

---

---

**Microbiologie de la chaîne  
alimentaire — Méthodes de recherche  
des larves L3 d'Anisakidae dans les  
poissons et produits de la pêche —**

Partie 2:

**Méthode de digestion artificielle**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Microbiology of the food chain — Methods for the detection of  
Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products —*

*Part 2: Artificial digestion method*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3019ffb6-f45b-4fd4-a7e9-506903a99ec/iso-23036-2-2021>



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

ISO 23036-2:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3019ffb6-f45b-4fd4-a7e9-506903a99ec/iso-23036-2-2021>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, Genève

Tél.: +41 22 749 01 11

E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)

Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## 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>Principe</b> .....	<b>2</b>
4.1 Généralités.....	2
4.2 Taille de l'échantillon.....	2
4.3 Préparation de l'échantillon.....	2
4.4 Digestion de l'échantillon.....	2
4.5 Filtration du liquide de digestion.....	2
4.6 Vérification des constatations.....	3
<b>5</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>3</b>
<b>6</b> <b>Équipement et consommables</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>4</b>
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>4</b>
8.1 Préparation de l'échantillon.....	4
8.2 Préparation du liquide de digestion.....	4
8.3 Digestion de l'échantillon dans le bécher en verre.....	5
8.4 Filtration du liquide de digestion.....	5
8.5 Examen microscopique.....	5
<b>9</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>6</b>
<b>10</b> <b>Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>6</b>
<b>11</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>6</b>
<b>12</b> <b>Assurance qualité</b> .....	<b>6</b>
<b>Annexe A (informative) Prélèvement d'échantillons</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe B (informative) Exemple de fiche de laboratoire pour la consignation des données lors de l'examen des filets de poisson à l'aide de la méthode de digestion artificielle</b> .....	<b>8</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>9</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 attirée 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.

(standards.iteh.ai)

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](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le Comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, en collaboration avec le Comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord sur la coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Une liste de toutes les parties de la série ISO 23036 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).

## Introduction

Les nématodes de la famille des Anisakidae présentent un cycle de vie complexe impliquant un nombre élevé d'hôtes. Au stade adulte, les Anisakidae pénètrent dans la muqueuse de l'estomac des mammifères marins. Les œufs non embryonnés produits par les femelles adultes sont excrétés avec les fèces des mammifères marins et sont embryonnés dans le milieu marin, où les larves de premier stade (L1) se développent dans les œufs. Les larves muent pour se transformer en larves libres de deuxième stade (L2), puis, si elles sont ingérées par des crustacés, en larves de troisième stade (L3). Ce stade est infectieux pour les poissons et les calamars et les larves sont transférées d'un poisson à un autre par le biais de la prédation, en restant au stade L3. Certaines larves migrent de la cavité abdominale vers les tissus musculaires. Les humains sont des hôtes accidentels, susceptibles d'être infectés après avoir ingéré du poisson ou des céphalopodes crus ou insuffisamment cuits contenant des larves L3 viables.

Les nématodes de la famille des Anisakidae sont les agents pathogènes de l'anisakidose humaine, une maladie qui constitue non seulement une menace pour la santé publique, mais aussi un problème d'ordre économique pour le secteur de la pêche et de sécurité des aliments (le terme anisakiase, qui désigne la maladie provoquée par les membres du genre *Anisakis*, est également parfois utilisé). Dans le monde entier, les poissons marins et anadromes sauvages constituent des hôtes intermédiaires d'Anisakidae, tandis que les mammifères marins en sont les hôtes définitifs.

Des procédures d'inspection visuelle visant à détecter les larves d'Anisakidae dans les poissons sont mises en œuvre afin de limiter le risque que des poissons contaminés atteignent le consommateur<sup>[1][2]</sup> et ainsi d'empêcher l'apparition de l'anisakidose humaine.

Le passage sous presse hydraulique suivi de l'observation sous lumière UV, ainsi que la digestion artificielle des tissus musculaires de poissons sont les méthodes qui ont été spécialement conçues pour détecter les larves de nématodes dans les poissons et évaluer le niveau d'infestation d'un lot, et qui ont été validées et soumises à essai dans des études comparatives interlaboratoires<sup>[3]</sup> (voir [Article 10](#)).

[ISO 23036-2:2021](https://standards.iso.org/standards/catalog/standards/sist/3019ffb6-f45b-4fd4-a7e9-506903a99ec/iso-23036-2-2021)

<https://standards.iso.org/standards/catalog/standards/sist/3019ffb6-f45b-4fd4-a7e9-506903a99ec/iso-23036-2-2021>

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

ISO 23036-2:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3019ffb6-f45b-4fd4-a7e9-506903a99ec/iso-23036-2-2021>

# Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthodes de recherche des larves L3 d'Anisakidae dans les poissons et produits de la pêche —

## Partie 2: Méthode de digestion artificielle

### 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détection des larves L3 d'Anisakidae qui se trouvent fréquemment dans les poissons marins et anadromes. La méthode s'applique aux poissons frais et/ou surgelés, ainsi qu'aux produits à base de poisson légèrement transformés, c'est-à-dire marinés, salés ou fumés. Cette méthode peut également servir de méthode de confirmation dans le cadre d'une inspection visuelle des organes viscéraux.

