



PROCOLE

**ANALYSE
MICROBIOLOGIQUE
DANS LE SECTEUR
DE L'INDUSTRIE
ALIMENTAIRE**

Quelle importance ont les méthodes de référence dans le contrôle des aliments ?

De nombreux aliments n'ayant pas été soumis à une analyse microbiologique deviennent un risque pour la santé, car ils peuvent causer un large éventail de maladies. Les maladies diarrhéiques, par exemple, sont la première cause de décès chez les enfants et la seconde chez les adultes, et dans de nombreux cas, ils sont liés à la consommation d'un aliment contaminé. C'est pourquoi il est nécessaire d'établir des critères microbiologiques pour assurer la sécurité des aliments et protéger la santé des consommateurs.

L'élaboration de critères pour le contrôle microbiologique des aliments implique, entre autres, de déterminer la méthode analytique à utiliser pour garantir le respect de ces critères.

Ces méthodes, développées par des organisations telles que l'ISO ou le CEN, peuvent être considérées comme méthodes de référence, et leur mise en œuvre et leur application en laboratoire peuvent souvent être difficiles.

Actuellement, la stratégie de développement et de mise à jour de ces méthodes ISO vise à les améliorer par la simplification et l'incorporation de nouvelles technologies, afin qu'elles puissent être utilisées de manière routinière dans les laboratoires de contrôle des aliments.



L'utilisation de méthodes normalisées pour la réalisation d'analyses microbiologiques est un outil qui permet aux laboratoires d'utiliser des méthodes de tests reconnues internationalement, contribuant ainsi à la production de résultats comparables, sans sacrifier leur fiabilité et en assurant la qualité et la sécurité des aliments soumis au contrôle.

C'est pourquoi il est de plus en plus courant que ces méthodes normalisées soient utilisées comme référence par les organismes d'accréditation ainsi que pour les critères microbiologiques (règlements de l'UE 2073/2005 et 1441/2007) dans lesquels les standards internationaux élaborés par les comités ISO et CEN sont considérés comme des méthodes de référence.

Chez CondaLab, nous voulons aider les différents laboratoires de contrôle qualité en leur proposant une gamme complète de milieu de culture sous des formulations ISO pour répondre à leurs différentes procédures d'analyse.



Index

DÉNOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES MÉSOPHILES _____	05
Procédure définie selon la norme ISO 4883 :2013	
DÉNOMBREMENT DES LEVURES ET MOISSURES _____	06
Procédure définie selon la norme ISO 21527 :2008	
DÉTECTION DES SALMONELLA SPP. _____	07
Procédure définie selon la norme ISO 6579 :2017	
DÉTECTION ET DÉNOMBREMENT DES LISTERIA SPP. _____	09
Procédure définie selon la norme ISO 11290 :2017	
DÉTECTION ET DÉNOMBREMENT DES CAMPYLOBACTER SPP. _____	11
Procédure définie selon la norme ISO 10272 :201	
DÉTECTION DES CRONOBACTER SPP. _____	13
Procédure définie selon la norme ISO 22964 :2017	
DÉNOMBREMENT PRÉSOMPTIF DES BACILLUS CEREUS _____	14
Procédure définie selon la norme ISO 7932 :2004	
DÉTECTION ET DÉNOMBREMENT DES ENTÉROBACTÉRIES _____	15
Procédure définie selon la norme ISO 21528 :2017	
DÉNOMBREMENT DES CLOSTRIDIUM PERFRINGENS _____	16
Procédure définie selon la norme ISO 7937 :2004	

**DÉTECTION ET DÉNOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES
À COAGULASE POSITIVE** _____ **17**

Procédure définie selon la norme ISO 6888

**DÉTECTION DES YERSINIA ENTEROCOLITICA
PATHOGÈNES** _____ **19**

Procédure définie selon la norme ISO 10273 :2017

**DÉTECTION ET DÉNOMBREMENT
DES SHIGELLA SPP.** _____ **20**

Procédure définie selon la norme ISO 21567 :2004

**DÉTECTION ET DÉNOMBREMENT
DES ESCHERICHIA COLI** _____ **21**

Procédure définie selon la norme ISO 7251 :2005 / ISO 16649 :2015

DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES TOTAUX _____ **23**

Procédure définie selon la norme ISO 4832 :2006

DÉTECTION DE ESCHERICHIA COLI 0157 _____ **24**

Procédure définie selon la norme ISO 16654 :2001

DÉTECTION DES VIBRIO SPP. _____ **25**

Procédure définie selon la norme ISO 21872 :2007

**DÉTECTION ET DÉNOMBREMENT D'AUTRES
MICRO-ORGANISMES DANS L'INDUSTRIE
ALIMENTAIRE** _____ **26**

Procédure définie selon les normes ISO 15213 :2003 / ISO 13720 :2010 /
ISO 6611 :2004 / ISO 15214 :1998

Dénombrement des micro-organismes mésophiles

Procédure définie selon la norme ISO 4833 :2013

Introduction

Les bactéries sont considérées comme la principale cause de maladies, maladies dont l'origine est la consommation d'aliments contaminés. Lorsque les aliments présentent des variations de texture ou de consistance ou un changement de couleur, c'est un signe de détérioration et de contamination possible. Pour se multiplier, les bactéries ont besoin de :

- Nutriments tels que le carbone, l'azote, l'hydrogène et le phosphore (entre autres) qui sont disponibles dans la nourriture.
- L'eau en tant qu'élément fondamental, car si absente, la croissance bactérienne s'arrête.
- Un pH approprié, oscillant autour d'une valeur neutre (6-7). À pH bas ou élevé, la croissance bactérienne s'arrête.

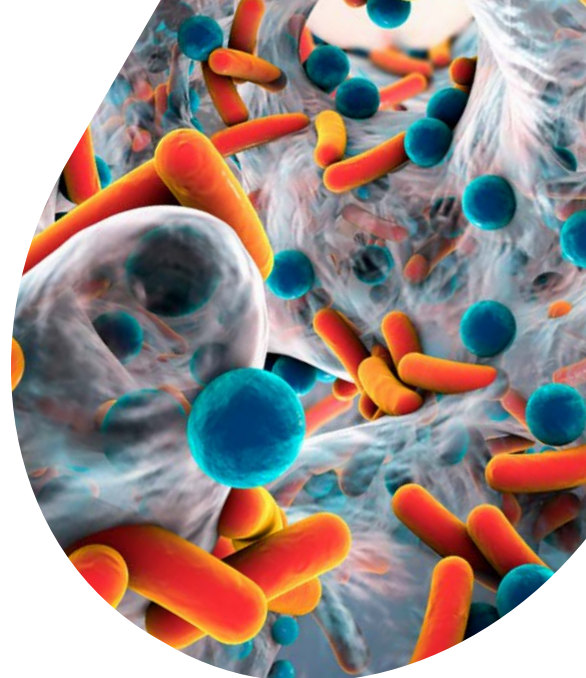
L'analyse de ce groupe de bactéries inclut tous les micro-organismes capables de se développer en présence d'oxygène à une température comprise entre 20°C et 45°C. Le dénombrement de micro-organismes mésophiles aérobies micro-organismes, dans les conditions établies, estime la microflore totale du produit mais sans spécifier et identifier le type de micro-organisme.

Bibliographie

AFSA, 2001. Évaluation des méthodes microbiologiques pour la détection et le dénombrement des contaminants microbiologiques dans les aliments. Rapport final contrat SMT4 / CT96 2098. Coordination par l'Agence française de sécurité sanitaire des Aliments. AFSSA, France, février 2001.

ISO 4833-1: 2013. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes. Partie 1 : Nombre de colonies à 30 degrés C par la technique d'ensemencement en masse.

ISO 4833-2: 2013. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes. Partie 2 : Nombre de colonies à 30 degrés C par la technique d'ensemencement en surface.



Méthode

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 6887-1 spécifique au produit analysé.

MILIEU DE DÉNOMBREMENT

1 ml d'échantillon dilué dans de la gélose PCA (REF. 777392) - Incubation : 30 °C ± 1 °C // 72 ± 3 h

Pour l'analyse des produits laitiers, le milieu de culture doit contenir 1 g / l de lait écrémé en poudre : Agar PCA avec lait en poudre (REF. 777393)

NOTE: *Pour cette norme, deux méthodes peuvent être distinguées : les techniques d'ensemencement en masse (4833-1) et d'ensemencement en surface (4833-2). Les deux sections de la norme établissent le même protocole de travail mais avertissent que, pour certaines matrices, des résultats

Dénombrement des levures et moisissures

Procédure définie selon la norme ISO 21527 1: 2008

Introduction

Les aliments qui ont des champignons à leur surface peuvent contenir des toxines, constituant un risque de réactions allergiques. Quand les champignons apparaissent à la surface d'un aliment, le mycélium a déjà envahi une partie importante du produit. Les champignons vivent sur des matières végétales ou animales et contiennent des spores qui peuvent être transportées par l'air, l'eau ou les insectes.

