

5.5.4 Choix des colonies – confirmation

Se référer aux indications données dans la méthode relative à la recherche des salmonella.

5.5.5 Détermination sérologique

Les souches répondant aux caractéristiques biochimiques des Salmonella, ou suspectes, seront soumises à la confirmation sérologique.

5.5.6 Expression des résultats

Lorsque l'échantillon composé est exempt de salmonella, le produit est conforme au critère requis.

Si l'échantillon composé présente des salmonella, il peut être conseillé de réexaminer séparément les 5 unités.

Pour les salmonella, le plan à 2 classes est appliqué sans tolérance analytique.



Arrêté du 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de prélèvement d'échantillons et d'analyse bactériologiques des glaces et crèmes glacées.

Le ministre du commerce ,

Vu le décret présidentiel n ° 04 -138 du 6 Rabie El Aouel 1425 correspondant au 26 avril 2004 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n ° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1^{er}. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de prélèvement d'échantillons et d'analyse bactériologiques des glaces et crèmes glacées.

Art. 2. — Pour le prélèvement et l'analyse bactériologiques des glaces et des crèmes glacées, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

METHODE DE PRELEVEMENT ET D'ANALYSE BACTERIOLOGIQUES DES GLACES ET CREMES GLACEES

1. PRELEVEMENTS DES GLACES ET CREMES GLACEES

A. Matériel à utiliser

1. **Bocaux de 350 ml** à large ouverture en verre borosilicaté genre pyrex bouchés avec couvercle à vis métallique possédant un intermédiaire qui sera changé à chaque stérilisation. Ces bocaux contiendront des billes de verre genre pyrex. Ils seront préparés et stérilisés au laboratoire.

2. Caisses glacières

3. Matériel de prélèvement

Cuillères métalliques stériles à long manche; tubes métalliques stériles, genre sonde à fromage mandrin formant piston pénétrant dans le tube.

4. Lampe à butane (type lampe à souder)

5. Neige carbonique ou mélange de glace pilée et de sel

Ce mélange de glace pilée et de sel sera mis dans des sachets en matière plastique, parfaitement clos.

B. Technique de prélèvements

1. **Quantité de produit à prélever** : 100 grammes environ.

2. Techniques de prélèvements

Les prélèvements de glaces et crèmes glacées doivent être effectués en prenant toutes les précautions d'asepsie, notamment en ce qui concerne l'ouverture et la fermeture des bocaux.

a) Glaces et crèmes glacées conditionnées

— Dans les emballages en papier

Développer le papier et faire glisser la glace dans le bocal sans toucher avec les mains. S'il s'agit de glace sucette, couper le bâtonnet aseptiquement au ras de la glace.

— **Dans les emballages en carton**

Mettre la veille les bocaux à prélèvements dans la caisse glacière, avec les sachets contenant de la glace à rafraîchir. Au moment du prélèvement sortir aseptiquement la crème glacée de l'emballage en carton et la mettre directement dans les bocaux. Remplacer les sachets par de la neige carbonique ou par d'autres sachets contenant le mélange glace plus sel.

b) Glaces et crèmes glacées servies par le vendeur à la cuillère

— Utiliser les instruments du vendeur sans les flamber.

c) Glaces et crèmes glacées vendues au demi-litre ou au litre

— Utiliser une cuillère métallique flambée.

d) Glaces et crèmes glacées vendues au moyen d'appareils distributeurs

— Prendre l'échantillon directement au bec de l'appareil.

e) Glaces et crèmes glacées surgelées

— Utiliser le tube métallique formant la sonde. Celui-ci sera flambé très légèrement au moment du prélèvement (ne pas dépasser 50 °C). Avec le mandrin formant piston, pousser la glace pour la mettre dans le bocal.

— Pour l'ouverture et la fermeture des bocaux de prélèvements, les précautions d'usage en matière de bactériologie doivent être prises notamment : ouverture du bocal au dernier moment.

Flambage de l'orifice du bocal et de la partie inférieure du couvercle juste avant l'introduction du prélèvement et au moment de la fermeture du bocal.

II. ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DES GLACES ET CREMES GLACEES

1) Préparation des échantillons

a) Premier procédé

Les bocaux sortis de la neige carbonique ou de la glace sont mis à l'étuve ou au bain-marie à 37 °C, au maximum pendant 1 heure. Ce temps ne doit pas être dépassé, sinon on aborderait le début de la phase logarithmique de croissance. Dans la pratique, ce réchauffement à 37°C doit être surveillé et arrêté le plus rapidement possible.

