NORME INTERNATIONALE

ISO 16649-1

Deuxième édition
2018-04

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive —

Partie 1: Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D glucuronide

Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli —

Part 1: Colony-count technique at 44 °C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide

Numéro de référence
ISO 16649-1:2018(F)

© ISO 2018



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

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 Prise d'essai, suspension mère, dilutions et étape de revivification 2
4.2 Culture en milieu sélectif 2
4.3 Calcul 2
5 Milieux de culture et réactifs **2**
6 Matériel et consommables **2**
7 Prélèvement **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 Revivification 4
9.4 Transfert sur le milieu sélectif et incubation 4
9.5 Comptage des unités formant colonie (UFC) 5
9.6 Calcul 5
10 Expression des résultats **5**
11 Caractéristiques de performance de la méthode **5**
12 Rapport d'essai **5**
13 Assurance qualité **5**
Annexe A (normative) **Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs** **6**
Bibliographie **10**

© ISO 2018 – Tous droits réservés

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 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 ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 16649-1:2001) qui a fait l'objet d'une révision technique en appliquant les modifications principales suivantes:

— des échantillons de l'environnement et au stade de production primaire ont été ajoutés dans le domaine d'application;

— une durée d'incubation minimale (20 h) a été fixée pour la gélose tryptone-bile-X-glucuronide (TBX) pendant la culture en milieu sélectif;

— des essais de performance pour l'assurance qualité des milieux de culture et la membrane de transfert ont été ajoutés;

— pour améliorer la sécurité de l'utilisateur, le solvant diméthylsulfoxyde (DMSO) n'est plus recommandé pour dissoudre le substrat chromogénique (BCIG);

— la composition de la gélose au glutamate modifiée (MMGA) a été corrigée (0,024 g d'acide aspartique et 0,02 g d'arginine) selon les valeurs de la formulation originale[12].

Une liste de toutes les parties de la série ISO 16649 est disponible sur le site Internet de l'ISO.

 © ISO 2018 – Tous droits réservés

Introduction

En raison de la diversité des produits alimentaires, il est possible que la présente méthode horizontale ne soit pas applicable dans tous ses détails à certains d'entre eux. Dans ce cas, des méthodes différentes, spécifiques à ces produits, pourront être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, il convient que tous les efforts soient faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible.

Les principales modifications énumérées dans l'avant-propos, introduites dans le présent document par rapport à l'ISO 16649-1:2001, sont considérées comme mineures (voir l'ISO 17468[5]).

Lors du prochain réexamen périodique du présent document, il sera tenu compte de toutes les évolutions intervenues depuis sa publication et, notamment, dans quelle mesure la présente méthode horizontale aura été suivie ainsi que les raisons des dérogations dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation de toutes les méthodes d'essai ne peut être réalisée de façon immédiate; de ce fait, il peut déjà exister des Normes internationales et/ou nationales pour certains groupes de produits, qui ne concordent pas avec la présente méthode horizontale. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner sur le présent document et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

Il existe tois méthodes horizontales (ISO 16649-1, ISO 16649-2 et ISO 16649-3) permettant de dénombrer les *Escherichia coli* β-glucuronidase positive[3][4].

L'utilisateur peut choisir aussi bien l'ISO 16649-1 que l'ISO 16649-2 ou que l'ISO 16649-3. Toutes les parties sont d'application générale. Toutefois, il est recommandé d'utiliser l'ISO 16649-1 ou l'ISO 16649-3, qui incluent toutes deux une étape de revivification, pour les produits susceptibles de contenir des cellules ayant subi des dommages sublétaux en raison des propriétés associées à l'aliment ou des conditions de traitement.

© ISO 2018 – Tous droits réservés

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive —

Partie 1: Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D glucuronide

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β-glucuronidase-positive par la technique de comptage des colonies après revivification au moyen de membranes et incubation à 44 °C sur un milieu solide contenant un substrat chromogénique pour la détection de l'enzyme β-glucuronidase.[9][10][13][14][17][18][19][20] Elle est applicable:

— aux produits destinés à la consommation humaine,

— aux produits destinés à l'alimentation animale,

— aux échantillons d'environnement pour la production et la distribution des aliments, et

— aux échantillons d'aliments au stade de production primaire tels que les matières fécales d'animaux, la poussière et les écouvillons.

AVERTISSEMENT — Certaines souches d'*Escherichia coli* se développent peu ou pas du tout dans un milieu incubé à 44 °C, notamment les souches d'*E. coli* O157:H7 et O157:H$^-$. De plus, certaines souches d'*Escherichia coli*, notamment celles appartenant au sérotype O157:H7, sont en majorité β-glucuronidase négative.[11] Par conséquent, des souches d'*Escherichia coli*, notamment certaines souches pathogènes, ne seront pas détectées par la présente méthode. D'autres entérobactéries, notamment *Shigella*[15] et *Salmonella*,[16] peuvent également exprimer une activité β-glucuronidase à 44 °C.

2 Références normatives

Les documents suivants sont référencés dans le texte de telle 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 pour les examens microbiologiques*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

© ISO 2018 – Tous droits réservés

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 (OBP): disponible à l'adresse https://www.iso.org/obp

3.1
***Escherichia coli* β-glucuronidase positive**
bactérie qui, à 44 °C, forme des colonies bleues ou bleu-vert caractéristiques sur la gélose tryptone-bile-X-glucuronide (TBX), dans les conditions spécifiées dans le présent document

3.2
dénombrement des *Escherichia coli* β-glucuronidase positive
détermination du nombre d'unités formant colonie (UFC) d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive (3.1), par gramme d'échantillon, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif de prélèvement, lorsque l'analyse est effectuée conformément au présent document

4 Principe

4.1 Prise d'essai, suspension mère, dilutions et étape de revivification

Ensemencement d'une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai, de la suspension mère ou de dilutions décimales, sur des membranes de cellulose posées sur la gélose au glutamate modifiée (MMGA), puis incubation à 37 °C pendant 4 h[13][14].

4.2 Culture en milieu sélectif

À l'issue de l'étape de revivification, transfert des membranes de la gélose MMGA sur la gélose tryptone-bile-glucuronide (TBX), puis incubation à 44 °C pendant 20 h à 24 h.

4.3 Calcul

Calcul du nombre d'UFC d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies caractéristiques bleues ou bleu-vert par boîte.

5 Milieux de culture et réactifs

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218 et l'ISO 11133.

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 et la membrane de transfert, voir l'ISO 11133 et l'Annexe A.

6 Matériel et consommables

Un matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont appropriées.

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

© ISO 2018 – Tous droits réservés