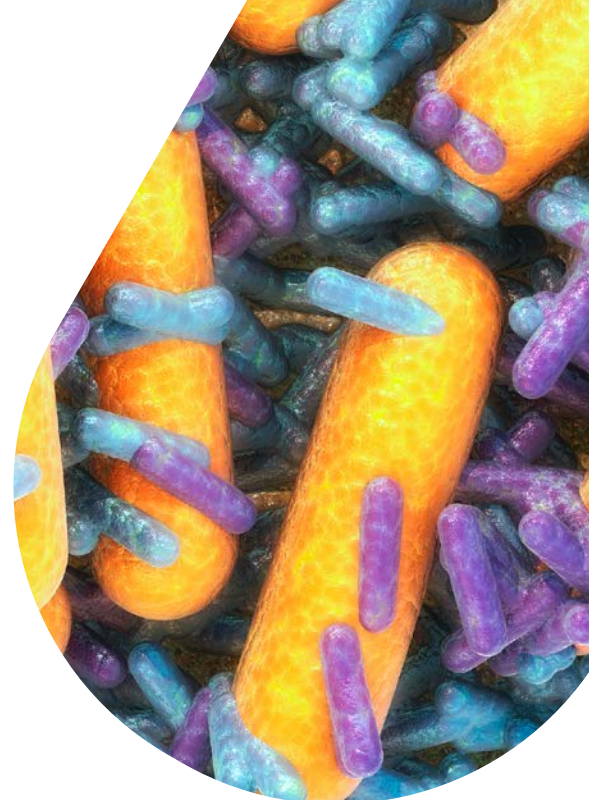
Les champignons se trouvent principalement dans les aliments tels que les fruits, les légumes, le pain de mie ou les fromages. Différents types peuvent être distingués en fonction de leur comportement. *Aspergillus* ou *Penicillium* sont parmi les champignons les plus fréquemment rencontrés. Les filaments dans leur structure, les hyphes, produisent des enzymes capables de décomposer les molécules les plus dures. Dans des conditions appropriées (température chaude et humidité élevée), les champignons produisent des mycotoxines, substances pouvant causer des maladies et qui apparaissent principalement dans les céréales et les noix.

Bibliographie

VALERIE T., MICHAEL T.S., PHILIP B., MISLIVEC, HERBERT A.K. ET RUTH B. BAM : levure, moisissures et mycotoxines. US ADMINISTRATION DES ALIMENTS ET DROGUES.

ISO 21527-1: 2008. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour l'énumération de levure et de moisissures. Partie 1 : Technique de comptage des colonies dans les produits avec activité de l'eau supérieure à 0,95.

ISO 21527-2: 2008. Microbiologie de la chaîne alimentaire – horizontale méthode de dénombrement de la levure et des moisissures. Partie 1 : Nombre de colonies technique dans les produits dont l'activité de l'eau est inférieure ou égale à 0,95.



PRODUITS DONT L'AW EST > 0,95 (ISO 21527-1)

SUSPENSION INITIALE

Excepté pour la préparation d'échantillons spécifiques (ISO 6887-1), une dilution dans de l'eau peptonée tamponnée (REF. 777208) est recommandée.

MILIEU DE DÉNOMBREMENT

0,1 ml d'échantillon dilué dans de la gélose DRBC (REF. 777363) – Incubation : 25 °C ± 1 °C // 5 jours

PRODUITS AVEC UNE AW ≤ 0,95 (ISO 21527-2)

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 6887-1 spécifique au produit à analyser. Excepté pour la préparation d'échantillons spécifiques, une dilution dans de l'eau peptonée tamponnée (REF. 1402) est recommandée.

MILIEU DE DÉNOMBREMENT

0,1 ml d'échantillon dilué dans de l'agar DG-18 (REF. 777237) + 175 ml de glycérol. Incubation : 25 °C ± 1 °C / 5 - 7 jours.

Détection des *Salmonella* spp.

Procédure définie selon la norme ISO 6579 :2017

Introduction

Salmonella spp. est une famille de micro-organismes très diversifiée, comprenant environ 2 300 sérotypes différents. On estime que cette famille de bactéries est la cause de millions d'hospitalisations dans le monde (1,2 million aux États-Unis seulement), mais ce nombre pourrait être multiplié par 30 si les infections non diagnostiquées étaient prises en compte, car elles causent généralement une diarrhée aiguë classique.

Ce groupe de bactéries est à coloration de Gram négative (puisqu'elles appartiennent au grand groupe des entérobactéries), anaérobie facultative et mobile au moyen de la flagelle. Ils peuvent fermenter le glucose mais pas le lactose et ne produisent pas d'uréase.

La salmonelle est présente dans les intestins des humains et des animaux, ainsi que dans la viande crue, la volaille, les œufs et le lait non pasteurisé. La température optimale pour la croissance de cette bactérie se situe entre 30 et 37°C ; par conséquent, il est particulièrement important d'adopter des mesures préventives pendant les mois les plus chauds de l'année, lorsque le risque augmente considérablement.

Bibliographie

AFSA, 2001. Évaluation des méthodes microbiologiques de détection et de dénombrement des contaminants microbiologiques dans les aliments. Rapport final Contrat SMT4 / CT96 2098. Coordination par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. AFSSA, France, février 2001.

ISO 6579-1: 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détection, le dénombrement et le sérotypage de *Salmonella* - Partie 1 : Détection de *Salmonella* spp.

ISO 6887-1: 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation au test échantillons, suspension initiale et dilutions décimales pour microbiologie examen - Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la première suspension et dilutions décimales.



Méthode

PRE-ENRICHISSEMENT

25 g d'échantillon + 225 ml d'eau peptonée tamponnée (REF. 777208). Incubation : de 34 °C à 38 °C - 18 ± 2 h

Pour les échantillons environnementaux de la phase de production primaire ou de fèces, étaler directement sur Agar MSRV

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF

0,1 ml + 10 ml de bouillon Rappaport Vassiliadis (REF. 777357) ou la gélose MSRV (REF. 777319)
Incubation : 41,5 °C ± 1 °C - 24 ± 3 h

Avertissement :
lors de l'incubation de la plaque MSRV, ne pas inverser la plaque.

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF

1 ml + 10 ml de bouillon MKTTn (REF. 777324) Incubation : 37 °C ± 1 °C - 24 ± 3 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

XLD Agar (REF. 777440)
Incubation : 41.5 °C ± 1 °C - 24 ± 3 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

Comme milieu de culture secondaire, sélectionnez parmi les options suivantes :

- Gélose Salmonella-Shigella (REF. 777378)
- Agar Hektoen (REF. 777263)
- Gélose Vert Brillant (REF. 777199)
- Gélose au bismuth au sulfite (REF. 777192)
- Gélose chromogénique à Salmonella (REF. 777376)

Pour la lecture des résultats et la sélection des colonies suspectes, voir la fiche technique de chaque produit. Ensuite, sélectionnez une seule colonie suspecte pour propagation en milieu de culture non sélectif. Si le résultat est négatif, tester 4 colonies suspectes précédemment marquées.

ISOLEMENT EN AGAR NON SÉLECTIF

Gélose nutritive (REF. 777328) ou gélose nutritive enrichie en NaCl (REF. 777331) – Incubation : 34-38 °C - 24 ± 3 h

CONFIRMATION

Effectuer un test biochimique et sérologique sur les colonies cultivées dans la gélose non sélective.

L'essai biochimique comprendra :

- Gélose STI (REF. 777407)
- Gélose à l'urée de Christensen (REF. 777889)
- Décarboxylase Lysine (REF. 777295)
- β-galactosidase (facultatif)
- réaction indole (facultatif)

NOTE:

*Selon l'Annexe D de la norme ISO 6579-1: 2017, la procédure pour la détection des sous-espèces entériques (S. typhi et S. paratyphi) devrait être comme suit:

- 1.- Ajouter du bouillon de sélénite et de cystine (REF. 777385) comme enrichissement sélectif
- 2.- En tant que milieu secondaire sélectif, sélectionnez Bismuth Sulphite (REF. 777192)

Détection et dénombrement de *Listeria* spp.

Procédure définie selon la norme ISO 11290 :2017

Introduction

Les bactéries du genre *Listeria* sont à coloration de Gram positive. C'est un genre composé de seulement 6 espèces, dont *Listeria monocytogenes* est le plus important puisque c'est une espèce pathogène qui peut être présente dans les aliments consommés par les humains.

L. monocytogenes provoque la listériose (intoxication alimentaire avec un taux de mortalité proche de 30%). Ces bactéries sont de très petite taille, catalase positive et non sporulantes. Elles sont anaérobies facultatives, capables de croître dans une large plage de températures (1°C à 45°C) et dans des concentrations en sel élevées. En outre, il s'agit d'un micro-organisme flagellé et, en tant que tel, mobile, ce qui augmente encore son pouvoir pathogène.

