

---

---

**Microbiologie de la chaîne  
alimentaire — Méthode horizontale  
pour la recherche de *Cronobacter* spp.**

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the  
detection of Cronobacter spp.*

iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

[ISO 22964:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/83b82cea-04d0-4b9f-ae46-111b11ec2dce/iso-22964-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/83b82cea-04d0-4b9f-ae46-111b11ec2dce/iso-22964-2017>



iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

[ISO 22964:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/83b82cea-04d0-4b9f-ae46-111b11ec2dce/iso-22964-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/83b82cea-04d0-4b9f-ae46-111b11ec2dce/iso-22964-2017>



**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](mailto:copyright@iso.org)  
[www.iso.org](http://www.iso.org)

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
<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>Termes abrégés</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
5.1    Pré-enrichissement non sélectif dans de l'eau peptonée tamponnée (EPT).....	2
5.2    Enrichissement dans un milieu sélectif (CSB).....	2
5.3    Ensemencement et identification sur une gélose chromogène (gélose CCI).....	2
5.4    Confirmation.....	2
<b>6</b> <b>Milieux de culture et réactifs</b> .....	<b>2</b>
<b>7</b> <b>Matériel et consommables</b> .....	<b>2</b>
<b>8</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>3</b>
<b>9</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>3</b>
<b>10</b> <b>Mode opératoire (comme représenté à l'Annexe A)</b> .....	<b>3</b>
10.1    Prise d'essai.....	3
10.2    Pré-enrichissement.....	4
10.3    Enrichissement.....	4
10.4    Isolement de colonies présumées de <i>Cronobacter</i> spp.....	4
10.5    Confirmation.....	4
10.5.1    Généralités.....	4
10.5.2    Purification des colonies.....	5
10.5.3    Confirmation biochimique.....	5
10.6    Interprétation des résultats des essais biochimiques.....	6
<b>11</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>7</b>
<b>12</b> <b>Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>7</b>
12.1    Étude interlaboratoires.....	7
12.2    Sensibilité.....	7
12.3    Spécificité.....	7
12.4    LOD <sub>50</sub> .....	7
<b>13</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe A</b> (normative) <b>Représentation schématique du mode opératoire d'essai</b> .....	<b>8</b>
<b>Annexe B</b> (normative) <b>Composition, préparation et essais de performance des milieux de culture et des réactifs</b> .....	<b>9</b>
<b>Annexe C</b> (informative) <b>Distinction entre <i>Cronobacter</i> spp. et d'autres genres</b> .....	<b>17</b>
<b>Annexe D</b> (informative) <b>Études de validation des méthodes et caractéristiques de performance</b> .....	<b>19</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>22</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 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html).

Le présent document a été élaboré(e) 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 22964:2006, qui a fait l'objet d'une révision technique avec les modifications suivantes:

- le domaine d'application a été étendu à la recherche de *Cronobacter* spp. dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale, ainsi qu'aux échantillons environnementaux et le titre changé en conséquence;
- le bouillon d'enrichissement, bouillon lauryl sulfate tryptose modifié (mLST), a été remplacé par le bouillon sélectif *Cronobacter* (CSB);
- la gélose d'isolement, gélose d'isolement *Enterobacter sakazakii* (ESIA), a été remplacée par la gélose d'isolement chromogène pour *Cronobacter* (CCI);
- plusieurs essais de confirmation ont été remplacés par d'autres essais, conformément au [Tableau 1](#) du présent document.

## Introduction

Le présent document décrit une méthode horizontale pour la recherche de *Cronobacter* spp. dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale et dans les échantillons environnementaux. Les principales modifications, énumérées dans l'avant-propos, introduites dans le présent document par rapport à l'ISO/TS 22964:2006, sont considérées comme majeures (voir l'ISO 17468<sup>[2]</sup>).

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que la présente méthode horizontale ne convienne pas exactement, dans tous ses détails, à certains d'entre eux. Dans ce cas, des méthodes différentes, spécifiques de ces produits, peuvent être utilisées, si cela est absolument nécessaire et pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, il convient de faire tous les efforts envisageables afin d'appliquer, dans la mesure du possible, la présente méthode horizontale.