Si la glace a été reçue dans la neige carbonique, le laboratoire doit se débarrasser de cette neige carbonique immédiatement, à l'extérieur du laboratoire.

Faire les dilutions jusqu'à 1/100.000 avec une solution de tryptone - sel.

Mais à partir de la dilution au 1/100, on fera une dilution au 1/200 ainsi que la dilution au 1/1000.

b) Deuxième procédé

Les produits sont placés dans un réfrigérateur à + 4 °C / + 6 °C jusqu'au moment de la décongélation.

Cette méthode paraît plus favorable que le premier procédé pour les petits échantillons (100 à 200 g) car la décongélation est rapide et ne favorise pas la multiplication des psychrotrophes.

— Après leur décongélation, les glaces sont homogénéisées par une agitation énergique dans le bocal de prélèvement pendant deux à trois minutes, même s'il s'agit de glaces aux fruits et aux amandes.

— Pour les crèmes glacées ou glaces enrobées de chocolat, éliminer l'enrobage à la pince ou au couteau stérilisé et n'examiner que la glace.

— Pour les glaces et crèmes glacées qui foisonnent : détruire la mousse sous vide selon la technique ci-dessous :

Description de l'appareil : Un flacon avec un bouchon percé de 2 trous. Dans un des trous, une pipette Pasteur. L'orifice extérieur de la pipette est obturé par un tampon de coton. Dans l'autre trou, un tube de verre dont l'orifice extérieur est obturé par un tampon de coton et relié au vide.

Le tube où est placé le doigt sert à diminuer ou à augmenter le vide pour éviter le passage de la crème glacée dans le tube relié à la trompe ou à la pompe à vide.

— Manipulation : Boucher la pipette Pasteur avec le doigt. Faire le vide. De temps en temps, laisser passer l'air. Agiter le flacon en même temps. On ne supprime pas toute la mousse, mais c'est une amélioration.

2. Technique d'examen bactériologique

A. Préparation des dilutions

Faire les dilutions jusqu'à 1/100.000 avec une solution tryptone sel.

Mais à partir de la dilution 1/100 on fera une dilution au 1/200 ainsi que la dilution 1/1000.

Cette dilution au 1/200 servira à dénombrer 200 coliformes par 1 ml.

Formule

Tryptone.....1 g
Chlorure de sodium.....8 g
Eau distillée.....1000 ml
pH : 7 - 7,2

Répartir en tubes ou en flacons. Autoclaver 20 minutes à 120 °C. Vérifier la stérilité du milieu avant de l'employer.

Chaque dilution est agitée soit à la main au moins 30 fois, ou mieux à l'agitateur mécanique, pendant 2 minutes au moins, avant de passer à la dilution suivante. Chaque dilution est effectuée avec une pipette graduée stérile distincte.

B. Recherches à effectuer

En tryptone extrait de levures agar pendant 72 h ± 2 heures.

Formule de la tryptone extrait de levures Agar

Tryptone.....6 g
Extrait de levure.....3 g
Agar en poudre.....15 g
Eau distillée.....1000 ml
pH : 7

Répartir en tubes de 20 x 200 mm à raison de 20 ml par tube. Autoclaver 20 minutes à 115° C.

Ensemencer:

- 1 ml de la dilution au 1/1.000
 1 ml de la dilution au 1/10.000
 1 ml de la dilution au 1/100.000
 0,1 ml de la dilution au 1/100.000

Pour faciliter le dénombrement et éviter l'envahissement du milieu par certaines colonies envahissantes utiliser la technique suivante dite des « deux couches » : 1 ml du produit ou des diverses dilutions et porté en boîtes de Pétri.

Le milieu qui a été préalablement fondu et ramené à 45°- 50°C et versé dans la boîte. Ne pas attendre plus de cinq minutes pour couler le milieu. Mélanger. Laisser solidifier sur une surface fraîche et parfaitement horizontale.

Quand la préparation est solidifiée verser en surface une mince couche de gélose blanche (2 mm d'épaisseur environ), préalablement fondue et ramener à 45° C.

Laisser solidifier avant de mettre à l'étuve.

