

---

---

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

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

Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)



# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)



## DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2016, 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

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Avant-propos</b> .....  | <b>iv</b> |
| <b>Introduction</b> .....  | <b>v</b>  |
| <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>  |
| <b>5</b> <b>Réactifs</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>6</b> <b>Appareillage</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>7</b> <b>Échantillonnage et transport</b> .....   | <b>4</b>  |
| 7.1   Échantillonnage.....   | 4         |
| 7.2   Transport.....   | 4         |
| 7.3   Réception des échantillons.....  | 4         |
| 7.4   Conservation.....  | 4         |
| 7.5   Préparation de l'échantillon pour essai.....   | 4         |
| <b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....  | <b>5</b>  |
| 8.1   Récupération des parasites sur des légumes verts à feuilles.....                           | 5         |
| 8.2   Récupération des parasites sur des fruits à baies.....                                     | 6         |
| 8.3   Séparation immunomagnétique (IMS).....   | 7         |
| 8.4   Coloration de l'échantillon.....   | 7         |
| 8.5   Examen au microscope.....  | 8         |
| 8.5.1   Commentaires généraux.....   | 8         |
| 8.5.2   Examen des préparations d'échantillons au microscope à épifluorescence.....              | 9         |
| 8.5.3   Examen des préparations d'échantillons au microscope CID.....                            | 11        |
| <b>9</b> <b>Procédures de contrôle qualité</b> .....   | <b>12</b> |
| 9.1   Généralités.....   | 12        |
| 9.2   Inclusion et interprétation des contrôles.....   | 13        |
| 9.3   Nettoyage de l'équipement.....   | 13        |
| <b>10</b> <b>Compte-rendu des résultats</b> .....  | <b>13</b> |
| 10.1   Expression des résultats.....   | 13        |
| 10.2   Rapport d'essai.....  | 14        |
| <b>Annexe A (normative) Préparation des réactifs</b> .....                                       | <b>15</b> |
| <b>Annexe B (normative) Préparation des suspensions de contrôle de processus positives</b> ..... | <b>17</b> |
| <b>Annexe C (informative) Pourcentages de rendement obtenus avec les méthodes</b> .....          | <b>19</b> |
| <b>Bibliographie</b> .....   | <b>21</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 signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](#).

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

## Introduction

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

# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)

# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)

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

**AVERTISSEMENT** — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter de tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente norme d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

## 1 Domaine d'application

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

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

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

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

## 2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 7218:2007, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

## 3 Termes et définitions

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

### 3.1

#### **oocyste de *Cryptosporidium***

stade de transmission de *Cryptosporidium* spp.

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

### 3.2

#### **kyste de *Giardia***

stade de transmission de *Giardia* spp.

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

### 3.3

#### **légume vert frais à feuilles**

feuilles de plantes consommées comme un légume, qui n'ont été soumises à aucun processus, excepté peut-être le découpage et le lavage

### 3.4

#### **fruit frais à baies**

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

### 3.5

#### **contrôle interne d'extraction**

(oo)cystes marqués à l'aide de marqueurs fluorescents spécifiques qui peuvent être ajoutés dans des quantités définies à l'échantillon avant le traitement pour s'assurer que la méthode fonctionne correctement

### 3.6

#### **contrôle positif**

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

### 3.7

#### **contrôle négatif**

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

## 4 Principe

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

## 5 Réactifs

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

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

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

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

5.2.1 **Méthanol**, de qualité analytique.

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

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

## 6 Appareillage

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

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