédimentations. Les première et deuxième sédimentations doivent respectivement durer 30 min et 10 min (voir l'[Annexe B](#) concernant les durées de sédimentation des échantillons de muscles congelés). Si les durées de sédimentation sont inférieures aux durées stipulées ci-dessus, il se peut que les larves ne sédimentent pas toutes et ne soient pas collectées dans le sédiment prélevé.

#### 4.8 Examen microscopique

L'examen microscopique du deuxième sédiment permet aux analystes qualifiés d'identifier les larves de *Trichinella* et de les distinguer des nombreux autres nématodes, organismes ou artéfacts. La connaissance des caractéristiques morphologiques de base des larves de *Trichinella*, notamment la taille (0,7 mm à 1,1 mm de longueur et 0,03 mm de largeur), la forme et la couleur, est requise pour examiner le sédiment (voir la [Figure C.1](#) et la [Figure C.2](#)). La principale caractéristique distinctive des larves de *Trichinella*, non reconnue à la loupe binoculaire mais observée au microscope optique, est le stichosome, qui est constitué d'une série de cellules discoïdes encerclant l'oesophage et occupant la moitié antérieure de la larve. Les larves de *Trichinella* peuvent apparaître enroulées en spirale (lorsque l'environnement est froid) ou mobiles (lorsque l'environnement est chaud), ou encore en forme de « C » lorsqu'elles sont mortes.

Pour être habilité à effectuer la méthode de digestion de routine, l'analyste doit savoir appliquer la méthode de digestion artificielle utilisant un agitateur magnétique sur des échantillons artificiellement contaminés par *Trichinella* (un lot d'essai d'aptitude) afin de collecter et d'identifier les larves de façon constante. Il convient que les analystes soient qualifiés sur la base de leur performance lors d'un essai d'aptitude conformément aux lignes directrices de la Commission internationale sur la trichinellose.

## 4.9 Vérification des résultats

En cas de résultats positifs ou douteux, il convient d'effectuer une confirmation et une identification au niveau de l'espèce par un laboratoire de référence certifié, conformément aux lignes directrices de l'ICT «Quality Assurance in Digestion Testing Programs for Trichinella», Part 1 — Quality assurance in regulatory testing for *Trichinella*, c'est-à-dire «un laboratoire officiellement reconnu par une autorité nationale ou internationale pour un niveau requis d'expertise scientifique et de diagnostic pour une maladie animale particulière et/ou une méthodologie d'essai».

## 5 Réactifs

5.1 **Eau du robinet**, chauffée à  $47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

5.2 **Acide chlorhydrique** (25 %, concentration molaire: 7,8 à 7,9, ou tout autre pourcentage).

5.3 **Pepsine** (sous forme de poudre ou de granulés: 1:10 000 NF, 1:12 500 BP, 2 000 FIP; sous forme liquide: 660 U/ml).

NOTE L'activité de la pepsine en poudre est exprimée par gramme, dans les unités « NF » (US National Formulary), « BP » (British Pharmacopoeia) ou « FIP » (Fédération Internationale de Pharmacie); l'activité de la pepsine liquide est exprimée en unités par millilitres de la Pharmacopée européenne, avec un minimum de 660 U/ml. D'autres activités pepsiques peuvent être utilisées à condition que l'activité finale dans le liquide de digestion soit équivalente à l'activité de 10 g de 1:10 000 NF.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

5.4 **Éthanol** (alcool éthylique à 70 % à 90 %).

5.5 **Hypochlorite de sodium**.

ISO 18743:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cbd5f83b-b854-4408-b1fa-19c5b972b9f1/iso-18743-2015>

## 6 Appareillage

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

6.1 **Bacs de collecte étiquetés ou sacs en plastique** pour échantillons.

6.2 **Couteaux, ciseaux et pinces** pour couper les échantillons et éliminer le tissu non digestible.

6.3 **Balance étalonnée** pour peser les échantillons et/ou la pepsine (précise à  $\pm 0,1\text{ g}$ ).

6.4 **Broyeur en verre, en plastique ou en acier** équipé d'une lame de hachage tranchante (régulièrement contrôlée et/ou remplacée).

6.5 **Agitateur magnétique** équipé d'une plaque chauffante réglable ou agitateur magnétique placé dans un incubateur.

