

ISO/TC 34/SC 9

Secrétariat: AFNOR

Début de vote:
2015-12-10

Vote clos le:
2016-02-10

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Recherche et dénombrement des *Cryptosporidium* et *Giardia* dans les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies

*Microbiology of the food chain — Detection and enumeration of
Cryptosporidium and Giardia in fresh leafy green vegetables and
berry fruits*

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/siv/1f510da0-e8c9-4498-853d-6387d55de20f/iso-18744-2016>

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.

Veillez consulter les notes administratives en page iii



Numéro de référence
ISO/FDIS 18744:2015(F)

TRAITEMENT PARALLÈLE ISO/CEN

Le présent projet final a été élaboré dans le cadre de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) et soumis selon le mode de collaboration **sous la direction de l'ISO**, tel que défini dans l'Accord de Vienne. Le projet final a été établi sur la base des observations reçues lors de l'enquête parallèle sur le projet.

Le projet final est par conséquent soumis aux comités membres de l'ISO et aux comités membres du CEN en parallèle à un vote d'approbation de deux mois au sein de l'ISO et à un vote formel au sein du CEN.

Les votes positifs ne doivent pas être accompagnés d'observations.

Les votes négatifs doivent être accompagnés des arguments techniques pertinents.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1f5169d4-e8c9-4498-853d-6387d55de20f/iso-18744-2016>



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

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage	3
7 Échantillonnage et transport	4
7.1 Échantillonnage.....	4
7.2 Transport.....	4
7.3 Réception des échantillons.....	4
7.4 Conservation.....	4
7.5 Préparation de l'échantillon pour essai.....	4
8 Mode opératoire	5
8.1 Récupération des parasites sur des légumes verts à feuilles.....	5
8.2 Récupération des parasites sur des fruits à baies.....	6
8.3 Séparation immunomagnétique (IMS).....	7
8.4 Coloration de l'échantillon.....	7
8.5 Examen au microscope.....	8
8.5.1 Commentaires généraux.....	8
8.5.2 Examen des préparations d'échantillons au microscope à épifluorescence.....	9
8.5.3 Examen des préparations d'échantillons au microscope CID.....	11
9 Procédures de contrôle qualité	13
9.1 Généralités.....	13
9.2 Inclusion et interprétation des contrôles.....	13
9.3 Nettoyage de l'équipement.....	13
10 Compte-rendu des résultats	13
10.1 Expression des résultats.....	13
10.2 Rapport d'essai.....	14
Annexe A (normative) Préparation des réactifs	15
Annexe B (normative) Préparation des suspensions de contrôle de processus positives	17
Annexe C (informative) Pourcentages de rendement obtenus avec les méthodes	19
Bibliographie	21

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 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](#).

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

Introduction

Cryptosporidium sp. et *Giardia duodenalis* (syn. *G. lamblia*, *G. intestinalis*) sont des parasites protozoaires pouvant causer des maladies entériques chez l'homme. Ces organismes sont tous les deux caractérisés par un stade de transmission résistant, l'oocyste de *Cryptosporidium* et le kyste de *Giardia*, qui peuvent survivre dans des environnements humides pendant de longues périodes. Ces stades de transmission sont ci-après appelés collectivement (oo)cystes. Les oocystes de *Cryptosporidium* en particulier sont très résistants au chlore aux concentrations utilisées dans le traitement de l'eau potable, et la désinfection chimique des légumes verts à feuilles et fruits à baies, lorsqu'elle est effectuée pendant le traitement, peut également être inefficace. Par conséquent, l'absence de bactéries végétatives sur les produits frais en tant qu'indicateurs de contamination fécale, n'est pas forcément synonyme d'absence d'(oo)cystes. Il n'existe aucune méthode de culture de *Cryptosporidium* spp. et *Giardia duodenalis* à des fins de détection et, par conséquent, pour détecter une contamination par ces parasites, il faut isoler directement les (oo)cystes sur l'échantillon alimentaire puis les observer au microscope. Les méthodes décrites dans la présente Norme internationale servent à déterminer si des (oo)cystes de *Cryptosporidium* et/ou *Giardia* sont présents à la surface des produits frais et à les dénombrer. La présente Norme internationale repose sur les méthodes publiées qui ont été soumises à essai lors d'une étude multicentrique interlaboratoires. D'autres méthodes peuvent être utilisées s'il est démontré qu'elles sont équivalentes à la présente Norme internationale, suivant le protocole décrit dans l'ISO 16140.[1]

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sis/1f5169d4-e8c9-4498-853d-6387d55de20f/iso-18744-2016>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1f5169d4-e8c9-4498-853d-6387d55de20f/iso-18744-2016>

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Recherche et dénombrement des *Cryptosporidium* et *Giardia* dans les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies

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 spécifie une méthode applicable à la détection et au dénombrement des oocystes de *Cryptosporidium* et aux kystes de *Giardia* sur ou dans des produits alimentaires qui sont décrits ici comme étant des légumes verts frais à feuilles et des fruits à baies. Grâce à des contrôles appropriés, elle peut être également applicable à l'examen d'autres produits frais.