Le micro-organisme est largement répandu dans la nature et il est très courant de le trouver dans les installations transformant les aliments, où sa capacité de survie dans une si large plage de températures en fait peut-être l'un des micro-organismes clés à contrôler dans l'industrie.

Bibliographie :

KATHARIOUS S. *Listeria monocytogenes* virulence et pathogénicité, perspective de la sécurité alimentaire. J. Food Prot. 2002; 65: 1881-1829.

ISO 11290-1. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale de détection et de dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. - Partie 1 : Méthode de détection.

ISO 11290-2. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détection et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. - Partie 2 : Méthode de dénombrement.



1 - MÉTHODE DE DÉTECTION (ISO 11290-1)

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF PRIMAIRE

Échantillon de 25 g / ml + 225 ml de base de bouillon Listeria Fraser demi (REF. 777852+ REF. 777782) / Incubation : 30 °C ± 1 °C - 24 + 2 h

Vous pourriez alors aller directement vous épancre directement sur la gélose sélective ALOA sans enrichissement sélectif secondaire

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF SECONDAIRE

0,1 ml de culture primaire + 10 ml de base de bouillon Listeria Fraser (REF. 777547 + REF. 777782) / Incubation : 37 °C ± 1 °C - 24 ± 2 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

ALOA Agar (REF. 777289) et Suppléments (777790 + 777789) / Incubation : 37 °C ± 1 °C - 24/48 ± 2 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

Comme milieu de culture secondaire, sélectionnez parmi les options suivantes : Agar Palcam (REF. 777286 + 777793) Oxford Agar (REF. 777288 + 777794)

Lecture de colonies suspectes de Listeria monocytogenes dans la gélose ALOA : colonies bleu-vert avec un halo opaque (considérez également celles sans halo pour Listeria spp.). Pour la lecture de colonies dans l'agar secondaire, les températures et les temps d'incubation, se reporter aux fiches techniques correspondantes.

ISOLEMENT SUR GELOSE NON SÉLECTIVE

Gélose nutritive (REF. 777328), gélose nutritive enrichie en NaCl (REF. 777331), Gélose au sang (REF. 777823), gélose TSYE (REF. 777416) ou bouillon TSYE (REF. 777417) / Incubation : selon spécification. Se référer à la fiche technique correspondante. Choisir entre :

CONFIRMATION POUR L. MONOCYTOGENES

- Microscopie
- Activité hémolytique - Gélose au sang (REF. 777823)
- Utilisation des glucides (REF. 778419)
- Catalase (optionnel)
- Motilité (facultatif)
- Test CAMP (facultatif)

CONFIRMATION POUR LISTERIA SPP.

- Microscopie
- Catalase
- Motilité (facultatif)
- Réaction de Voges-Proskauer (optionnel)

2 - MÉTHODE DE DÉNOMBREMENT (ISO 11290-2)

SUSPENSION INITIALE

x g / ml d'échantillon + 9 x g / ml de diluant selon la norme ISO 6887

Dans le cas où l'énumération est effectuée sur le même échantillon que le détection, bouillon Fraser demi (REF. 777852) et bouillon Fraser (REF. 777547) doit être utilisé dans les mêmes proportions que celles indiquées ci-dessus

ISOLEMENT SÉLECTIF

ALOA Agar (REF. 777289) et suppléments (REF. 777790 + REF. 777789) / Incubation : 37 °C ± 1 °C

Listeria monocytogenes suspecte la lecture de colonies dans la gélose ALOA : bleu verdâtre avec un halo opaque (considérez également ceux sans halo pour Listeria spp.)

ISOLEMENT EN AGAR NON SÉLECTIF

Choisir entre : Blood Agar (REF. 777823) ou TSYE Agar (REF. 777416) – Incubation : 37 °C ± 1

CONFIRMATION POUR L. MONOCYTOGENES

- Microscopie
- Activité hémolytique - Gélose au sang (REF. 777823)
- Utilisation des glucides (REF. 778419)
- Catalase (optionnel)
- Motilité (facultatif)
- Test CAMP (facultatif)

CONFIRMATION POUR LISTERIA SPP.

- Microscopie
- Catalase
- Motilité (facultatif)
- Réaction de Voges-Proskauer (optionnel)

Détection et dénombrement des *Campylobacter* spp.

Procédure définie selon la norme ISO 10272 :2017

Introduction

Les micro-organismes du genre *Campylobacter* sont des bacilles microaérophiles à coloration de Gram négative, en forme de virgule ou de spirale incurvée, mobiles au moyen d'un flagelle unipolaire ou bipolaire.

Ce sont des bactéries thermophiles ayant une croissance optimale à des températures comprises entre 42 et 43°C. De plus, ils sont la cause la plus fréquente de gastro-entérite chez l'homme.

L'Organisation mondiale de la santé (OMS 2011) considère que *Campylobacter* est l'une des principales causes de maladies diarrhéiques transmises par les aliments au niveau mondial. La majorité des cas de campylobactériose sont associés à la consommation d'aliments, principalement de volaille ; par conséquent, ces bactéries représentent une priorité absolue en matière de sécurité alimentaire.

Bibliographie

AESAN (2012). Rapport du Comité scientifique de l'Agence espagnole de sécurité alimentaire et de la nutrition (AESAN) concernant les mesures de contrôle visant à réduire la présence de *Campylobacter* spp. dans la viande fraîche de volaille (poulet). Journal du Comité scientifique, n° 16 : 21-55.

OMS (2011) *Campylobacter*. Note descriptive no. 255. Octobre 2011

UNE-EN-ISO 10272-1: 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire – horizontale Méthode de détection et de dénombrement de *Campylobacter* spp. Partie 1: Détection Méthode.

UNE-EN-ISO 10272-2: 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire – horizontale Méthode de détection et de dénombrement de *Campylobacter* spp. Partie 2: Colonie Compter Technique.

1 - DÉTECTION PAR ENRICHISSEMENT : échantillons à faible concentration de campylobacter et faible niveau de concentration en microflore totale (par exemple, produits cuits ou congelés)

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF

10 ml / g d'échantillon + 90 ml de bouillon Bolton (REF. 778417+ REF. 778418).
Incubation en atmosphère micro-aérobie : 37 °C - 4 h / 6 h puis 41,5 °C - 44 h ± 2 h

ISOLEMENT DE PRÉSUMPTION

Gélose *Campylobacter* CCDA (REF. 777213 + REF. 777776) - Incubation en atmosphère micro-aérobie : 41,5 °C - 44 h ± 2 h

A son tour, propagation en milieu sélectif secondaire dans les mêmes conditions comme incubation. Preston Agar est l'un des supports de culture conformes à l'ISO. (REF. 777214 + REF. 777798)

LECTURE DES RÉSULTATS

Les colonies typiques apparaissent grisâtres et présentent souvent un ton métallique brillant. Elles sont généralement plates avec un aspect humide et ont tendance à diffuser. D'autres morphologies peuvent aussi être présentes.

CONFIRMATION

Effectuez les opérations suivantes sur les colonies suspectes cultivées dans de la gélose CCDA :

- Épandage dans la base de gélose Columbia + gélose au sang (REF. 777223) - Incubation en atmosphère micro-aérobie à 41,5 °C - 24/48 h
- Examen de la morphologie et de la motilité au microscope : motile, gonflé et bacilles incurvés
- Etude de la croissance aérobie à 25 °C : croissance négative chez Columbia Agar (REF. 777223) en conditions aérobies pendant 44 ± 4 h
- Activité oxydase (+)

2 - DÉTECTION PAR ENRICHISSEMENT : échantillons à faible concentrations de *Campylobacter* et haut taux de micro-flore totale (par exemple viande ou lait cru)

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF

10 ml / g d'échantillon + 90 ml de bouillon Preston (REF. 778550+ REF. 778551) - Incubation en atmosphère micro-aérobie : 41,5 °C - 44 h ± 2 h

ISOLEMENT DE PRÉSUMPTION

Gélose *Campylobacter* CCDA (REF. 777213 + REF. 777776) - Incubation en atmosphère micro-aérobie : 41,5 °C - 44 h ± 2 h

LECTURE DES RÉSULTATS

Les colonies typiques apparaissent grisâtres et présentent souvent un ton métallique brillant. Elles sont généralement plates avec un aspect humide et ont tendance à disséminer. D'autres morphologies pourraient aussi être présentes

CONFIRMATION

Exécutez ce qui suit sur les colonies suspectes cultivées dans l'agar CCDA :

- Épandage dans la base de gélose Columbia + gélose au sang (REF. 777223) - Incubation en atmosphère micro-aérobie à 41,5 °C - 24/48 h
- Examen de la morphologie et de la motilité au microscope : Bacilles motiles, flagellés et incurvés
- Etude de la croissance aérobie à 25 °C : croissance négative chez Columbia Agar (REF. 777223) en conditions aérobies pendant 44 ± 4 h
- Activité oxydase (+)

3 - DÉTECTION PAR PROPAGATION DIRECTE : échantillons avec une concentration élevée de *Campylobacter* (ex. fèces, volaille crue)

ISOLEMENT DE PRÉSUMPTION

Gélose *Campylobacter* CCDA (REF. 777213 + REF. 777776) - Incubation en atmosphère micro-aérobie : 41,5 °C - 44 h ± 2 h

A son tour, propagation en milieu sélectif secondaire sous les mêmes conditions d'incubation. Un des milieux de culture conformes à l'ISO est l'agar Preston (REF. 777214 + REF. 777798)

LECTURE DES RÉSULTATS

Les colonies typiques apparaissent grisâtres et présentent souvent un ton métallique brillant. Elles sont généralement plates avec un aspect humide et ont tendance à disséminer. D'autres morphologies pourraient aussi être présentes.

