
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Méthode horizontale
pour la détermination des *Vibrio*
spp. —**

Partie 1:

**Recherche des espèces de *Vibrio*
parahaemolyticus, *Vibrio cholerae*
et *Vibrio vulnificus* potentiellement
entéropathogènes**

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/56da6900-34b6-4143-ba02->

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the
determination of *Vibrio* spp. —*

*Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio*
parahaemolyticus, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21872-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/56da6900-34b6-4143-ba02-a53ec6dd6896/iso-21872-1-2017>



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	v
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principes	2
4.1 Généralités.....	2
4.2 Premier enrichissement en milieu sélectif liquide.....	3
4.3 Second enrichissement en milieu sélectif liquide.....	3
4.4 Isolement et identification.....	3
4.5 Confirmation.....	3
5 Milieus de culture et réactifs	4
5.1 Milieu d'enrichissement: eau peptonée alcaline salée (EPAS).....	4
5.2 Milieux d'isolement sélectifs solides.....	4
5.2.1 Premier milieu: milieu gélosé au thiosulfate, citrate, bile et saccharose (TCBS).....	4
5.2.2 Second milieu.....	5
5.3 Gélose nutritive salée (GNS).....	5
5.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase.....	5
5.5 Essais biochimiques.....	5
5.5.1 Milieu salé pour la détection de la L-lysine décarboxylase (LDC).....	5
5.5.2 Milieu salé pour la détection de l'arginine dihydrolase (ADH).....	5
5.5.3 Réactif pour la recherche de β -galactosidase.....	5
5.5.4 Milieu salé pour la recherche de l'indole.....	5
5.5.5 Eaux peptonées salées.....	5
5.5.6 Solution de chlorure de sodium.....	5
5.6 PCR.....	5
5.6.1 Tampon Tris Acétate EDTA (TAE) (ou un tampon permettant d'obtenir des performances similaires).....	5
5.6.2 Mélange réactionnel.....	5
5.6.3 Amorces et sondes.....	5
5.6.4 Témoin positif.....	6
5.6.5 Témoin d'extraction négatif.....	6
6 Matériel et consommables	6
7 Échantillonnage	7
8 Préparation de l'échantillon pour essai	7
9 Mode opératoire (voir Figure A.1)	7
9.1 Prise d'essai et suspension mère.....	7
9.2 Premier enrichissement sélectif.....	8
9.3 Second enrichissement sélectif.....	8
9.4 Isolement et identification.....	8
9.5 Confirmation.....	9
9.5.1 Généralités.....	9
9.5.2 Choix des colonies pour la confirmation et la préparation de cultures pures.....	9
9.5.3 Essais d'identification présomptive.....	10
9.5.4 Confirmation biochimique.....	10
9.5.5 Confirmation par PCR.....	12
9.5.6 Extraction d'ADN.....	13
9.5.7 PCR classique.....	13
9.5.8 PCR en temps réel.....	14
10 Expression des résultats	14

11	Caractéristiques de performance de la méthode	14
11.1	Étude interlaboratoires	14
11.2	Sensibilité	15
11.3	Spécificité	15
11.4	LD ₅₀	15
12	Rapport d'essai	15
Annexe A (normative)	Schéma du mode opératoire	16
Annexe B (normative)	Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs	18
Annexe C (informative)	PCR classique pour la recherche de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>, des gènes de l'hémolysine thermostable directe, TDH (<i>tdh</i>), et de l'hémolysine apparentée à la TDH (<i>trh</i>), de <i>Vibrio cholerae</i> et de <i>Vibrio vulnificus</i>	24
Annexe D (informative)	PCR en temps réel pour la recherche de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>, du gène de l'hémolysine thermostable directe, TDH (<i>tdh</i>), et de <i>Vibrio vulnificus</i>	29
Annexe E (informative)	Résultats d'une étude interlaboratoires	32
Bibliographie	36

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21872-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/56da6900-34b6-4143-ba02-a53ec6dd6896/iso-21872-1-2017>

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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.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 21872-1:2007, qui ont fait l'objet d'une révision technique. Elle intègre également l'ISO/TS 21872-1:2007/Cor.1:2008.

Les principales modifications sont les suivantes:

- introduction de méthodes d'identification moléculaire facultatives pour les principales espèces de *Vibrio* d'origine alimentaire (*V. parahaemolyticus*, y compris les souches potentiellement entéropathogènes, *V. vulnificus* et *V. cholerae*);
- ajout des caractéristiques de performance de la méthode dans l'[Annexe E](#).