À la prochaine révision du présent document, il sera tenu compte de toutes les informations collectées depuis sa publication, indiquant dans quelle mesure la présente méthode horizontale aura été suivie et les raisons pour lesquelles on y aura dérogé dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou nationales ne concordant pas avec la présente méthode horizontale existent peut-être déjà. Lors de la révision de ces normes, il serait souhaitable de les aligner sur le présent document de sorte qu'à terme, les seules divergences restantes par rapport à la présente méthode horizontale se limiteront à celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

iTeh Standards  
(<https://standards.itih.ai>)  
Document Preview

[ISO 22964:2017](https://standards.itih.ai/catalog/standards/iso/83b82cea-04d0-4b9f-ae46-111b11ec2dce/iso-22964-2017)

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/iso/83b82cea-04d0-4b9f-ae46-111b11ec2dce/iso-22964-2017>



# Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche de *Cronobacter* spp.

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode horizontale pour la recherche de *Cronobacter* spp.

Sous réserve des restrictions exposées dans l'introduction, le présent document est applicable aux:

- produits et ingrédients alimentaires destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale;
- échantillons environnementaux prélevés dans les secteurs de la production et de la manutention des aliments.

## 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 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*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/83b82cea-04d0-4b9f-ae46-111b11ec2dce/iso-22964-2017>

## 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

#### ***Cronobacter* spp.**

microorganismes formant des colonies caractéristiques sur une gélose d'isolement chromogène pour *Cronobacter* (CCI)<sup>[10]</sup> et possédant les caractéristiques biochimiques décrites lorsque les essais sont réalisés conformément au présent document

### 3.2

#### **recherche des *Cronobacter* spp.**

détermination de *Cronobacter* spp. (3.1) dans une masse, un volume ou une surface donné(e) de produit, lorsque les essais sont réalisés conformément au présent document

## 4 Termes abrégés

Pour les besoins du présent document, les abréviations suivantes s'appliquent.

EPT	eau peptonée tamponnée (buffered peptone water)
CCI	isolement chromogène de <i>Cronobacter</i> (chromogenic <i>Cronobacter</i> isolation)
CSB	bouillon sélectif pour <i>Cronobacter</i> ( <i>Cronobacter</i> selective broth)
TSA	gélose tryptone soja (tryptone soya agar)

## 5 Principe

### 5.1 Pré-enrichissement non sélectif dans de l'eau peptonée tamponnée (EPT)

Ensemencement d'une prise d'essai dans de l'eau peptonée tamponnée, puis incubation à une température comprise entre 34 °C et 38 °C, pendant 18 h ± 2 h.

NOTE Des *Cronobacter* spp. peuvent être présentes en petit nombre accompagnées d'autres *Enterobacteriaceae* telles que *E. cloacae*, pouvant interférer avec leur détection.

### 5.2 Enrichissement dans un milieu sélectif (CSB)

Ensemencement du milieu d'enrichissement sélectif avec la culture obtenue en 5.1 et incubation à 41,5 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 2 h.

### 5.3 Ensemencement et identification sur une gélose chromogène (gélose CCI)

Ensemencement en stries de la gélose chromogène à partir de la culture d'enrichissement obtenue en 5.2 et incubation à 41,5 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 2 h.

### 5.4 Confirmation

Des colonies caractéristiques sont isolées à partir de la gélose chromogène, purifiées sur une gélose non sélective comme la TSA et caractérisées sur le plan biochimique.

## 6 Milieux de culture et réactifs

Pour les pratiques en vigueur de laboratoire voir l'ISO 7218 et l'ISO 11133.

La composition et la préparation des milieux de culture et des réactifs sont décrites à l'Annexe B.

Pour consulter les essais de performance des milieux de culture, voir l'ISO 11133 et/ou l'Annexe B.

## 7 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.

### 7.1 Appareil pour la stérilisation par chaleur sèche (four) ou par chaleur humide (autoclave).

Comme spécifié dans l'ISO 7218.