CONFIRMATION

Exécutez ce qui suit sur les colonies suspectes cultivées dans l'agar CCDA :

- Épandage dans la gélose de base Columbia + gélose au sang (REF. 777223) - Incubation en atmosphère micro-aérobie à 41,5 °C - 24/48 h
- Examen de la morphologie et de la motilité au microscope : Bacilles motiles, flagellés et incurvés
- Etude de la croissance aérobie à 25 °C : croissance négative en gélose Columbia (REF. 777223) dans des conditions aérobies pendant 44 ± 4 h
- Activité oxydase (+)





Détection des *Cronobacter* spp.

Procédure définie selon la norme ISO 22964 :2017

Introduction

Les bactéries appartenant au genre *Cronobacter* sont à coloration de Gram négative, anaérobies facultatives, bacilles oxydase négatif et catalase positif. Elles sont généralement mobiles et ont la capacité de produire une variété d'acides provenant de multiples glucides. Cet attribut est utilisé lors des étapes de confirmation.

Le type le plus connu de ce genre est le *Cronobacter sakazakii*. Ce type est considéré de nos jours comme un agent pathogène émergent responsable de méningites graves chez les nourrissons entraînant une mortalité comprise entre 40 et 80 %.

Méthode

SUSPENSION INITIALE

- 10 ml / g d'échantillon + 90 ml d'eau peptonée tamponnée (REF. 777208) – Incubation : 38 °C - 24 ± 2 h

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF

- 0,1 ml d'échantillon pré-enrichi + 10 ml de CSB (REF. 778552) – Incubation : 41,5 °C - 24 ± 2 h

ISOLATION SÉLECTIVE PRÉSOMPTIVE

- Agar CCI (REF. 777838) / Incubation : 41,5 °C - 24 ± 2 h

LECTURE DES RÉSULTATS

- Les colonies suspectes de *Cronobacter sakazakii* sont de petite taille (1-3 mm) montrant une couleur bleue ou bleu verdâtre

Les colonies blanches, blanches avec un centre vert, grises ou noires, ainsi que les colonies pigmentées jaune ou rouge, ne sont pas du genre *Cronobacter*

ISOLEMENT EN AGAR NON SÉLECTIF

- Stries dans la gélose TSA (REF. 777410) – Incubation : 34-38 °C - 21 ± 3 h

CONFIRMATION BIOCHIMIQUE

- Dosage de l'oxydase (-)
- Dosage de l'enzyme α -glucosidase
- Bouillon Décarboxylase Lysine (REF. 777294)
- Milieu d'ornithine décarboxylase (REF. 778455)
- Milieu de fermentation des glucides
- Rouge méthylique (facultatif)
- Voges-Proskauer (facultatif)

Bibliographie

Fiedemann M., Enterobacter sakazakii dans les aliments et boissons (autres que préparations pour nourrissons et lait en poudre). Int. J. Food Microbiol. 2007 ; 116 : 1-10.

ISO 22964: 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire. Méthode horizontale pour la détection de *Cronobacter* spp.

Centre de contrôle et de prévention des maladies. Enterobacter sakazakii infections associées à l'utilisation de préparations lactées pour nourrissons. JAMA, 2002 ; 287 : 2204 - 2205.

Dénombrement présomptif de *Bacillus cereus*

Procédure définie selon la norme ISO 7932 :2004

Introduction

Bacillus cereus est un anaérobie facultatif, bacille à coloration de Gram positive, formant des spores non déformants. Il est également catalase positif et fermente le glucose, le saccharose, la salicine et le glycérol. De plus, il produit de la lécithinase qui peut être utilisé comme un marqueur pour établir sa présence.

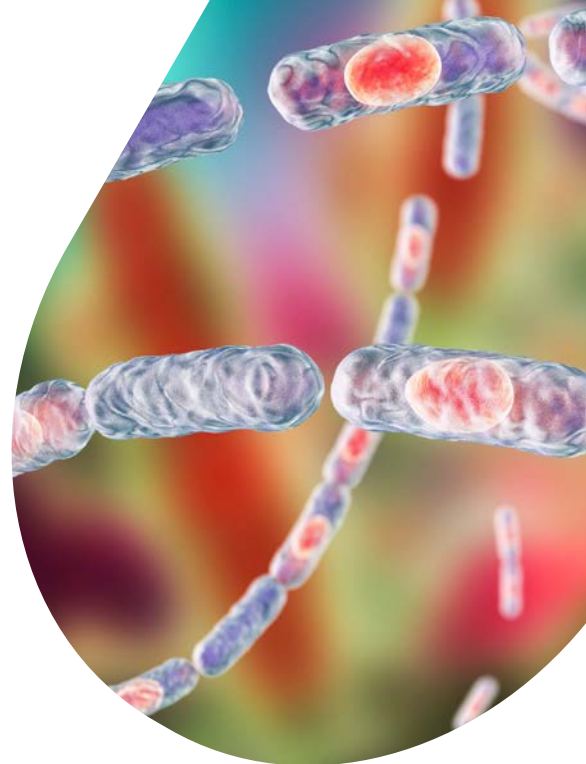
Ce micro-organisme est largement répandu et peut être trouvé dans divers aliments, principalement dans les produits déshydratés tels que les biscuits, les soupes, les céréales et le thé. Il se développe dans une large plage de températures, ce qui rend ces bactéries très résistantes à la transformation des aliments. Si nous ajoutons à ces caractéristiques, leur capacité à former des spores, ces bactéries deviennent critiques dans l'industrie alimentaire.

Bibliographie

MOSSELI, D.A.A. KOOPMAN, M.J, JONGERIUS, E. Dénombrement de *Bacillus cereus* dans les aliments. 1967. Appli. Micobiol., 1 5; 650-653.

ISO 7932: 2014. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour dénombrement de *Bacillus cereus* présumé. Technique de comptage des colonies à 30 ° C.

ISO 6887-1: 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation au test échantillons, suspension initiale et dilutions décimales pour l'examen microbiologique - Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension initiale et décimale dilutions.



Méthode

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 6887-1 spécifique au produit à analyser.

ISOLEMENT SÉLECTIF

Agar du PPCS (REF. 777822) et suppléments (REF. 77767 + REF. 77780) – Incubation : 30 °C // 18 - 48 h

Les colonies suspectes du présumé *Bacillus cereus* montrent une couleur rose et sont entourés par un précipité

Si les boîtes sont envahies et que des colonies bien isolées ne peuvent pas être sélectionnées, une purification dans la gélose sélective au MYP (REF. 1343) 5 colonies présomptives doivent être effectuées

CONFIRMATION

Activité hémolytique - Base de gélose au sang n ° 2 (REF. 777823) – Incubation : 30 °C // 24 ± 2 h

Détection et dénombrement des entérobactéries

Procédure définie selon la norme ISO 21528 :2017

Introduction

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend environ 30 types de genre formés par 100 différentes espèces bactériennes. Ce groupe est caractérisé pour être composé de bactéries à coloration de Gram négative principalement avec la morphologie d'un bacille, bien qu'on puisse également trouver des cocci et des formes pléomorphes. Les membres de ce groupe appartiennent au microbiote de l'intestin bien qu'ils puissent aussi être isolés dans d'autres organes humains, plantes, et animaux.