Une liste de toutes les parties de la norme ISO 21872 se trouve sur le site web de l'ISO.

Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires et des produits destinés à l'alimentation animale, la méthode horizontale décrite dans le présent document peut ne pas convenir exactement, dans tous ses détails, à certains d'entre eux. Dans ce cas, des méthodes différentes, spécifiques à ces produits, peuvent être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, tous les efforts seront déployés pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que cela est possible.

Les principales modifications, listées dans l'avant-propos, qui ont été introduites dans le présent document par comparaison à l'ISO/TS 21872-1:2007 sont considérées comme majeures (voir l'ISO 17468).

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 réalisée de façon immédiate et, de ce fait, il peut déjà exister, pour certains groupes de produits, des normes internationales et/ou nationales qui ne concordent pas avec cette méthode horizontale. Lorsque de telles normes feront l'objet d'une révision, il serait souhaitable qu'elles soient conformes au présent document de sorte que les seuls écarts restants de cette méthode horizontale soient ceux qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 21872-1:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/56da6900-34b6-4143-ba02-a53ec6dd6896/iso-21872-1-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/56da6900-34b6-4143-ba02-a53ec6dd6896/iso-21872-1-2017>

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la détermination des *Vibrio* spp. —

Partie 1:

Recherche des espèces de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* potentiellement entéropathogènes

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais pour la recherche des espèces de *Vibrio*, et en particulier des *V. cholerae* toxigènes, ne soient réalisés que dans des laboratoires équipés à cet effet et sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit pris lors de l'élimination des éléments contaminés.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode horizontale pour la recherche des espèces entéropathogènes de *Vibrio* provoquant des maladies dans ou via le tractus intestinal chez l'homme. Les espèces détectables par les méthodes spécifiées incluent *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus*.

Le présent document s'applique:

- aux produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale;
- aux échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de denrées alimentaires.

NOTE 1 Cette méthode peut ne pas être appropriée dans les moindres détails pour certains produits (voir l'Introduction).

NOTE 2 L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a identifié *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* comme les principales espèces de *Vibrio* d'origine alimentaire. Cependant, le présent document peut également convenir pour l'identification des autres espèces de *Vibrio* provoquant des maladies chez l'homme.^[1]

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 6887-1:2017, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*

ISO 6887-3, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 3: Règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche*

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 22118, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection et la quantification des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Caractéristiques de performance*

ISO 22119, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions*

ISO 22174, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions*

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

espèces de *Vibrio* potentiellement entéropathogènes

micro-organismes formant des colonies caractéristiques sur des milieux sélectifs solides et possédant les caractéristiques biochimiques ou moléculaires décrites, lorsque l'essai est réalisé conformément au présent document

Note 1 à l'article: Le présent document décrit des modes opératoires spécifiques pour *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/56da6900-34b6-4143-ba02-a53ec6dd6896/iso-21872-1-2017>

3.2

recherche des espèces de *Vibrio* potentiellement entéropathogènes

détermination de la présence ou de l'absence d'espèces de *Vibrio* potentiellement entéropathogènes (3.1) (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus*) dans une quantité spécifiée de produit, lorsque l'essai est réalisé conformément au présent document

4 Principes

4.1 Généralités

La recherche d'espèces de *Vibrio* potentiellement entéropathogènes (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus*) exige quatre phases successives, comme indiqué dans le schéma du mode opératoire figurant dans l'[Annexe A](#).

La récupération de certaines espèces de *Vibrio* dans les aliments peut être améliorée en utilisant différentes températures d'incubation en fonction de l'espèce ciblée ou de l'état de la matrice alimentaire. Par exemple, la récupération de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* dans les produits frais est améliorée par enrichissement à 41,5 °C, alors que pour *V. vulnificus*, et pour *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* dans les produits congelés (< -18 °C)^[2], séchés ou salés, la récupération est améliorée par enrichissement à 37 °C. Si la recherche de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* est exigée, il convient d'utiliser toutes les températures d'incubation spécifiées. Si la recherche simultanée de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* n'est pas exigée, le ou les modes opératoires spécifiques

peuvent être sélectionnés en fonction des espèces à rechercher. Il convient de spécifier clairement cette sélection dans le rapport d'essai.

NOTE *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* peuvent être présents en petit nombre et sont souvent accompagnés d'un nombre beaucoup plus grand d'autres micro-organismes appartenant à la famille des *Vibrionaceae* ou à d'autres familles.