La méthode de digestion artificielle<sup>[4][5][6]</sup> s'applique à la quantification des infestations parasitaires en estimant le nombre de parasites dans les tissus musculaires des poissons et, en cas d'utilisation sur des poissons frais ou des produits à base de poisson légèrement transformés (jamais congelés avant traitement), à la détermination de la viabilité des larves L3 d'Anisakidae, susceptibles d'être présentes.

Cette méthode ne s'applique pas à la détermination des espèces ou du génotype des parasites détectés. Des méthodes morphologiques et/ou moléculaires permettent une identification définitive.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3019ffb6-f45b-4fd4-a7e9-506903a99ec/iso-23036-2-2021>

### 2 Références normatives

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3019ffb6-f45b-4fd4-a7e9-506903a99ec/iso-23036-2-2021>

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils 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 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

### 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:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>;
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>.

#### 3.1

##### larves L3 d'Anisakidae

larves de troisième stade (L3) appartenant à la famille des Anisakidae, et plus particulièrement aux genres *Anisakis*, *Contracaecum* et *Pseudoterranova*

Note 1 à l'article: Pour des raisons pratiques, le genre *Hysterothylacium* qui appartient à la famille des Raphidascarididae et est déjà classé parmi les Anisakidae, peut aussi être inclus.

### 3.2

#### **méthode de digestion artificielle**

méthode de détection des larves d'Anisakidae dans les tissus musculaires des poissons par digestion enzymatique (pepsine-HCl) permettant de libérer les larves des tissus, suivie d'une filtration et d'une détection des larves par microscopie

Note 1 à l'article: Si appliquée à du poisson frais, elle permet de vérifier la viabilité des larves.

## 4 Principe

### 4.1 Généralités

La méthode de digestion artificielle repose sur la dégradation enzymatique des fibres musculaires dans un liquide composé de pepsine et d'acide chlorhydrique, suivie par des étapes de filtration et de lavage.

Le mode opératoire permet de différencier les larves d'Anisakidae mortes et viables sous réserve que la température de la solution de digestion ne dépasse pas 37 °C (à l'exception des larves de *Hysterothylacium* sp., qui meurent à 37 °C) et que le poisson n'ait jamais été congelé.

Aucun contrôle qualité interne ne peut être effectué pendant la mise en œuvre de cette méthode.

NOTE D'autres méthodes peuvent être utilisées pour l'analyse, sous réserve que leur équivalence avec les méthodes décrites dans le présent document soit démontrée.

### 4.2 Taille de l'échantillon

Dans le cadre de l'inspection de produits de pêche à des fins de santé publique, la taille de l'échantillon doit être établie en fonction du risque, tel que déterminé par les autorités compétentes.

### 4.3 Préparation de l'échantillon

Afin d'accroître la surface d'action de la dégradation enzymatique, émietter délicatement les échantillons en prenant soin de ne pas perturber les larves. Il est également possible d'utiliser un Homogénéiseur/Stomacher<sup>®1)</sup>, qui facilite la digestion, sans endommager les larves de nématodes.

Il convient d'éviter toute opération de mélange ou de broyage, pouvant endommager ou détruire les larves.

### 4.4 Digestion de l'échantillon

Les larves viables d'Anisakidae résistent au liquide de digestion à base de pepsine-HCl et peuvent donc être extraites des tissus musculaires.

Afin de garantir une digestion rapide et efficace, un rapport maximal entre la chair et le liquide de digestion de 1:20 et une température de (37 ± 2) °C doivent être maintenus tout au long du processus. La durée requise de la digestion doit être comprise entre 15 min et 30 min. Pour les échantillons de muscles qui sont moins digestibles, il convient d'augmenter la durée de digestion sans toutefois dépasser 45 min, sauf validation contraire pour une matrice d'échantillon particulière.

### 4.5 Filtration du liquide de digestion

Au terme de la digestion, le liquide de digestion doit être filtré à l'aide d'un tamis à mailles spécifiques (6.9). Les larves retenues doivent être rincées à l'eau du robinet.

1) L'Homogénéiseur et le Stomacher<sup>®</sup> sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.



## 4.6 Vérification des constatations

En cas de résultats positifs ou incertains, il convient de confier la confirmation et l'identification de l'espèce par des méthodes morphologiques et/ou moléculaires à un laboratoire de référence qualifié.