Les descriptions faites au microscope concernent les oocystes de *Cryptosporidium* spp. et les kystes de *Giardia duodenalis* dont la taille inclut les espèces (*Cryptosporidium*) ou assemblages (*Giardia*) connus pour être pathogènes pour l'homme.

Cette méthode n'inclut pas l'analyse moléculaire et n'est donc pas applicable à la détermination des espèces ou des génotypes/assemblages d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia*. La méthode permettra de détecter toutes les espèces et tous les génotypes/assemblages connus pour être pathogènes pour l'homme ainsi que d'autres qui ne le sont pas. Pour mieux les identifier, des essais de typage moléculaire sont requis. Toutefois, ceux-ci ne peuvent pas être effectués de manière fiable si des contrôles de processus positifs ont été ajoutés aux échantillons, car le résultat des essais de typage moléculaire sera erroné.

Cette méthode ne permet pas de déterminer la viabilité ou l'infectivité des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* qui peuvent être présents.

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*

3 Termes et définitions

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

3.1

oocyste de *Cryptosporidium*

stade de transmission de *Cryptosporidium* sp.

Note 1 à l'article: Sa détection est basée sur la réaction avec des anticorps anti-*Cryptosporidium* spécifiques et les caractéristiques morphologiques décrites dans [l'Article 8](#).

3.2

kyste de *Giardia*

stade de transmission de *Giardia* sp.

Note 1 à l'article: Sa détection est basée sur la réaction avec des anticorps anti-*Giardia* spécifiques et les caractéristiques morphologiques typiques décrites dans [l'Article 8](#).

3.3

légume vert frais à feuilles

feuille de plantes consommée comme un légume, qui n'a été soumise à aucun processus, excepté peut-être le découpage et le lavage

3.4

fruit frais à baies

petit fruit rond ou oblong, charnu et juteux, qui n'a été soumis à aucun processus excepté peut-être le découpage et le lavage

3.5

contrôle interne d'extraction

(oo)cystes marqués à l'aide de marqueurs fluorescents spécifiques qui peuvent être ajoutés dans des quantités définies à l'échantillon avant le traitement pour vérifier que la méthode consécutive à l'étape d'éluion est efficace

3.6

contrôle positif

échantillon dans lequel des (oo)cystes ont été ajoutés dans des quantités définies avant l'extraction pour vérifier que la méthode consécutive à l'étape d'éluion est efficace

3.7

contrôle négatif

échantillon ayant une quantité de matière équivalente à celle de l'échantillon soumis à essai, qui est considéré comme étant exempt d'(oo)cystes et traité comme l'échantillon soumis à essai

4 Principe

Le principe de la méthode repose sur la récupération des (oo)cystes de l'échantillon par un mode opératoire d'éluion, suivie d'une concentration dans l'éluat par centrifugation et isolement par séparation immunomagnétique (IMS). La détection des (oo)cystes est effectuée au microscope après marquage avec des anticorps monoclonaux (mAb) spécifiques conjugués à un fluorochrome.

5 Réactifs

5.1 Réactifs requis pour éluer les (oo)cystes des légumes verts à feuilles et des fruits à baies

5.1.1 **Tampon glycine**, pH 5,5 pour les légumes verts à feuilles ([A.2.1](#)).

5.1.2 **Tampon glycine**, pH 3,5 pour les fruits à baies ([A.2.2](#)).

5.2 Réactifs requis pour la concentration, la fixation, la coloration, la détection et le contrôle qualité

5.2.1 **Méthanol**, de qualité analytique.

5.2.2 **Billes paramagnétiques**, couplées à des anticorps spécifiques des parois des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia*.