4.2 Premier enrichissement en milieu sélectif liquide

Ensemencement de la prise d'essai dans le premier milieu d'enrichissement à base d'eau peptonée alcaline salée (EPAS) (5.1) à température ambiante, puis incubation à 41,5 °C pendant 6 h et/ou à 37 °C pendant 6 h.

Les conditions d'incubation sont déterminées par les espèces ciblées et l'état du produit alimentaire.

Pour la recherche de toutes les espèces ciblées dans les produits congelés, séchés ou salés, il convient d'effectuer le premier enrichissement à 37 °C.

Pour la recherche de *V. vulnificus* dans tous les produits, il convient de procéder au premier enrichissement à 37 °C.

Pour la recherche de *V. parahaemolyticus* et/ou *V. cholerae* uniquement, dans les produits frais, il convient de procéder au premier enrichissement à 41,5 °C.

4.3 Second enrichissement en milieu sélectif liquide

Ensemencement du second milieu d'enrichissement (EPAS) avec les cultures obtenues en 4.2.

Incubation du milieu d'enrichissement ensemencé à 41,5 °C pendant 18 h et/ou à 37 °C pendant 18 h.

Pour la recherche de *V. vulnificus* dans tous les produits, il convient de procéder au second enrichissement à 37 °C.

Pour la recherche de *V. parahaemolyticus* et/ou *V. cholerae* uniquement, dans tous les produits, il convient de procéder au second enrichissement à 41,5 °C.

4.4 Isolement et identification

À partir des cultures obtenues en 4.2 et en 4.3, ensemencement de deux milieux sélectifs solides:

- milieu gélosé au thiosulfate, citrate, bile et saccharose (TCBS) (5.2.1);
- un autre milieu sélectif solide approprié (dont le choix est laissé au laboratoire), tel que la gélose chromogène, en complément du milieu TCBS (5.2.2).

Incubation du milieu TCBS à 37 °C, puis examen après 24 h. Incubation du second milieu sélectif selon les recommandations du fabricant.

4.5 Confirmation

Les colonies présumées *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* isolées en 4.4 sont repiquées et confirmées au moyen d'essais biochimiques appropriés et/ou d'essais de réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

La confirmation biochimique et/ou par PCR d'isolats peut être utilisée pour l'identification d'espèces; toutefois, la recherche fiable de *V. parahaemolyticus* entéropathogènes, tels que déterminés par la présence de gènes de l'hémolysine thermostable directe, TDH (*tdh*), et/ou de l'hémolysine apparentée à la TDH (*trh*), ne peut être effectuée que par des essais de PCR.

Il a été démontré qu'en procédant à un criblage de bouillons d'EPAS par PCR classique, l'absence d'amplification de *Vp-toxR* peut indiquer l'absence de détection de *V. parahaemolyticus*.^[3] Afin de réduire

le nombre d'essais en aval et si sa fiabilité a été démontrée par le laboratoire utilisateur, le criblage de bouillons d'enrichissement incubés peut être utilisé. Cette approche est uniquement recommandée après le second enrichissement et ne s'applique pas aux autres cibles moléculaires des espèces de *Vibrio*.

NOTE 1 Des données de validation générées lors de la préparation du présent document ont démontré que l'identification par PCR peut être effectuée par une PCR classique pour *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. cholerae*, ou par une PCR en temps réel pour *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. Les méthodes PCR utilisées pour l'élaboration du présent document sont décrites dans les [Annexes C](#) et [D](#).

NOTE 2 Les données de validation pour le criblage de bouillons du second enrichissement en vue de l'amplification de *Vp-toxR* n'ont pas été générées lors de la préparation du présent document.

5 Milieux de culture et réactifs

Pour les pratiques générales de laboratoire, se reporter à l'ISO 7218.

Pour la clarté du texte, les détails de la composition et de la préparation des milieux de culture et des réactifs sont décrits dans l'[Annexe B](#).

Pour les essais de performance des milieux de culture, se reporter à l'ISO 11133.

NOTE Les amorces, les sondes et les conditions de la PCR utilisées pour l'élaboration du présent document sont décrites dans les [Annexes C](#) et [D](#).

5.1 Milieu d'enrichissement: eau peptonée alcaline salée (EPAS)

Tel que spécifié en [B.1](#).

5.2 Milieux d'isolement sélectifs solides

5.2.1 Premier milieu: milieu gélosé au thiosulfate, citrate, bile et saccharose (TCBS)

Tel que spécifié en [B.2](#). Voir le [Tableau 1](#) pour les données d'essai de performance.