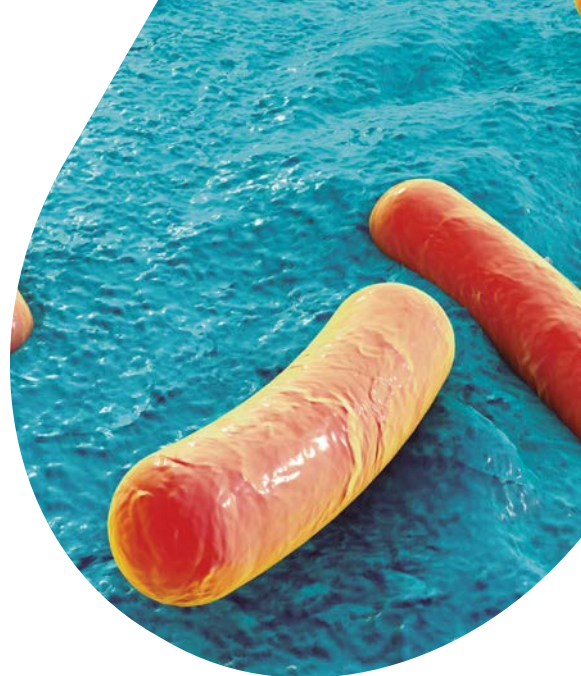
Le dénombrement total d'entérobactéries est utilisé comme marqueur de contamination fécale et de bonnes pratiques de fabrication. C'est donc un élément qui indique la qualité de ma transformation des produits alimentaires. Un nombre élevé de ce marqueur serait indicateur d'un mauvais procédé de fabrication ou d'une contamination ultérieure possible du produit final, impliquant un risque hygiénique et sanitaire pour le consommateur.

Bibliographie

MOSSELI, D.A.A. Milieu pour *Enterobacteriaceae*. 1985. Int. J. Food. Microbiol. 2 : 27-35.

ISO 21528-1: 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détection et dénombrement des *Enterobacteriaceae*. Partie 1 : Détection de *Enterobacteriaceae*.

ISO 21528-2: 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détection et dénombrement des *Enterobacteriaceae*. Partie 2 : Nombre de colonies technique.



Méthode

SUSPENSION INITIALE

- 10 ml / g d'échantillon + 90 ml d'eau peptonée tamponnée (REF. 777208) – Incubation : 38 °C - 18 ± 2 h

ISOLATION SÉLECTIVE PRÉSUMPTIVE

- Gélose VRBG (REF. 777431) / Incubation : 37 °C - 24 ± 2 h

LECTURE DES RÉSULTATS

- Les colonies suspectes d'*Enterobacteriaceae* présentent une couleur rose rougeâtre ou couleur pourpre et pourrait également montrer des halos de précipitation.

Si plus d'une morphologie de colonie est présente, sélectionnez-en une pour chaque type d'isolement non sélectif au stade suivant. Si les colonies attendues n'apparaissent pas, sélectionnez celles de couleur blanchâtre pour la confirmation

ISOLEMENT EN GÉLOSE NON SÉLECTIVE

- Strier en gélose nutritive enrichie en NaCl (REF. 777331) – Incubation : 37°C - 24 ± 2 h

CONFIRMATION

- Dosage de l'oxydase (-)
- Fermentation du glucose : tubes comprenant 1 cm de milieu de glucose OF. (REF. 778445) et création d'une atmosphère anaérobie avec de l'huile minérale stérile (+)

Dénombrement de *Clostridium* *perfringens*

Procédure définie selon la norme ISO 7937 :2004

Introduction

Clostridium perfringens est un bacille anaérobie à coloration de Gram positive, bien qu'il soit également aérotolérant dans certaines occasions. C'est également l'un des agents pathogènes bactériens les plus répandus dans l'atmosphère grâce à sa capacité à former des spores. On le trouve couramment dans la microflore intestinale de l'homme et de l'animal.

Ces bactéries peuvent être détectées dans une large gamme d'aliments crus à la suite d'une contamination des sols ou de la présence de matières fécales. On les trouve dans la viande crue, le poisson, les soupes et les sauces déshydratées, le lait, la gélatine, les pâtes, la farine, le soja, les légumes crus et les épices.

L'intoxication alimentaire causée par *C. perfringens* (en raison de la libération d'endotoxines) est généralement associée aux plats de viande cuits, à la volaille, aux aliments secs ou pré-cuits et, moins fréquemment, aux légumes. Dans le cas de souches résistant à la chaleur, la chaleur du processus de cuisson fournit le choc thermique nécessaire à l'activation et à la germination des spores. De plus, une telle cuisson réduit le niveau d'oxygène provenant et d'environnement optimal pour la croissance des cellules végétatives.

Bibliographie

ISO 7937: 2004. Microbiologie des aliments – Horizontal méthode de dénombrement de *Clostridium perfringens* - Comptage des colonies technique



Méthode

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 6887 ou 8261 appropriée pour le produit analysé.

ISOLEMENT SÉLECTIF

Gélose TSC (REF. 777424 + REF. 777524) - Incubation en anaérobiose : 37 °C - 20 ± 2 h

LECTURE DES RÉSULTATS

Sélectionnez un nombre inférieur à 150 colonies pour le compte

CONFIRMATION

Choisissez l'une des deux techniques décrites ci-dessous :

MÉTHODE A

Purification de colonies non requis :

- Milieu thioglycollate (REF. 777404) Incubation en anaérobiose 37 °C - 18/24 h
- Milieu sulfite de lactose (REF. 777279) Incubation en anaérobiose à 46 °C - 18/24 h

MÉTHODE B

- Nécessite des colonies caractéristiques bien isolées, sinon, répartissez 5 colonies caractéristiques en milieu thioglycollate (REF. 777404)
- Milieu Nitrate pour test motilité (REF. 777327) Incubation en anaérobiose 37 °C - 24 h
 - Milieu Lactose – Gélatine (REF. 777256) Incubation en anaérobiose à 46 °C 18 - 24 h

LECTURE DES RÉSULTATS

Ces colonies caractéristiques avec production de gaz et la présence d'un précipité noir sont considérées comme positives

LECTURE DES RÉSULTATS

Colonies non motiles, forte réduction du nitrate, fermenteurs de lactose et colonies liquéfiant la gélatine sont considérées comme positives.

Détection et dénombrement des staphylocoques à coagulase positive

Procédure définie selon la norme ISO 6888 :2003

Introduction

Les staphylocoques sont des cocci non motiles à coloration Gram positives, catalase-positives, qui se développent dans des conditions d'aérobiose. Le genre *Staphylococcus* comprend environ 30 espèces, parmi lesquelles se distinguent *S. aureus*, *S. saprophyticus* et *S. epidermidis*.

Le germe le plus pathogène d'entre eux est *Staphylococcus aureus*, qui cause généralement des infections cutanées, bien qu'il puisse aussi causer une pneumonie, une endocardite et une ostéomyélite. En général, ils sont associés à la formation d'abcès. Certaines souches produisent des toxines responsables de la gastro-entérite, du syndrome de la peau échaudée et du syndrome de choc toxique.

Une autre caractéristique qui augmente la pathogénicité des staphylocoques est leur capacité à coaguler le sang grâce à la production de coagulases. *S. aureus* coagulase positif est parmi les pathogènes les plus répandus et les plus dangereux pour l'homme, tant pour sa virulence que pour sa capacité à développer une résistance aux antibiotiques.

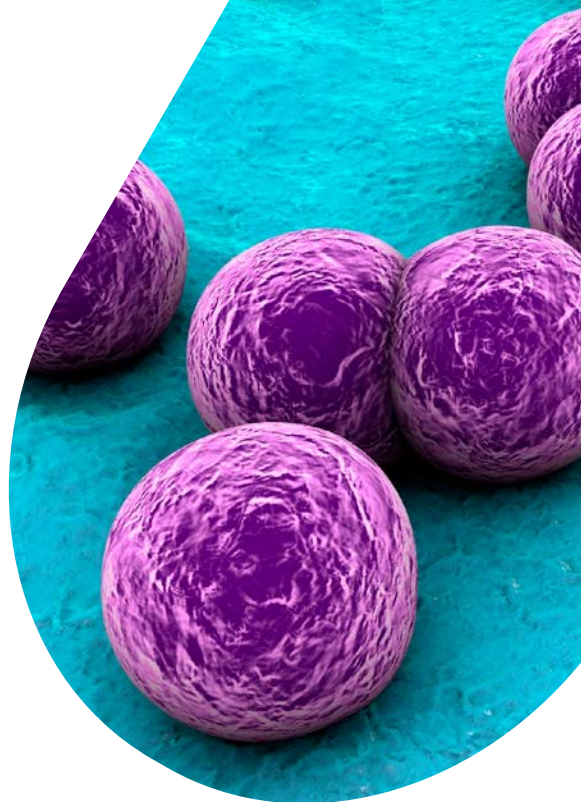
Cette omniprésence combinée à sa virulence, fait que sa détection dans les aliments est de la plus haute importance pour garantir la sécurité des consommateurs.

Bibliographie

ISO 6888-1: 1999. Microbiologie des denrées alimentaires et des aliments pour animaux - Méthode horizontale pour le dénombrement de la coagulase positive staphylocoques (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 1 : Technique utilisant le milieu gélosé Baird-Parker.

ISO 6888-2: 1999/2003. Microbiologie de l'alimentation et de l'alimentation animale - Méthode horizontale pour le dénombrement de la coagulase positive staphylocoques (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 2 : Technique utilisant un milieu de gélose de brinogène au plasma de lapin.