- 5.2.3 Acide chlorhydrique, 0,1 mol/l ([A.3.1](#)).
- 5.2.4 Hydroxyde de sodium, 1 mol/l ([A.3.2](#)).
- 5.2.5 Anticorps monoclonaux (mAb) fluorescents dirigés contre les oocystes de *Cryptosporidium* et les kystes de *Giardia*.
- 5.2.6 Milieu de montage pour immunofluorescence ([A.3.3](#)).
- 5.2.7 Dichlorhydrate de 4',6'-diamidino-2-phénylindole dihydraté (DAPI), réactif lyophilisé.
- 5.2.8 Solution mère de DAPI ([A.3.4](#)).
- 5.2.9 Solution de travail de DAPI ([A.3.5](#)).
- 5.2.10 Tampon phosphate salin (PBS), pH 7,3 ([A.1.1](#)).
- 5.2.11 Huile à immersion non fluorescente.
- 5.2.12 Suspensions mères d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* ([Annexe B](#)).
- 5.2.13 Suspensions d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* non viables préalablement marqués et dénombrés.
- Le marqueur fluorochrome doit être différent de celui utilisé pour détecter l'organisme cible.
- 5.2.14 Milieu de conservation des parasites ([A.3.6](#) et [A.3.7](#)).
- 5.2.15 Eau déminéralisée et filtrée (eau ultra-pure de type 1).
- 5.2.16 Vernis à ongles (pour sceller les lamelles couvre-objet sur les lames, si nécessaire).

6 Appareillage

Cette méthode requiert l'utilisation d'un matériel courant de laboratoire de microbiologie (se référer à l'ISO 7218), et en particulier, ce qui suit.

- 6.1 Pincettes, pour manipuler les produits frais si nécessaire.
- 6.2 Mélangeur à pales (péristaltique) et sacs à filtre compatibles.
- 6.3 Centrifugeuse swing-out (pour recevoir au moins 4 tubes à centrifuger coniques de 50 ml par cycle).
- 6.4 Tubes de Leighton en verre.
- 6.5 Mélangeur rotatif compatible avec les tubes de Leighton.
- 6.6 Porte-pincettes magnétique compatible avec les tubes de Leighton.
- 6.7 Porte-pincettes magnétique pour tubes de microcentrifugeuse.

6.8 Lames à puits, recouvertes d'un revêtement hydrophobe, puits d'une capacité volumique de 50 µl d'échantillon traité après IMS, et lamelles couvre-objet de taille appropriée.

6.9 Chauffe-lames, incubateur réglé entre 37 °C et 42 °C, ou appareil de séchage des lames.

6.10 Chambre humide, boîte avec couvercle contenant un matériau absorbant l'humidité, par exemple une serviette en papier, qui peut être maintenue à la température et à l'humidité appropriées au réactif immunofluorescent.

6.11 Dispositif d'aspiration, source de vide équipée d'un piège à liquide et d'une pipette, ou équivalent.

6.12 Microscope à épifluorescence équipé d'objectifs 20x et 40x ainsi que d'une lentille à immersion d'objectif 100x et d'un oculaire (réticule) étalonné. Doit comprendre un ensemble de filtres adaptés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (excitation de 480 nm, émission de 520 nm) et un ensemble de filtres DAPI (excitation de 375 nm, émission > 420 nm). En cas d'utilisation de contrôles internes d'extraction, un autre ensemble de filtres adapté au fluorochrome sera nécessaire. Un système optique à contraste interférentiel différentiel (CID) est utile. Un système d'enregistrement photographique fixé au microscope peut être utile pour enregistrer les événements positifs ou présomptifs.

6.13 lame de contrôle FITC servant à évaluer l'intensité de fluorescence et à vérifier le bon fonctionnement du système optique du microscope à fluorescence.

7 Échantillonnage et transport

7.1 Échantillonnage

La présente Norme internationale ne spécifie aucun mode opératoire d'échantillonnage. Voir la Norme internationale spécifique relative au produit concerné. En l'absence de Norme internationale spécifique, il est recommandé aux parties prenantes concernées (par exemple, autorités compétentes, organismes de réglementation, clients) de trouver un accord à ce sujet.

7.2 Transport

Les échantillons de fruits mous et autres échantillons délicats doivent être manipulés avec soin pendant le transport pour préserver leur intégrité physique (se référer à l'ISO 7218:2007, 8.2).

7.3 Réception des échantillons

Il convient d'évaluer les échantillons en fonction de critères d'acceptation basés sur des lignes directrices appropriées dans le cadre de l'essai (se référer à l'ISO 7218:2007, 8.3). Les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies doivent être considérés comme étant périssables et être analysés dès que possible après leur réception. Les critères de rejet peuvent inclure la présence de moisissure, la décomposition de l'échantillon ou la perte d'intégrité de l'échantillon en cas de fruit à baies.