Tableau 1 — Essais de performance du milieu gélosé au thiosulfate, citrate, bile et saccharose (TCBS)

Fonction	Incubation	Souches de contrôle	WDCM ^a	Méthode de contrôle	Critères ^e	Réactions caractéristiques
Productivité	37 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 3 h	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	00185 ^b	Qualitative	Bonne croissance (2)	Colonies vertes (saccharose négatif)
	37 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 3 h	<i>Vibrio furnissii</i>	00186 ^b	Qualitative	Bonne croissance (2)	Colonies jaunes (saccharose positif)
Sélectivité	37 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 3 h	<i>Escherichia coli</i> ^{c d}	00012, 00013 ou 00090	Qualitative	Inhibition totale (0)	—

^a Catalogue de souches du World Data Centre for Microorganisms (WDCM) disponible à l'adresse: <http://refs.wdcm.org>.

^b Souches à utiliser au minimum (voir ISO 11133).

^c Certaines restrictions nationales et directives peuvent nécessiter l'utilisation d'un sérovar d'*E. coli* différent. Se référer aux exigences nationales relatives au choix des sérovares d'*E. coli*.

^d Souches au choix; au moins l'une des souches doit être utilisée (voir ISO 11133).

^e La croissance est classée en: 0 : croissance nulle, 1 : croissance faible (inhibition partielle), et 2 : croissance marquée (voir ISO 11133).

5.2.2 Second milieu

Le choix du second milieu est laissé au laboratoire d'essai. Il convient de suivre scrupuleusement les instructions du fabricant relatives à sa préparation.

5.3 Gélose nutritive salée (GNS)

Telle que spécifiée en [B.3](#).

5.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase

Tel que spécifié en [B.4](#).

5.5 Essais biochimiques

5.5.1 Milieu salé pour la détection de la L-lysine décarboxylase (LDC)

Tel que spécifié en [B.5](#).

5.5.2 Milieu salé pour la détection de l'arginine dihydrolase (ADH)

Tel que spécifié en [B.6](#).

5.5.3 Réactif pour la recherche de β -galactosidase

Tel que spécifié en [B.7](#).

5.5.4 Milieu salé pour la recherche de l'indole

Tel que spécifié en [B.8](#).
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/56da6900-34b6-4143-ba02-a53ec6dd6896/iso-21872-1-2017>

5.5.5 Eaux peptonées salées

Telles que spécifiées en [B.9](#).

5.5.6 Solution de chlorure de sodium

Telle que spécifiée en [B.10](#).

5.6 PCR

5.6.1 Tampon Tris Acétate EDTA (TAE) (ou un tampon permettant d'obtenir des performances similaires)

Tel que spécifié en [B.11](#).

5.6.2 Mélange réactionnel

Les réactifs doivent être ajoutés dans les quantités spécifiées dans les instructions du fabricant. Voir les [Annexes C](#) et [D](#) (informatives) pour obtenir des exemples de compositions des mélanges réactionnels utilisés pour l'élaboration du présent document.

5.6.3 Amorces et sondes

Les séquences d'amorce (et de sonde d'hydrolyse), si elles sont exigées, doivent être publiées dans une revue révisée par des pairs et leur spécificité vérifiée sur un large éventail de souches de l'espèce *Vibrio* cible et de souches non cibles. Grâce aux progrès réalisés dans le séquençage du génome complet de

souches bactériennes, des marqueurs spécifiques aux espèces plus appropriés pourraient être identifiés dans le futur.

Pour *V. parahaemolyticus*, il convient que la région cible soit *toxR*.

Pour la recherche de souches pathogènes de *V. parahaemolyticus*, il convient de cibler les gènes codant l'hémolysine thermostable directe (TDH) et l'hémolysine apparentée à la TDH (TRH).

Pour *V. cholerae*, il convient de cibler la région *prVC* de l'espace intergénique de l'ARNr 16S-23S pour une PCR classique.

Pour *V. vulnificus*, il convient que la région cible soit la région de l'hémolysine de *V. vulnificus* (*vvha*).

Des régions cibles autres que celles spécifiées ci-dessus pour l'identification de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. cholerae* peuvent être utilisées s'il a été démontré qu'elles donnaient lieu à des performances équivalentes à celles utilisées pour l'élaboration du présent document et décrites dans les [Annexes C](#) et [D](#), si elles sont publiées dans une revue révisée par des pairs et si leur spécificité a été vérifiée par utilisation sur un large éventail de souches de l'espèce de *Vibrio* cible et de souches non cibles.

Voir l'[Annexe C](#) pour obtenir des exemples détaillés d'amorces utilisées pour une PCR classique, et l'[Annexe D](#) pour les amorces et les sondes d'hydrolyse pour la PCR en temps réel utilisées pour l'élaboration du présent document.