ISO 6888-3: 2003. Microbiologie des denrées alimentaires et des aliments pour animaux - Méthode horizontale pour le dénombrement de la coagulase positive staphylocoques (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 3 : Technique de détection et de MPN pour les petits nombres.



DÉNOMBREMENT : PROCÉDURE TELLE QUE DÉFINIE PAR L'ISO 6888-1

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 6887-1 appropriée pour le produit à analyser.

ISOLATION SÉLECTIVE PRÉSOMPTIVE

Gélose Baird Parker (REF. 777184 + REF. 777800) /
Incubation : 35 ou 37 °C - 24 ± 2 h
Réincubation après marquage des colonies caractéristiques :
35 ou 37 °C - 24 ± 2 h

LECTURE DES RÉSULTATS

Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes, entourées par une zone dégagée avec présence possible d'un anneau opalescent.

CONFIRMATION

- Étaler sur un bouillon d'infusion de cerveau et de cœur (REF. 777824) - Incubation à 35 ou 37 °C - 24 ± 2 h
- Test à la coagulase (+)

DÉNOMBREMENT : PROCÉDURE TELLE QUE DÉFINIE PAR L'ISO 6888-2**SUSPENSION INITIALE**

Reportez-vous à la norme ISO 6887-1 appropriée pour le produit à analyser.

ISOLEMENT SÉLECTIF

Gélose Baird Parker RPF (REF. 777185 + REF. 777523)
/ Incubation : 35 ou 37 °C - 24 ± 2 h
Réincubation après marquage des colonies caractéristiques : 35 ou 37 °C - 24 ± 2 h

LECTURE DES RÉSULTATS

Les colonies caractéristiques sont noires, grises ou blanches, entourées par un halo de précipitation indiquant une activité de la coagulase.

CONFIRMATION

Non requis, car l'activité de la coagulase est détectée avec RPF.

DÉTECTION ET NPP : PROCÉDURE TELLE QUE DÉFINIE PAR L'ISO 6888-3**SUSPENSION INITIALE**

Reportez-vous à la norme ISO 6887 ou 8261 appropriée pour le produit analysé.

ENRICHISSEMENT

0,1 ml de suspension initiale
+ 9 ml de Giolitti.
Bouillon Cantoni (REF. 777258)
Incubation : 37 °C - 24 ± 2 h

ENRICHISSEMENT

10 ml de suspension initiale +
10 ml de Giolitti Cantoni
Bouillon double concentration
(REF. 777258)
Incubation : 37 °C - 24 ± 2 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

Agar Baird Parker ((REF. 777184 + REF. 777800)
ou Agar Baird Parker + RPD (REF. 777185 + REF. 777523). Incubation : 37 °C - 24 ± 2 h et 48 ± 2 h

CONFIRMATION

La méthode Baird-Parker n'est utilisée que pour le décompte :

- Étaler le bouillon d'infusion cerveau-cœur (REF. 777824). - Incubation à 35 ou 37 °C - 24 ± 2 h
- Test à la coagulase (+)





Détection de pathogénique *Yersinia enterocolitica*

Procédure définie selon la norme ISO 10273 :2017

Introduction

Yersinia enterocolitica est une bactérie de type anaérobie facultative, à coloration de Gram négative, oxydase négative. Ce type de bactérie est capable de croître dans une large plage de températures (de -1 °C à 40 °C) et présente une capsule contenant des facteurs antiphagocytaires, augmentant ainsi son pouvoir pathogène.

Sa capacité à se multiplier dans les aliments à basse température, ainsi que dans les produits emballés sous vide, sont les principales raisons pour lesquelles il s'agit d'une préoccupation majeure dans l'industrie alimentaire. La majorité des éruptions détectées sont associées à la consommation de viande, de lait et de produits laitiers non pasteurisés.

Bien que de nombreux aliments d'origine animale puissent être porteurs de *Y. enterocolitica*, le bétail porcin est infecté plus que toute autre espèce animale.

Bibliographie

TENNANT S.H, GRANT T.H et ROBINS-BROWNE R.M. Pathogénicité de *Yersinia enterocolitica* biotype 1A.FEMS Immun. Microbiol médical. 2003, 38 pages 127-137.

BOTTONE E.J, *Yersinia enterocolitica*. Vue d'ensemble et épidémiologique corrélats. Microbes Infetc. 1999, 1 (4) pp. 323-333.

ISO 10273 : 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détection de *Yersinia enterocolitica* pathogène.

Méthode

P. S. ENRICHISSEMENT

X ml / g échantillon + 9X ml de bouillon PSB (REF. 777874)
Incubation : 25 °C ± 1 °C - 44 ± 4h

S. S. ENRICHISSEMENT

10 ml de suspension initiale dans le bouillon PSB + 90 ml de milieu ITC (REF. 777312 + REF. 777785).
Incubation : 25 °C ± 1 °C - 44 ± 4 h

Traitement alcalin (4,5 ml de KOH) pendant 20 ± 5 sec

ISOLEMENT SÉLECTIF

Agar CIN (REF. 777446 + REF. 777774) / Incubation : 30 °C ± 1 °C - 24 ± 2 h

LECTURE DES RÉSULTATS

Les colonies caractéristiques sont petites et circulaires. Ils présentent une zone centrale avec un contour rouge foncé bien défini. Autour d'eux, un translucide ou transparent zone peut être observée.

DÉTERMINATION DES ESPÈCES PATHOGÈNES

- Test uréase (+) : REF. 777889
- Hydrolyse de l'esculine (-) : REF. 777189
- Plasmide pYV (+)
- Détection de pyrazinamidase (-)

CONFIRMATION BIOCHIMIQUE

- Décarboxylation de la lysine (-) : REF. 777294
- Arginine dihydrolase (-)
- Phénylalanine désaminase (tryptophane) : REF. 777345
- Fermentation des glucides :
 - Sucrose (+)
 - Sorbitol (+)
 - Rhamnose (-)
 - Mélibios (-)
- Citrate de Simmons (-) : REF. 777388

Détection et dénombrement de *Shigella* spp.

Procédure définie selon la norme ISO 21567 :2004



Introduction

Le genre *Shigella* est constitué de bacilles anaérobies facultatifs non motiles, à coloration de Gram négative, non sporulants, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Ils présentent une activité biochimique réduite avec une fermentation du glucose sans production de gaz et sont sans activité cytochrome oxydase.

C'est un type de bactérie hautement entéro-invasif : son habitat est le côlon et son principal réservoir est l'homme, bien qu'elle ait également été isolée chez d'autres primates supérieurs. Les *Shigella* sont très sensibles aux changements de température et aux conditions environnementales défavorables. Cependant, ils sont capables de tolérer un pH bas. Ils constituent donc l'une des rares bactéries capables de survivre à l'acidité de l'estomac et de coloniser ensuite le tube digestif.

Cette capacité, combinée au fait qu'elles soient infectieuses à faibles doses, contribue à leur pouvoir pathogène.

La contamination des aliments par *Shigella* peut résulter d'un contact direct ou indirect avec des matières fécales de personnes infectées, de l'eau infectée, de parasites (mouches) ou du manque d'hygiène ou de techniques de manipulation appropriées lors de la préparation des aliments.

Bibliographie

PASCUAL ANDERSON, M^o R. (1992) Microbiología Alimentaria. Díaz de Santos, S.A. Madrid.

ATLAS, R.M., L.C. PARK (1993) Manuel sur les milieux microbiologiques pour l'examen de la nourriture. CRC Press Inc. Boca Raton.

ISO 21567: 2004. Microbiologie des denrées alimentaires et des aliments pour animaux - Méthode horizontale pour la détection de *Shigella* spp.

Méthode

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF

X ml / g d'échantillon + 9 x ml de bouillon Shigella (REF. 778553) - Incubation en anaérobiose : $41,5 \pm 1$ °C - 16/20 h

1 / ISOLEMENT SÉLECTIF

Gélose Mac Conkey (REF. 777298) / Incubation : 37 ± 1 °C - 20/24 h (faible sélectivité)

2 / ISOLEMENT SÉLECTIF

Gélose XLD (REF. 777440) / Incubation : 37 ± 1 °C - 20/24 h (sélectivité moyenne)

3 / ISOLEMENT SÉLECTIF

Gélose entérique Hektoen (REF. 777263) / Incubation : 37 ± 1 °C - 20/24 h (haute sélectivité)

LECTURE DES RÉSULTATS

Pour identifier les colonies caractéristiques de *Shigella*, reportez-vous aux fiches techniques de chaque milieu de culture

PURIFICATION COLONIES

Étaler sur gélose nutritive (REF. 777328) / Incubation : 37 ± 1 °C - 20/24 h

CONFIRMATION BIOCHIMIQUE

- Gélose TSI - triple sugar iron (Voir les informations de lecture) : REF. 777407
- Essais de mobilité (Gélose nutritive semi-solide (-) : REF. 778554
- Gélose à l'urée (-) : REF. 777889
- Décarboxylation de la L-lysine (-) : REF. 777295
- Décarboxylation de la L-ornithine (+/- selon les espèces)
- Formation d'indole (+/- selon les espèces) : REF. 777418
- Détection de α -galactosidase (+/- selon les espèces)
- Fermentation du sucre (selon les espèces)
- Acétate de sodium (complémentaire) - croissance très réduite : REF. 777169

IDENTIFICATION SÉROLOGIQUE

- Différenciation antigénique
- Tests d'agglutination

Détection et dénombrement d'*Escherichia coli*

Introduction

Il s'agit d'un micro-organisme appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est bacille mobile non sporulant à coloration de Gram négative. Il est lactose positif et oxydase négatif.