Formule de la gélose blanche

- Gélose20 g
 Eau distillée1000 ml
 pH : 7

Répartir en tubes. Autoclaver 20 min. à 120° C.

3. Dénombrement des bactéries coliformes avec identification d'Eschérichia Coli

En bouillon lactosé bilié au vert brillant.

Formule du milieu.

- Bactopeptone.....10 g
 Lactose.....10 g
 Eau distillée.....786 ml
 Bile de bœuf fraîche ou solution à 10% de bile déshydratée.....200 ml
 pH : 7,2

Ajouter alors 13,3 ml d'une solution aqueuse à 1/1000 de vert brillant. Répartir en tubes munis d'une cloche (10 ml par tube de 160 x 16 mm) . Stériliser 20 min. à 120° C.

Ensemencer 2 fois.

- 1 ml de la dilution au 1/10
 1 ml de la dilution au 1/100
 1 ml de la dilution au 1/200
 1 ml de la dilution au 1/1000

Les milieux ensemencés sont mis à l'étuve à 30 °C pendant 48 heures. Les tubes de milieu gazogène sont considérés comme contenant des bactéries coliformes. Les Eschérichia Coli sont identifiés par le test de Mackenzie.

Test de Mackenzie

Pour chaque tube de bouillon lactosé bilié au vert brillant qui contient des gaz à 30° C. on utilise :

— Un tube de bouillon lactose bilié au vert brillant (même formule que ci-dessus).

— Un tube d'eau peptonnée simple dont voici la méthode :

- Peptone.....10 g
 Chlorure de sodium.....5 g
 Eau distillée.....1000 ml
 pH : 7,2

— Autoclaver à 121° C pendant 20 minutes.

— Une anse bouclée de chaque tube de bouillon lactosé bilié au vert brillant, gazogène, après agitation soigneuse et inoculée dans un tube de bouillon lactose bilié au vert brillant.

— Une autre anse bouclée du même tube de bouillon lactose bilié au vert brillant, gazogène, après agitation soigneuse et inoculée dans un tube d'eau peptonnée simple.

Les deux tubes sont portés au bain-marie à 44 °C ± 0,5 pendant 48 heures. Pour conclure à la présence d'Eschérichia Coli, il faut à la fois que le tube de bouillon lactose bilié au vert brillant porté au bain-marie à 44 °C soit gazogène, et que la recherche de l'indole soit positive dans le tube d'eau peptonnée simple qui a été porté à 44 °C. La recherche de l'indole s'effectue à l'aide de l'acide nitrique nitreux en présence d'alcool amylique. L'indole se recherche au bout de 24 heures et 48 heures.

4. Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes

Première technique : Sur milieu de Chapman mannité :

Formule du milieu

- Bactopeptone.....2 g
 Extrait de viande.....1 g
 Protéose peptone.....9 g
 Chlorure de sodium.....75 g
 Mannitol.....10 g
 Bacto agar.....15 g
 Rouge de phénol.....0,025 g
 Eau distillée.....1000 ml
 pH final : 7,4 - 7,5

Répartir en tubes de 200 x 22 mm à raison de 25 ml par tube.

Autoclaver 20 min. à 120 °C. Au moment de l'emploi couler le milieu en boîtes de Pétri. Laisser solidifier.

Faire sécher à l'étuve à 37°C.

Ensemencer sur deux boîtes différentes :

- 0,1 ml du produit non dilué
- 0,1 ml de la dilution au 1/10

Etaler à la surface du milieu d'une façon homogène. Porter à l'étuve à 37 °C. Examiner après 24 heures et 48 heures.

On retiendra les colonies blanches ou jaunes entourées d'un halo jaune (mannitol +).

L'identification des colonies de staphylocoques pathogènes se fera par la mise en évidence de la coagulase libre et éventuellement par la mise en évidence de la phosphatase complétée par la recherche de l'aérobiose anaérobiose. En effet, on peut avoir :

- Coagulase + Staphylocoque pathogène
- Phosphatase +
- Coagulase + Staphylocoque pathogène (6% des cas)
- Phosphatase -
- Coagulase - Staphylocoque pathogène (4% des cas)
- Phosphatase + ou Micrococcus.

Dans ce dernier cas, il faut compléter par la recherche de l'aérobiose anaérobiose, car certains micrococci possèdent une phosphatase. Mais les micrococci sont aérobies stricts. Les staphylocoques sont aérobies anaérobies.