5.6.4 Témoin positif

Un témoin séparé doit être utilisé pour chaque espèce de *Vibrio* ciblée. Voir les [Annexes C](#) et [D](#) pour obtenir des exemples détaillés des souches de contrôle utilisées pour l'élaboration du présent document.

5.6.5 Témoin d'extraction négatif

De l'eau sans nucléase ou de l'eau stérile à 0,85 % NaCl extraite conformément à [9.5.6](#).

6 Matériel et consommables

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si les spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie tel que spécifié dans l'ISO 7218, et en particulier le matériel suivant.

6.1 Réfrigérateur, réglable à $5\text{ °C} \pm 3,0\text{ °C}$.

6.2 Incubateur, réglable à $37\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$.

6.3 Incubateur, réglable à $41,5\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$.

6.4 Congélateur, réglable à $< -15\text{ °C}$.

6.5 Tubes de micro-centrifugeuse, de 1,5 ml et 2,0 ml de capacité.

6.6 Micro-centrifugeuse, pour tubes de réaction de 1,5 ml et 2,0 ml et capable de fonctionner à 10 000 *g*.

6.7 Bloc chauffant capable de fonctionner à $95\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$, ou équivalent.

6.8 Agitateur vortex.

6.9 Pipettes graduées et pointes à filtre, pour volumes entre 1 µl et 1 000 µl.

6.10 Consommables associés à la technique de PCR classique ou en temps réel, par exemple des plaques optiques et des bouchons, un support de plaques optiques, appropriés à l'utilisation avec l'appareil de PCR sélectionné.

6.11 Appareil de PCR classique ou en temps réel, électrophorèse sur gel et matériel de visualisation des UV le cas échéant.

7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif qui n'a pas été endommagé ou modifié pendant le transport et le stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Se reporter à la Norme internationale spécifique au produit concerné. S'il n'existe pas de document spécifique, il est recommandé que les parties concernées s'accordent sur ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 6887-1 et à l'ISO 6887-3 et/ou au document concernant le produit à examiner. S'il n'existe pas de document spécifique, il est recommandé que les parties concernées s'accordent sur ce sujet.

9 Mode opératoire (voir [Figure A.1](#))

9.1 Prise d'essai et suspension mère

Le présent document a été validé pour des prises d'essai allant jusqu'à 25 g ou 25 ml. Une prise d'essai plus petite peut être utilisée sans validation ou vérification supplémentaire, dans la mesure où le rapport entre le bouillon de (pré-)enrichissement et la prise d'essai demeure le même. Il est admis d'utiliser une prise d'essai plus importante que celle validée à l'origine si une étude de validation/vérification a démontré l'absence d'effets néfastes sur la recherche des espèces de *Vibrio*.

NOTE Une validation peut être effectuée conformément au document approprié de l'ISO 16140 (toutes les parties). La vérification du regroupement des échantillons peut être réalisée conformément au protocole décrit dans l'ISO 6887-1:2017, Annexe D.

Pour la préparation des suspensions mères, utiliser le premier milieu d'enrichissement (EPAS) spécifié en [5.1](#).

Utiliser des prises d'essai (25 g ou 25 ml) et homogénéiser dans 225 ml de milieu d'enrichissement.

En cas de grandes quantités (supérieures à 25 g ou 25 ml), il convient de chauffer l'EPAS à 37 °C ± 1 °C et/ou 41,5 °C ± 1 °C ([4.2](#)) avant ensemencement avec la prise d'essai.

Afin de réduire la somme de travail, lorsque plusieurs prises d'essai de 25 g ou 25 ml issues d'un lot déterminé de produit alimentaire sont à examiner et lorsqu'il est prouvé qu'un mélange (réunissant les prises d'essai) ne modifie pas les résultats en ce qui concerne ce produit en particulier, les prises d'essai peuvent être mélangées. Par exemple, si 10 prises d'essai de 25 g ou 25 ml sont à examiner, il est possible de combiner ces 10 unités afin d'obtenir un échantillon composite de 250 g ou 250 ml et d'ajouter 2,25 l de milieu d'enrichissement.

Le nombre de cellules d'espèces de *Vibrio* potentiellement entéropathogènes diminue sensiblement lors du stockage à des températures de réfrigération. Il convient donc d'éviter, dans la mesure du possible, de stocker les échantillons et, dans une moindre mesure, les suspensions à ces températures et sinon de les y maintenir un minimum de temps.