### 7.2 Étuves, réglables de 34 °C à 38 °C, à 37 °C ± 1 °C et à 41,5 °C ± 1 °C.

**7.3 Anses bouclées stériles**, d'environ 3 mm de diamètre (10 µl de volume), et de 1 µl de volume, et fil droit (ose).

**7.4 pH-mètre**, d'une exactitude d'étalonnage de  $\pm 0,1$  unité de pH à 25 °C.

**7.5 Fioles et flacons**, avec bouchons, d'une capacité permettant de les utiliser pour la préparation des bouillons d'enrichissement et des géloses, ainsi que leur stockage.

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

**7.7 Tubes** (bouchés ou avec capsules), **ou flacons de culture**, d'une capacité appropriée, à capsules métalliques non toxiques avec revêtement ou capsules en plastique jetables (voir l'ISO 7218).

**7.8 Boîtes de Petri**, d'environ 90 mm de diamètre.

**7.9 Spectrophotomètre**, pouvant mesurer l'absorption de la lumière d'une longueur d'onde de 405 nm.

**7.10 Pilon et mortier**

**7.11 Réfrigérateur**, réglable à  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$

**7.12 Bains d'eau**, réglables entre 47 °C et 50 °C et à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**7.13 Enceinte de séchage (ou four ventilé par convection)**, pouvant être maintenue à une température comprise entre 25 °C et 50 °C.

## 8 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<sup>[3]</sup> pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux et dans l'ISO 18593<sup>[4]</sup> pour l'échantillonnage des surfaces.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé, ni altéré lors du transport ou du stockage (voir l'ISO 7218).

## 9 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). S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 10 Mode opératoire (comme représenté à l'Annexe A)

### 10.1 Prise d'essai

En général, pour préparer la suspension mère, ajouter 10 g ou 10 ml de l'échantillon pour essai (Article 9) à 90 ml du milieu de pré-enrichissement (B.1) (EPT), ce qui correspond à une dilution au 1/10<sup>e</sup>. Préchauffer l'eau peptonée tamponnée à température ambiante avant utilisation. Pour les

produits spécifiques, suivre les modes opératoires spécifiés dans l'ISO 6887 (toutes les parties). Pour le lait sec, suivre l'ISO 6887-5.

Le présent document a été validé pour des prises d'essai de 10 g. Une prise d'essai de plus petite taille peut être utilisée sans nécessiter de validation ou vérification supplémentaire, dans la mesure où le rapport entre le bouillon de pré-enrichissement et la prise d'essai demeure le même. Une prise d'essai plus importante que celle validée à l'origine peut être utilisée, si une étude de validation/vérification a démontré l'absence d'effets négatifs sur la détection de *Cronobacter* spp.

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

NOTE 2 Des échantillons de taille importante peuvent compromettre la récupération des *Cronobacter* spp. stressés en présence d'une microflore interférente, comme des probiotiques<sup>[5],[6]</sup>.

Pour la préparation des quantités supérieures à 10 g, il convient de préchauffer l'eau peptonée tamponnée entre 34 °C et 38 °C (7.2) avant ensemencement avec la prise d'essai.

## 10.2 Pré-enrichissement

Incuber le milieu de pré-enrichissement ensemencé, préparé conformément à 10.1, à une température comprise entre 34 °C et 38 °C (7.2) pendant 18 h ± 2 h.

## 10.3 Enrichissement

Après incubation du milieu de pré-enrichissement ensemencé, bien mélanger et transférer 0,1 ml de la culture obtenue en 10.2 dans 10 ml de bouillon CSB (B.2) et bien mélanger. Incuber à 41,5 °C (7.2) pendant 24 h ± 2 h.

## 10.4 Isolement de colonies présumées de *Cronobacter* spp.

Laisser les boîtes de gélose CCI (B.3) se stabiliser à température ambiante si elles étaient stockées à une température inférieure. Si nécessaire, sécher la surface des boîtes (7.13) en suivant le mode opératoire fourni dans l'ISO 11133.

À partir de la culture d'enrichissement, bien mélanger et ensemencer, à l'aide d'une anse de 10 µl (7.3), la surface de la gélose CCI (B.3) afin d'obtenir des colonies bien séparées. Incuber la boîte à 41,5 °C (7.2) pendant 24 h ± 2 h.