## 5 Réactifs

### 5.1 Eau du robinet.

### 5.2 Acide chlorhydrique, à 25 %.

### 5.3 Pepsine, en poudre ou en granules: 1:10 000 NF, 1:12 500 BP, 2 000 FIP; liquide: 660 U/ml.

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

L'utilisation d'une formulation liquide de pepsine peut se révéler intéressante dans la mesure où elle peut réduire le risque professionnel, tel que des réactions allergiques du personnel de laboratoire.

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

### 5.4 Éthanol à 90 %.

### 5.5 Solution acide, acide acétique à 1 %.

ISO 23036-2:2021  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3019ffb6-f45b-4fd4-a7e9-506903a99ec/iso-23036-2-2021>

## 6 Équipement et consommables

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

### 6.1 Sacs en plastique ou bacs de collecte étiquetés, destinés aux échantillons.

### 6.2 Couteaux, ciseaux et pinces, afin de découper les échantillons.

### 6.3 Balance étalonnée, afin de peser les échantillons et/ou la pepsine (précision de $\pm 0,1$ g).

### 6.4 Agitateur magnétique, pourvu d'une plaque chauffante réglable, ou agitateur magnétique placé dans un incubateur.

### 6.5 Barreau d'agitation triangulaire enrobé de polytétrafluoroéthylène (PTFE), d'une longueur minimale de 5 cm.

### 6.6 Thermomètre, d'une précision d'au moins $\pm 0,5$ °C, plage de température minimale comprise entre 20 °C et 70 °C.

### 6.7 Bêchers en verre, d'une contenance appropriée.

### 6.8 Feuille d'aluminium ou couvercles, permettant de couvrir les bêchers en verre.

**6.9 Tamis**, en laiton ou en acier inoxydable, à mailles d'environ 180 microns à 500 microns (d'un diamètre de 10 cm environ ou plus).

**6.10 Boîtes de Petri**, d'un diamètre de 90 mm environ, destinées au comptage des larves.

**6.11 Petits contenants**, permettant de recueillir les larves extraites.

**6.12 Stéréomicroscope**, avec une source lumineuse réglable transmise par le dessous.

## 7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document, mais est présenté à l'[Annexe A](#). Si aucune Norme internationale n'aborde l'échantillonnage de poisson, il est recommandé aux parties concernées de s'entendre à ce sujet.

## 8 Mode opératoire

**AVERTISSEMENT** — Le personnel de laboratoire chargé de mettre en œuvre le mode opératoire doit porter une blouse de laboratoire, un masque et des gants jetables. Lors de la manipulation de la pepsine, il convient d'éviter tout contact avec la poudre et toute inhalation de poussières (masque). L'utilisation d'une formulation liquide de pepsine peut se révéler intéressante dans la mesure où elle peut réduire le risque de réaction allergique du personnel de laboratoire.

iTeh STANDARD PREVIEW

### 8.1 Préparation de l'échantillon (standards.iteh.ai)

Les échantillons destinés à l'essai peuvent être issus de poisson frais, congelé ou légèrement transformé et d'organes internes (foie ou ovaire, par exemple). Leur état doit être consigné avant l'essai.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3019ffb6-f45b-4fd4-a7e9-30091e2a9cc8/iso-23036-2-2021>

Chaque échantillon doit être pesé et son poids doit être consigné. Le poids de chaque échantillon destiné à l'essai par digestion doit être compris entre 25 g et 200 g.

Le poisson entier doit être éviscéré, écorché et découpé en filet à la main et les viscères, ainsi que chaque côté chair/filet peuvent être placés dans des sacs en plastique transparents distincts en vue d'être analysés individuellement en fonction de la taille des filets.

Émietter manuellement l'échantillon ou utiliser un homogénéiseur/Stomacher<sup>®2)</sup>.

En cas de découverte de larves avant la digestion, il convient de ne pas les perturber en vue de l'observation ultérieure, telle que décrite en [8.5](#).

En cas d'utilisation de poisson légèrement transformé contenant, par exemple, de l'huile et des épices, l'échantillon doit être rincé à l'eau du robinet avant digestion afin d'éliminer ces ingrédients autant que possible.

### 8.2 Préparation du liquide de digestion

La pepsine utilisée pour la préparation du liquide de digestion doit avoir l'activité appropriée requise pour la digestion ([5.3](#)). Le liquide de digestion doit être préparé extemporanément pour chaque analyse. La préparation du liquide de digestion se compose des étapes suivantes:

- a) ajouter 16 ml d'acide chlorhydrique (voir [Article 5](#)) dans un bécher en verre contenant 2 l d'eau du robinet préalablement chauffée à  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ;

---

2) L'Homogénéiseur et le Stomacher<sup>®</sup> sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.