A. Mise en évidence de la coagulase libre

Prélever quelques colonies suspectes. Inoculer chacune d'elles dans un tube de bouillon différent. Porter 24 heures à l'étuve à 37° C.

A partir des cultures en bouillon : Rechercher la coagulase et faire un tube témoin.

Surveiller toutes les heures. Au cas où la coagulase ne serait positive qu'au bout de 24 heures, refaire un examen sur d'autres colonies.

Si la coagulase est négative : Faire la recherche de l'aérobiose anaérobiose.

Rechercher la phosphatase.

Recherche de l'aérobiose anaérobiose :

Prélever de la culture en bouillon avec une pipette Pasteur fermée. L'inoculer sur toute la hauteur d'un tube de milieu V.L. préalablement fondu, régénérer, et ramener à 48°C - 50° C.

Mettre 24 heures à l'étuve à 37 ° C après refroidissement.

Formule du milieu V.L Milieu à l'extrait de viande et de levure

Peptone tryptique.....	10 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Extrait de viande.....	4 g
Extrait de levure.....	5 g
Chlorhydrate de cystéine.....	0,30 g
Glucose.....	2 g
Agar en poudre.....	6 g
Eau distillée.....	1000 ml

Porter à l'ébullition pour dissoudre.

Ajuster à pH 7,2 - 7,4 avec de la lessive de soude au 1/10. Faire bouillir.

Filtrer. Répartir en tubes de 8 ou 9 x 180 mm, sur une hauteur de 8 cm. Stériliser à 115 ° C maximum, pendant 30 minutes.

B. Mise en évidence de la phosphatase

Faire un ensemencement en gélose inclinée à partir de la culture en bouillon. Une anse de la culture en bouillon est étalée sur la surface de la gélose. Porter à l'étuve à 37 ° C pendant 24 heures.

1. Avec la culture obtenue , on fait une forte émulsion du germe, pour cela on met 20 gouttes d'eau salée dans un tube à hémolyse. On porte la culture obtenue en gélose dans cette eau physiologique jusqu'à obtention d'une émulsion dense.

Dans un autre tube à hémolyse contenant 0,25 ml de solution de paranitro phénylphosphate disodique, ajouter 0,25 ml d'une solution d'acétate de sodium. Mélanger le contenu des 2 tubes et incuber à 37°C pendant 20 minutes. Si on a une coloration jaune franc : présence de phosphatase.

Faire en même temps un témoin sans émulsion de staphylocoque.

(solution de paranitrophénylphosphate disodique à 4% dans l'eau distillée).

(solution d'acétate de sodium à 2,025 g dans 250 ml d'eau distillée).

Certains staphylocoques pathogènes peuvent perdre leur coagulase, mais si on a une phosphatase positive et un germe aérobie anaérobie, conclure à staphylocoque pathogène.

2. Autre technique de mise en évidence de la phosphatase

Première technique : Mettre 0,50 ml d'eau distillée dans un tube à hémolyse, pulvériser avec un agitateur de verre un comprimé de substrat à l'a-naphtylphosphate acide sodique.

Dans cette suspension faire une émulsion à partir de la culture obtenue sur gélose.

Incuber à 37° C pendant 30 minutes.

Introduire alors un comprimé d'orthodiamine bis azotée préalablement pulvérisé.

En présence de phosphatase on a une coloration rouge grenat produite par l'a-naphtol libéré. Quand la réaction est négative la teinte jaune initiale persiste.

L'identification du caractère pathogène doit porter sur un nombre suffisant de colonies : 5 colonies et plus, s'il y a 50 colonies suspectes sur la boîte; 10 colonies et plus, s'il y a plus de 50 colonies suspectes sur la boîte.

Deuxième technique : Pour la recherche et le dénombrement du staphylocoque pathogène.

Utilisation du milieu de Baird-Parker à la sulfamézathine.

Formule du milieu

a) Milieu de base

Tryptone.....	10 g
Extrait de viande de bœuf.....	5 g
Extrait de levure.....	1 g
Chlorure de lithium.....	5 g
Agar.....	20 g
Solution de sulfamézathine à 0,2%.....	25 ml
Eau distillée.....	1000 ml

Préparation de la solution de sulfamézathine

Dissoudre 0,5 g de sulfamézathine dans 25 ml de soude N/10 et compléter à 250 ml avec de l'eau distillée.