Après incubation, examiner les boîtes de gélose chromogène afin de rechercher la présence de colonies caractéristiques présumées de *Cronobacter*.

Les colonies caractéristiques de *Cronobacter* sur la gélose CCI sont de taille petite à moyenne (de 1 mm à 3 mm), et présentent une coloration bleue à bleu-vert. Les colonies autres que *Cronobacter* sont souvent de couleur blanche, blanche avec un centre vert, grise ou noire. Certaines colonies naturellement pigmentées ne contenant pas de *Cronobacter* peuvent être de couleur jaune ou rouge.

## 10.5 Confirmation

### 10.5.1 Généralités

Pour les essais de confirmation, repiquer cinq colonies identifiées comme caractéristiques ou suspectes à partir de la gélose sélective CCI (voir 10.4). Si les colonies n'ont pas été correctement isolées, il peut s'avérer nécessaire de d'abord ré-ensemencer en stries la gélose sélective (B.3) avec une colonie caractéristique.

Si, sur la boîte, moins de cinq colonies caractéristiques ou suspectes sont observées, prélever toutes les colonies identifiées pour confirmation.

Utiliser des cultures pures pour la confirmation biochimique.

### 10.5.2 Purification des colonies

Ensemencer en stries la surface d'une gélose non sélective, comme la gélose TSA (B.4), avec les colonies sélectionnées, de façon à obtenir des colonies correctement isolées.

Retourner et incuber les boîtes entre 34 °C et 38 °C (7.2) pendant 21h ± 3h.

Si les cultures sur la gélose non sélective ne sont pas pures, repiquer les colonies suspectes dans une autre boîte de gélose non sélective et incuber entre 34 °C et 38 °C (7.2) pendant 21h ± 3h afin d'obtenir une culture pure.

Il est possible de soumettre d'abord à essai la colonie la plus caractéristique de la boîte de gélose sélective. Si le résultat est positif, il est inutile de soumettre à essai les autres colonies. Si le résultat est négatif, soumettre à essai les autres colonies sélectionnées, les unes après les autres, jusqu'à ce qu'elles soient toutes négatives ou qu'un résultat positif soit obtenu.

Les souches peuvent être conservées sur la gélose non sélective à 5 °C (7.11), mais elles ne peuvent pas être stockées pendant plus de sept jours. Il convient de repiquer les colonies avant de procéder aux essais de confirmation.

### 10.5.3 Confirmation biochimique

#### 10.5.3.1 Généralités

Réaliser les essais de confirmation répertoriés dans le [Tableau 1](#).

**Tableau 1 — Essais de confirmation pour *Cronobacter* spp.**

Oxydase	Formation d'acide à partir de:
Hydrolyse du substrat 4-nitrophényle $\alpha$ -D-glucopyranoside	D-arabitol
L-lysine décarboxylase	D-sorbitol
L-ornithine décarboxylase	D-saccharose
Rouge de méthyle (facultatif)	$\alpha$ -méthyl-D-glucoside (facultatif)
Voges-Proskauer (facultatif)	

NOTE 1 Il est possible d'utiliser des galeries d'identification miniaturisées pour l'examen biochimique des *Cronobacter* spp., si leur fiabilité est démontrée (voir l'ISO 7218).

NOTE 2 D'autres modes opératoires peuvent être utilisés pour confirmer que l'isolat fait partie des *Cronobacter* spp., à condition de vérifier que le mode opératoire alternatif est approprié (voir l'ISO 7218).

#### 10.5.3.2 Oxydase

À l'aide d'une anse en platine iridié ou en plastique (7.3), prélever une partie d'une colonie correctement isolée sur chacune des boîtes individuelles (10.5.2) et la déposer sur un papier filtre imbibé de réactif de l'oxydase (B.5.1); l'apparition d'une coloration mauve, violette ou bleu foncé dans les 10 s indique une réaction positive. Si un kit commercial d'essai pour la recherche de l'oxydase est utilisé, suivre les instructions du fabricant.