6.6 **Thermomètre** (précis à au moins  $\pm 0,5\text{ °C}$ , gamme minimale de températures de  $20\text{ °C}$  à  $70\text{ °C}$ ).

6.7 **Barreau magnétique** (d'une longueur minimale de 5 cm).

6.8 **Béchers en verre** (d'une capacité minimale de 3 l).

6.9 **Feuille d'aluminium, ou couvercles** pour recouvrir le bécher en verre.

6.10 **Entonnoirs (en verre, en plastique ou en acier)** (d'un diamètre minimal d'environ 15 cm).

**6.11 Tamis** en laiton ou en acier inoxydable, d'une taille de maille spécifique comprise entre 180 µm et 200 µm (d'un diamètre d'environ 10 cm ou plus).

**6.12 Ampoules à décanter coniques en verre** (d'une capacité minimale de 2,5 l), de préférence équipées de robinets de sécurité en polytétrafluoroéthylène (PTFE).

**6.13 Tubes ou éprouvettes graduées** (en verre, de 50 ml ou 100 ml).

**6.14 Boîtes de Petri** (d'un diamètre d'environ 90 mm) quadrillées en carrés d'environ 1 cm, ou matériel équivalent pour le dénombrement des larves.

**6.15 Loupe binoculaire** à rétroéclairage, ou trichinoscope à table horizontale. Il est recommandé de disposer d'un système de capture et d'enregistrement d'images (appareil photo ou caméra) mais cela n'est pas obligatoire pour rendre des résultats de suspicion.

**6.16 Pipettes** d'une capacité de 1 ml, 10 ml et 25 ml.

**6.17 Petits flacons** pour prélever les larves collectées.

Il convient de ne pas utiliser de béciers ou d'ampoules à décanter (autres que les robinets) en plastique ou en téflon étant donné qu'une surface rugueuse et une charge électrostatique peuvent favoriser l'adhérence des larves sur la surface interne du matériel.

Il convient que l'équipement répertorié en 6.2, 6.4 et 6.11 soit régulièrement nettoyé et exempt de tissus susceptibles de contenir des larves d'analyses précédentes.

## 7 Prélèvement d'échantillons, étiquetage et transport

Le prélèvement des échantillons, leur étiquetage et leur transport ne font pas partie de la méthode décrite dans la présente Norme internationale mais sont indiqués dans l'Annexe A. S'il n'existe aucune Norme internationale relative au prélèvement des échantillons à partir des carcasses d'animaux ou de morceaux de celles-ci, il est recommandé aux parties concernées de trouver un accord à ce sujet.

Pour obtenir la sensibilité requise pour la recherche de *Trichinella* chez les animaux, un échantillon de muscle de taille appropriée doit être prélevé sur un muscle de prédilection (voir l'Annexe A). Il convient que les échantillons de muscle prélevés sur une carcasse pour la recherche par digestion soient au moins deux fois plus lourds que la masse requise pour l'examen, ceci afin de compenser l'élimination des tissus non digestibles.

Dès réception des échantillons, le personnel du laboratoire doit contrôler la conformité des échantillons pour l'analyse en vérifiant la masse, la composition, l'état, l'étiquetage et la correspondance avec les documents transmis (réception conforme à l'ISO 7218:2007, 8.3).

Il convient de soumettre à l'analyse les échantillons de muscle le plus vite possible ou de les conserver entre 2 °C et 8 °C pour ralentir la décomposition et éviter la congélation.

## 8 Préparation des échantillons

Les échantillons soumis à l'analyse ne doivent contenir ni graisse, ni tendons, ni fascia. En cas d'utilisation de tissu lingual, la couche superficielle non digestible et dure du tissu conjonctif doit être retirée avant l'analyse. Il convient que l'autorité compétente détermine la taille minimale d'échantillon pour la recherche par digestion artificielle (voir les lignes directrices de l'ICT «Quality Assurance in Digestion Testing Programs for *Trichinella*», Part 5 — Recommendations on essential components and minimum requirements for a *Trichinella* testing laboratory certification program — B.6 Sample collection and handling). Les échantillons d'animaux individuels peuvent être regroupés; la masse maximale de muscle dans un mélange à digérer doit être de 100 g, mais il est possible d'ajouter jusqu'à