

Deuxième édition
2017-06

Version corrigée
2018-06

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

Partie 2:

Technique par comptage des colonies
(standards.iteh.ai)

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

<https://standards.iteh.org/catalog/standards/sist/c8ce5547-a3ed-4128-a2e3-d9acca126a8e/iso-21528-2-2017>
Part 2: Colony-count technique



Numéro de référence
ISO 21528-2:2017(F)

© ISO 2017

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21528-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ce5547-a3ed-4128-a2e3-d9acca126a8e/iso-21528-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ce5547-a3ed-4128-a2e3-d9acca126a8e/iso-21528-2-2017>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en oeuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Geneva
Tél.: +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	2
4 Principe	2
4.1 Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.....	2
4.2 Isolement et sélection pour confirmation.....	2
4.3 Confirmation.....	2
4.4 Calcul.....	2
5 Diluants, milieux de culture et réactifs	2
6 Matériel et consommables	3
7 Échantillonnage	3
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 Ensemencement et incubation.....	4
9.4 Comptage et 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
9.6.3 Interprétation des essais biochimiques.....	5
10 Expression des résultats	5
11 Caractéristiques de performance de la méthode	6
11.1 Essai interlaboratoires.....	6
11.2 Limite de répétabilité.....	6
11.3 Limite de reproductibilité.....	6
12 Rapport d'essai	7
13 Assurance qualité	7
Annexe A (normative) Milieux de culture et réactifs	8
Annexe B (informative) Études de validation de la méthode et caractéristiques de performance	12
Bibliographie	15

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).

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).

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.

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 21528-2:2004) qui a fait l'objet d'une révision technique en appliquant les principales modifications suivantes:

- l'étape de confirmation a été modifiée en remplaçant la gélose au glucose par le milieu OF;
- les données de fidélité basées sur les résultats d'un essai interlaboratoires utilisant la méthode selon la présente édition révisée ont été ajoutées dans une annexe informative.

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

La présente version corrigée de l'ISO 21528-2:2017 inclut les corrections suivantes:

- en 6.4, un bain d'eau réglable entre 44 °C et 47 °C a été ajouté à la liste de matériel;
- en 9.3.2, la température a été réduite de «47 °C à 50 °C» à «44 °C à 47 °C».

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 21528-2:2004, sont considérées comme mineures (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 21528-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ce5547-a3ed-4128-a2e3-d9acca126a8e/iso-21528-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ce5547-a3ed-4128-a2e3-d9acca126a8e/iso-21528-2-2017>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21528-2:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ce5547-a3ed-4128-a2e3-d9acca126a8e/iso-21528-2-2017>

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

Partie 2: Technique par comptage des colonies

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 le dénombrement des *Enterobacteriaceae*. 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 technique est destinée à être utilisée lorsque le nombre de colonies recherchées est supposé être supérieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

La technique du nombre le plus probable (NPP), incluse dans l'ISO 21528-1, est généralement utilisée lorsque le nombre recherché est censé être inférieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

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*

ISO 18593, *Microbiologie des aliments — Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons*

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

dénombrement des *Enterobacteriaceae*

nombre d'*Enterobacteriaceae* par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai ou par unité de surface prélevée, lorsque les essais sont effectués conformément au présent document

4 Principe

4.1 Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales à partir de l'échantillon pour essai.

4.2 Isolement et sélection pour confirmation

Ensemencement de la gélose à la bile, au cristal violet et au glucose (VRBG) avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit est liquide ou avec une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas des autres produits. Ajout d'une seconde couche du même milieu. Dans les mêmes conditions, préparation d'autres boîtes avec les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation des boîtes à 37 °C (ou 30 °C) pendant 24 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.

4.3 Confirmation

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

4.4 Calcul

À partir du nombre de colonies caractéristiques confirmés par boîte, calcul du nombre d'*Enterobacteriaceae* par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

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 décrites dans l'[Annexe A](#).