Escherichia coli se distingue des autres coliformes par sa capacité à produire de l'indole à partir de tryptophane ou par la production de l'enzyme α -glucuronidase.

Ces caractéristiques sont utilisées pour l'isolement sélectif et la confirmation de différents processus analytiques, comme nous le décrivons par la suite.

De plus, ces bactéries se trouvent dans les intestins des humains et des animaux à sang chaud. En raison de leur forte présence dans le tractus intestinal et les fèces, ils sont considérés comme un micro-organisme marqueur de mauvaises pratiques d'hygiène ou de contamination fécale lors de la manipulation des aliments.

Bibliographie

ISO 7251: 2005. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés. Technique du nombre le plus probable.

ISO 16649-1: 2001. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement d'*Escherichia coli* à bêta-glucuronidase positive. Partie 1 : Technique de comptage des colonies à 44 ° C en utilisant des membranes et du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D-glucuronide.

ISO 16649-2: 2001. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement d'*Escherichia coli* à bêta-glucuronidase positive. Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44 ° C avec le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D-glucuronide.

ISO 16649-3: 2001. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement d'*Escherichia coli* à bêta-glucuronidase positive. Partie 3 : Technique de détection et de détermination du nombre le plus probable utilisant le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta D-glucuronide.



1 - PROCÉDURE TELLE QUE DÉFINIE PAR L'ISO 7251: 2005 Détection et dénombrement via le nombre le plus probable :

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 6887 ou 8261 appropriée selon le produit analysé.

PRE-ENRICHISSEMENT

1 ml de suspension initiale + 9 ml de bouillon de lauryl sulfate (REF. 777281) et 10 ml de la suspension initiale + 90 ml de bouillon Lauryl Sulfate 2 fois concentré. – Incubation : 37 °C - 24 ± 2 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

Milieu EC (REF. 777240) / Incubation : 44 °C - 24/48 ± 2 h

PRODUCTION D'INDOLE

Inoculer des tubes d'eau peptonée (REF. 777338) après incubation du milieu sélectif / Incubation : 44 °C - 48 ± 2 h

LECTURE DES RÉSULTATS

Croissance révélée par la turbidité et la présence de gaz en milieu EC et une couleur rouge lors de la production d'indole révèle la présence d'E. coli

NOTE 1: Pour l'énumération à l'aide de la méthode NPP (nombre le plus probable), utilisez trois tubes pour chaque dilution. Dans certains cas, selon la matrice, 5 tubes peuvent être requis (se référer à la norme correspondante).

2 - PROCÉDURE DÉFINIE PAR L'ISO 16649-1: 2001 Nombre de colonies à 44 ° C sur membranes

SUSPENSION INITIALE

Voir la norme ISO 6887-1 ou la norme pertinente pour le produit à analyser

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF

Membrane sur boîte de Pétri gélose MMG, ajoutez 1 ml de la suspension initiale. Sécher pendant 15 minutes à la température ambiante. Incubation : 37 °C - 4 ± 1 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

Transférer la membrane sur gélose TBX (REF. 777398) / Incubation : 44 °C - 18/24 h

3 - PROCÉDURE DÉFINIE PAR L'ISO 16649-2: 2001 Nombre de colonies à 44 ° C

SUSPENSION INITIALE

Voir la norme ISO 6887-1 ou la norme correspondante selon le produit à analyser

ISOLEMENT SÉLECTIF

Gélose TBX (REF. 777398) / Incubation : 44 °C - 18/24 h

NOTE 2: Le technicien doit choisir entre les parties 16649-1 et 16649-2. de la norme, en gardant à l'esprit que la première méthode est développée pour les échantillons où les cellules présentent un indice de stress élevé.

4 - PROCÉDURE DÉFINIE PAR ISO 16649-3: 2015 Détection et comptage selon la technique NPP

SUSPENSION INITIALE

Voir la norme ISO 6887-1 ou la norme correspondante selon le produit à analyser

ENRICHISSEMENT SÉLECTIF

Ajouter une proportion de l'échantillon / suspension initiale dans le bouillon MMG (REF. 777312) à des concentrations simples (1 : 9) et doubles (1 : 1). – Incubation : 37 ± 1 °C - 24 ± 2 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

Étalement sur gélose TBX (REF. 777398) / Incubation : 44 °C - 22 ± 2 h

NOTE 3: Pour le dénombrement selon la méthode NPP (nombre le plus probable), utiliser 3 tubes pour chaque dilution, qui seront ensuite utilisés pour le NPP. Dans certains cas, selon la matrice, 5 tubes peuvent être nécessaires (se référer à la norme pertinente).



Dénombrement des coliformes totaux

Procédure définie selon la norme ISO 4832 :2006

Introduction

Les coliformes totaux sont des entérobactéries lactose positives et constituent un groupe qui se définit davantage par les tests utilisés pour leur isolement que par des critères taxonomiques. Ils appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et se caractérisent par leur capacité à fermenter le lactose avec production de gaz et d'acides, plus ou moins rapidement, sur une période de 48 heures et avec une température d'incubation comprise entre 30 et 37 °C.

Ce sont des bacilles gram-négatifs, aérobies facultatifs, anaérobies et non sporulants. Du groupe "coliformes", ils forment différents genres : *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc. Ils se retrouvent dans les intestins de l'homme et des animaux, ainsi que dans d'autres environnements tels que l'eau, le sol, les plantes, les coquilles d'œufs, etc.

Étant donné qu'il est difficile de distinguer les coliformes existants des nouvelles contaminations, il est admis que toute détection de coliformes est apparentée à une nouvelle contamination, sauf preuve du contraire.

Bibliographie

COWELL et MORISETTI. J. Sci. Food Agric. 20, 1969, p. 573

ISO 48321: 2006. Microbiologie de l'alimentation et de l'alimentation animale - Méthode horizontale pour la détection et le dénombrement des coliformes - Technique du nombre le plus probable

ISO 4832: 2006. Microbiologie de l'alimentation humaine et animale - Méthode horizontale de dénombrement des coliformes - Technique par comptage des colonies.



Méthode

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 6887 ou 8261 selon le produit à analyser.

ISOLEMENT SÉLECTIF

1 ml de suspension initiale sur gélose VRBL (REF. 777432)
– Incubation : 30/37 °C - 24 ± 2 h

LECTURE DES RÉSULTATS

Sélectionnez les boîtes de Pétri avec moins de 150 CFU pour le dénombrement. Les colonies caractéristiques ont une couleur violette, parfois entourée d'un halo de précipitation rougeâtre

CONFIRMATION

Pour les colonies atypiques, ensemercer dans un bouillon bilié au vert brillant (REF. 777201). Incubation : 30/37 °C - 24 ± 2 h

Détection d'*Escherichia* *coli* O157

Procédure définie selon la norme ISO 16654 :2001

Introduction

Le sérotype O157 d'*Escherichia coli* est en forme de bâtonnet et à coloration de Gram négative. Le "O" dans le nom fait référence à l'antigène présent dans la paroi cellulaire (antigène somatique) que ces bactéries présentent. C'est une souche entérohémorragique qui provoque une intoxication alimentaire due à la production d'une entérotoxine cytotoxique appelée vérotoxine.

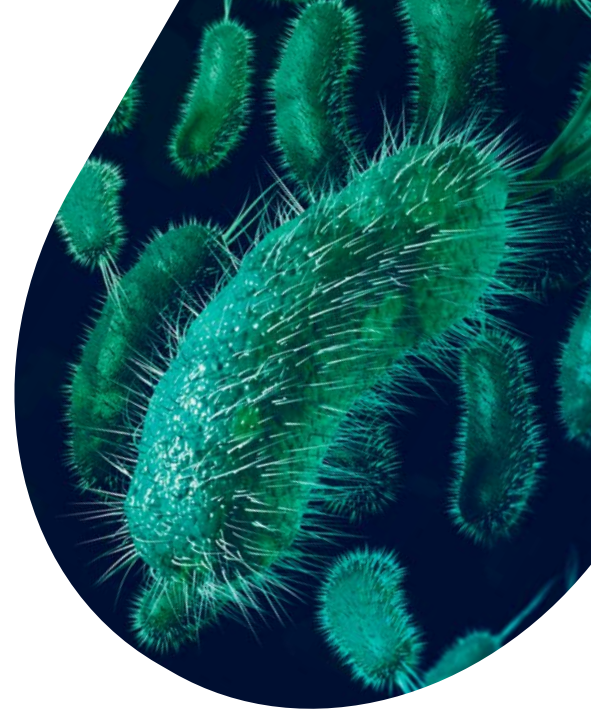
L'incidence la plus élevée de la maladie a été associée à la consommation de bœuf haché insuffisamment cuit. Les contacts interpersonnels au sein de la famille et dans les écoles maternelles constituent également une voie de transmission importante. L'infection peut également survenir après avoir bu du lait cru et après avoir nagé ou bu de l'eau contaminée par le contact avec des excréments d'animaux, de l'eau fécale ou des eaux usées.