Cette solution peut s'ajouter dans le milieu avant ou après l'autoclavage.

Le milieu de base doit être autoclavé 20 minutes à 120°C.

Le pH final de la base doit être ajusté à 7,2.

Répartir 20 ml par tube de 20 X 200 mm.

Au moment de l'emploi, faire fondre le milieu de base au bain-marie bouillant, puis refroidir à 45°C- 48°C.

Ajouter alors les solutions suivantes, filtrées et chaudes par 20 ml de base.

b) Glycine à 20%.....	1,2 ml
c) Tellurite de potassium à 1%.....	0,2 ml
d) Pyruvate de sodium à 20%.....	1 ml
e) Emulsion de jaune d'œuf.....	1 ml

Les solutions b, c et d sont préparées dans de l'eau distillée puis stérilisées par passage sur filtre Seitz ou sur bougie Chamberland L 3.

— Emulsion du jaune d'œuf.

— Diluer 5 ml de jaune d'œuf stérile prélevés aseptiquement dans 95 ml d'eau salée, stérile.

— Vérifier la stérilité par culture en bouillon nutritif ordinaire incubé à 30° C pendant 3 jours au moins.

Le milieu complet ainsi obtenu est coulé en boîtes de Pétri.

Quand le milieu est froid et sec, il est ensemencé avec :

0,1 ml de produit non dilué, 0,1 ml de la dilution au 1/10.

Les boîtes inoculées sont incubées à 37 °C et examinées après 24 heures, puis 48 heures.

Les staphylocoques pathogènes forment des colonies noires entourées d'une zone d'éclaircissement du jaune d'œuf.

Cet aspect est caractéristique et spécifique.

Les *Proteus* Hauseri donnent des colonies identiques, mais la sulfamézathine inhibe leur développement.

Le milieu complet ne se conserve que 24 heures.

Confirmation du caractère pathogène du staphylocoque par la recherche de la phosphatase :

On utilise le réactif nitrophénylphosphate-disodique à 20 gamma par millilitre, en solution dans un tampon pH Tris 8 :

Tampon Tris: triphosphate de sodium pur : 121 g/l .

On verse le réactif à la surface du milieu Baird Parker sur lequel les colonies caractéristiques se sont développées.

On incube à 30° C pendant une demi (1/2) heure.

Les staphylocoques pathogènes, phosphatase + donnent autour de la colonie une coloration jaune qui se trouve à l'intérieur de la zone d'éclaircissement.

On évite ainsi la recherche de la coagulase.

5. Recherche des salmonelles

Effectuer cette recherche sur 25 ml de produit.

a) Pré-enrichissement.

25 ml de produit sont portés dans 75 ml de bouillon ordinaire (double concentration).

Formule du bouillon ordinaire (double concentration).

Extrait de viande de bœuf.....	2 g
Protéose peptone.....	20 g
Chlorure de sodium.....	10 g
Eau - distillée.....	1000 ml

Répartir dans des flacons de 150 ml, 75 ml du milieu à double concentration. Autoclaver 20 min. à 120 °C pH 7,2.

Dans un flacon contenant 75 ml de bouillon ordinaire, mettre 25 ml de glace ou de crème glacée. Incuber à 37°C pendant 18 h. à 24 heures.

Le pré-enrichissement en bouillon ordinaire doit être utilisé obligatoirement pour tous les produits surgelés.

b) Enrichissement.

1 ml du contenu de ce flacon est inoculé dans un tube de milieu au sélénite, plus cystine.

Incuber à 37°C, ou mieux à 40°C pendant 24 heures.

Formule du milieu au sélénite plus cystine

Tryptone.....5 g

Lactose.....4 g

Phosphate disodique.....10 g

Sélénite acide de sodium.....4 g

Cystine.....0,01 g

Eau distillée.....1000 ml

PH final 7

Ne pas autoclaver. Répartir à raison de 20 ml par tube de 200 x 20 mm.

Chauffer en vapeur fluente pendant 30 minutes
conserver au réfrigérateur.

C. Isolement

L'isolement se fait sur gélose au désoxycholate citrate, lactose, formule de Leifson, modifiée par Hynes.

— On incube à l'étuve à 37°C pendant 24 h. à 48 h.

Les colonies suspectes, quand elles ont été parfaitement isolées, sont repiquées sur milieu de Kligler.

— On procède ensuite à l'identification.