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

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 °C et 50 °C .

6.4 Bains d'eau, un réglable entre 47 °C et 50 °C et un autre réglable entre 44 °C et 47 °C .

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

6.6 Boîtes de Petri, en verre ou en plastique, d'environ 90 mm de diamètre et (en option) de taille supérieure (diamètre d'environ 140 mm).

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

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

6.9 pH mètre, précis à $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C .

6.10 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, suspension mère et dilutions

Voir l'ISO 6887 (toutes les parties).

Préparer une seule série de dilutions décimales à partir de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou à partir de la suspension mère dans le cas des autres produits.

9.3 Ensemencement et incubation

9.3.1 Prendre une boîte de Petri stérile (6.6). À l'aide d'une pipette stérile (6.8), transférer dans la boîte 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas des autres produits.

Répéter l'opération décrite avec les dilutions successives, si nécessaire, à l'aide d'une nouvelle pipette pour chaque dilution.

Si seule la suspension mère est utilisée, ensemercer deux boîtes de cette dilution (ISO 7218).

9.3.2 Ajouter dans chaque boîte de Petri environ 15 ml de la gélose à la bile, au cristal violet et au glucose (VRBG) (A.2), préparée puis refroidie entre 44 °C et 47 °C dans le bain d'eau (6.4). Le temps qui s'écoule entre l'ensemencement des boîtes de Petri et le moment où le milieu est versé dans les boîtes ne doit pas excéder 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum et le milieu par des déplacements horizontaux des boîtes et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche horizontale.

9.3.3 Après solidification du mélange, ajouter une seconde couche d'environ 5 ml à 10 ml de gélose à la bile, au cristal violet et au glucose (VRBG) (A.2), préparée puis refroidie comme décrit en 9.3.2, pour empêcher l'étalement des colonies et obtenir des conditions semi-anaérobies. Laisser se solidifier comme décrit ci-dessus.

9.3.4 Inverser les boîtes préparées et les incuber à 37 °C (6.2) pendant 24 h ± 2 h.

9.4 Comptage et sélection des colonies pour confirmation

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

Choisir les boîtes (voir en 9.3.4) contenant moins de 150 colonies caractéristiques. Compter ces colonies puis prélever au hasard cinq de ces colonies de chaque boîte en vue du repiquage (voir en 9.5) pour les essais de confirmation biochimiques (voir en 9.6). Si moins de cinq colonies se trouvent dans la boîte, prendre toutes les colonies présumées présentes.

Des colonies étalées peuvent être considérées comme une seule colonie. Si moins d'un quart de la boîte est envahi, compter les colonies sur la partie non affectée de la boîte et calculer par extrapolation le

nombre théorique de colonies correspondant à la boîte entière. Si plus d'un quart est envahi par des colonies étalées, ne pas tenir compte du comptage.

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

9.5 Repiquage des colonies sélectionnées

Ensemencer, en stries, les colonies sélectionnées (9.4) sur la surface du milieu gélosé non sélectif (A.3) préalablement séché, de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

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 (6.7), prélever une fraction de chaque colonie bien isolée (voir en 9.5) et la déposer en stries sur un morceau de papier filtre humecté de réactif à l'oxydase (A.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 lorsque 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 (6.7) les mêmes colonies que celles sélectionnées en 9.5 qui ont donné un résultat négatif à l'essai de l'oxydase dans des tubes contenant le milieu OF glucosé (A.4). Recouvrir la surface du milieu avec au moins 1 cm d'huile minérale stérile (A.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.

9.6.3 Interprétation des essais biochimiques

Les colonies oxydase-négatives et glucose-positives sont confirmées comme étant des *Enterobacteriaceae*.

10 Expression des résultats

Voir l'ISO 7218. Calculer et exprimer les résultats sous forme de nombre d'*Enterobacteriaceae* en UFC par gramme, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif d'échantillonnage.