7.4 Conservation

Les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies peuvent être conservés au réfrigérateur (entre 4 °C et 8 °C), pour réduire le risque de détérioration des échantillons (se référer à l'ISO 7218:2007, 8.4).

7.5 Préparation de l'échantillon pour essai

L'état des produits frais doit être consigné avant de commencer l'analyse.

Les échantillons pour essai doivent peser au moins 25 g.

Il est recommandé de ne pas analyser plus de 100 g d'échantillon individuel par analyse.

Lors de l'analyse de légumes verts à feuilles entières, par exemple la laitue pommée, il est recommandé de choisir au hasard des feuilles propres intactes (sans les tiges) provenant de différentes parties de la plante et de les examiner.

Pour les échantillons sous forme de petites unités, par exemple les framboises, l'échantillon doit être un échantillon aléatoire de ces unités.

8 Mode opératoire

8.1 Récupération des parasites sur des légumes verts à feuilles

- a) Placer l'échantillon dans un sac à filtre. Éviter toute manipulation inutile. Utiliser des pinces au besoin.

Il est recommandé d'ajouter à chaque échantillon une suspension de contrôles internes d'extraction contenant une quantité définie d'oocystes de *Cryptosporidium* et/ou de kystes de *Giardia* préalablement marqués et dénombrés, conformément aux instructions du fabricant. Il convient de déposer la suspension de contrôles sur la surface des feuilles, après avoir placé l'échantillon dans le récipient de traitement. Il convient que le marqueur fluorescent présent dans le contrôle interne d'extraction soit différent de celui utilisé pour détecter les (oo)cystes cibles dans les échantillons pour essai. Si aucun contrôle interne d'extraction n'est utilisé, il est recommandé d'employer un contrôle de processus positif (voir en 9.2).

- b) Ajouter 200 ml de tampon glycine pH 5,5.
- c) Placer pendant 30 s l'échantillon dans un mélangeur à pales tournant entre 200 tr/min et 300 tr/min.
- d) Recueillir l'éluat dans des tubes à centrifuger à fond conique de 50 ml, en y répartissant l'éluat en quantités égales et en s'assurant que toute la matière végétale est retenue dans le filtre. Appuyer fermement sur le sac et sur le filtre pour s'assurer que tout l'éluat est extrait de l'échantillon. L'éluat peut être recueilli dans un récipient avant de le transvaser dans des tubes à centrifuger.

L'éluat peut aussi être transvasé dans un flacon à centrifuger à fond conique de 250 ml, si une centrifugeuse/un rotor approprié(e) est disponible pour l'étape suivante.

Rincer l'échantillon après lavage peut accroître le rendement. Après avoir transvasé l'éluat depuis le sac à filtre, tout en centrifugeant les tubes [voir l'alinéa e)], ajouter 10 ml de tampon glycine à 1 mol/l pH 5,5 à l'échantillon et rincer en manipulant l'échantillon de façon à le faire sortir du sac. Une fois le surnageant éliminé des tubes à centrifuger, ajouter le produit de rinçage de l'échantillon dans les tubes. Ajouter encore 10 ml de tampon glycine à 1 mol/l pH 5,5 dans le sac, manipuler à nouveau le produit et l'eau de façon à les faire sortir du sac et ajouter le produit de rinçage dans les tubes. Centrifuger conformément à l'alinéa e).

- e) Centrifuger l'éluat à 2 500 *g* maximum pendant 10 min sans frein.

NOTE 1 Une centrifugation à 2 500 *g* maximum peut produire un culot très compact. Une vitesse moins élevée de 1 100 *g* maximum pendant 10 min sans frein s'est révélée donner des rendements de récupération d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* au moins équivalents.

- f) À l'aide d'une pipette et d'une source de vide, prélever le surnageant sans perturber le culot. Si aucun culot n'est visible, agir avec le plus grand soin pour s'assurer qu'aucun parasite n'est perdu pendant l'aspiration. Pour cela, laisser un petit volume de liquide au fond du tube.
- g) Remettre le culot en suspension dans le liquide résiduel restant au fond de chaque tube et combiner les culots dans un seul tube à centrifuger.
- h) Rincer les tubes à centrifuger coniques de 50 ml vides avec de l'eau distillée stérile et transvaser le produit de rinçage dans le tube contenant les culots combinés. Répéter cette opération jusqu'à ce que le volume du culot en suspension dans le tube ne dépasse pas la capacité du tube.