Bibliographie

ZADIK P. M, CHAPMAN P. A et SIDDON S C.A. J. Med. Microbiol., 39, 1993, pages 155-158

DOYLE M.P. et SCHOENI J.L. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1987, pp 2394-2396

ISO 16654: 2001. Microbiologie des denrées alimentaires et des aliments pour animaux - Méthode horizontale pour la détection d'*Escherichia coli* O157.



Méthode

ENRICHISSEMENT

X g / ml d'échantillon + 9 Xml de milieu TSB (REF. 777883). - Homogénéisation et incubation 6 h puis 41,5 °C - 12/18 h

SÉPARATION IMMUNOMAGNÉTIQUE (IMS)

Pendant 6 heures et plus tard, après 12/18 heures d'incubation

ISOLEMENT SÉLECTIF

50µl de particules magnétiques remises en suspension sur gélose Mac Conkey avec du sorbitol (REF. 777300 + REF. 777771)
Incubation : 37 °C - 18/24 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

50µl de particules magnétiques remises en suspension sur gélose chromogène E. coli 157 (REF. 777836 + REF. 777771)
Incubation : 37 °C - 18/24 h

PURIFICATION DE COLONIES

Etaler sur gélose nutritive (REF. 777328) /
Incubation : 37 °C - 18/24 h

CONFIRMATION BIOCHIMIQUE

Formation d'indole : milieu tryptone / tryptophane (REF. 777418) + Réactif de Kovacs (REF. 777535)

IDENTIFICATION SEROLOGIQUE

Seulement pour les colonies indole positives

Détection de *Vibrio* spp.

Procédure définie selon la norme ISO 21872 :2007

Introduction

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bacilles en forme de virgule à coloration de Gram négative. *Vibrio* est oxydase positive, anaérobie facultatif et ne forme pas de spores. Toutes les espèces du genre sont mobiles, généralement avec un unique flagelle polaire.

Plusieurs espèces de *Vibrio* sont pathogènes, provoquant des maladies du tube digestif, notamment *V. cholerae*, l'agent responsable du choléra ; *V. parahaemolyticus*, responsable de gastro-entérite aiguë, et *V. vulnificus* transmis par la consommation de crustacés.

L'infection à *Vibrio* est généralement provoquée par la consommation de coquillages crus ou insuffisamment cuits. Ces bactéries se développent naturellement dans les environnements marins, que ce soit en eau salée ou dans les estuaires, où se trouvent un mélange d'eau douce et d'eau salée. Cette présence aquatique fait des produits de la pêche les aliments les plus liés aux espèces du genre *Vibrio*.

Bibliographie

ISO 21872-1. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour le *Vibrio* spp. - Partie 1 : Détection de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* potentiellement entéro-pathogènes.



Méthode

ENRICHISSEMENT PRIMAIRE

25 g / ml d'échantillon + 225 ml d'eau peptonée tamponnée (REF. 2155) - Incubation (produit frais) : 41,5 °C ± 1 - 6 ± 1 h - Incubation (autres): 37 °C ± 1 - 6 ± 1 h

ENRICHISSEMENT SECONDAIRE

1 ml d'échantillon + 10 ml d'eau peptonée tamponnée (REF. 2155) - Incubation (*V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*) 41,5 °C ± 1 - 6 ± 1 h. - Incubation (*V. vulnificus*) 37 °C ± 1 - 6 ± 1 h

ISOLEMENT SÉLECTIF

1 µl de culture incubée sur gélose TCBS (REF. 777399). - Incubation : 37 °C ± 1 - 24 h ± 3 h

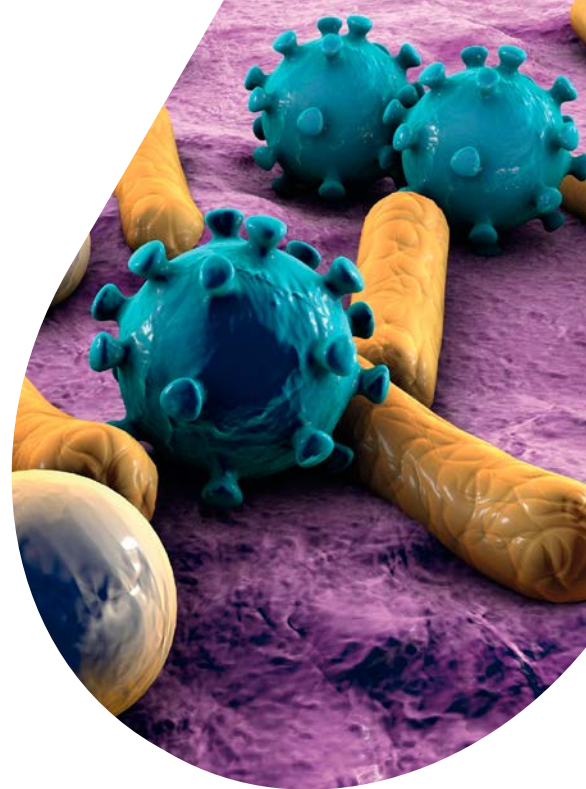
La norme comprend également un milieu sélectif secondaire à sélectionner par le laboratoire

CONFIRMATION BIOCHIMIQUE

- Décarboxylase L-Lysine en milieu salin
- Arginine Dihydrolase en milieu salin
- Détection de la β-galactosidase
- Détection d'indole
- Halotolérance

Pour la lecture des résultats, reportez-vous à la norme correspondante

Détection et dénombrement d'autres micro-organismes dans l'industrie alimentaire



DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES SULFITO-RÉDUCTRICES EN CONDITION ANAÉROBIE (ISO 15213: 2003)

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous aux normes ISO 6887 ou 8261 applicables selon le produit à analyser (proportion 1:9)

ISOLEMENT SÉLECTIF

1 ml de dilution initiale sur gélose au sulfite de fer (REF. 777844) - Incubation pour bactéries thermophiles : 50 °C ± 1 - 24/48 h - Incubation pour les bactéries mésophiles : 37 °C ± 1 - 24/48 h

CONFIRMATION BIOCHIMIQUE

- Test respiratoire
- Test de sporulation

DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES LACTIQUES (ISO 15214: 1998)

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 6887-1 appropriée selon le produit à analyser.

ISOLEMENT SÉLECTIF

1 ml de dilution initiale sur boîtes de gélose MRS (REF. 777858) – Incubation : 30 °C-72 h ± 3 h

Bibliographie

ISO 15213: 2003. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de bactéries sulfite-réductrices se développant dans des conditions anaérobies.

ISO 13720: 2010. Viande et produits à base de viande. Énumération de présomption *Pseudomonas* spp.

ISO 6611: 2004 // FIL 94. Lait et produits laitiers - Dénombrement des colonies unités de levure et / ou de moisissure - Technique par comptage des colonies à 25 °C.

DÉNOMBREMENT DES CHAMPIGNONS ET MOISSURES DANS LES PRODUITS LAITIERS (ISO 6611: 2004)

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 8261 selon le produit à analyser.

ISOLEMENT SÉLECTIF

1 ml de dilution initiale sur boîtes de gélose OGA (REF. 777335 + REF. 777791) – Incubation : 25 °C ± 1 - 5 jours

La norme inclut également le milieu agar au chloramphénicol (REF. 1301) comme moyen d'isolement sélectif

PSEUDOMONAS SPP. SUPPOSÉ DANS LA VIANDE ET PRODUITS À BASE DE VIANDE (ISO 15213:2003)

SUSPENSION INITIALE

Reportez-vous à la norme ISO 6887 ou 8261 appropriée selon le produit analysé.

ISOLEMENT SÉLECTIF

0,1 ml de dilution initiale sur des boîtes de gélose CFC (REF. 777350 + REF. 777773) – Incubation : 25 °C ± 1 - 44 h ± 4 h

CONFIRMATION BIOCHIMIQUE

- Test oxydase (+)



Condalab

Inspired by knowledge

export@condalab.com | www.condalab.com

Traduction Française : D.Dutscher | www.dutscher.com