

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 21 Chaâbane 1426 correspondant au 25 septembre 2005 rendant obligatoire la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aouel 1426 correspondant au 1er mai 2005 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 1er. — 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 la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.

Art. 2. — Pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers, 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 21 Chaâbane 1426 correspondant au 25 septembre 2005.

Lachemi DJAABOUBE

ANNEXE

METHODE DE RECHERCHE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS
-----**1. Définitions**

Pour les besoins de la présente méthode les définitions suivantes s'appliquent.

1.1 *Listeria spp* :

Microorganismes formant des colonies typiques sur un milieu sélectif solide et possédant les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques décrites quand les essais sont effectués selon la présente méthode.

1.2 *Listeria monocytogenes* :

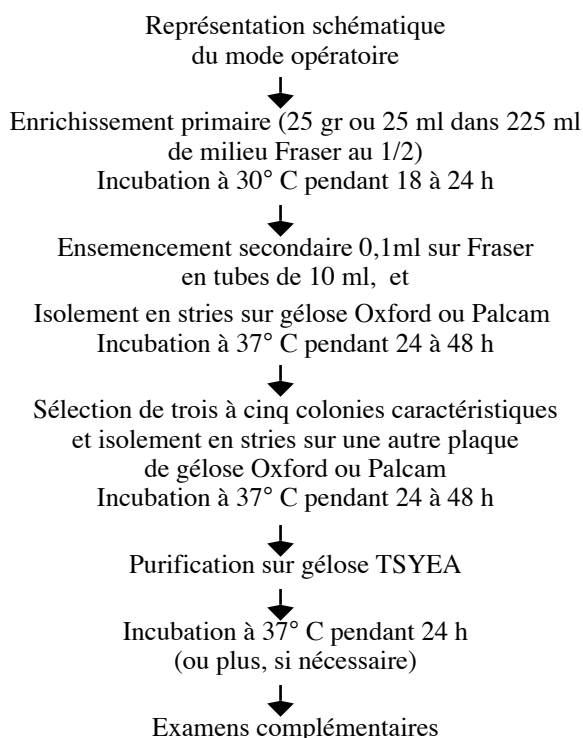
Espèce type de *Listeria* pathogène et qui peut être différenciée des autres espèces car elle présente des caractéristiques biochimiques spécifiques.

1.3 Recherche de *Listeria monocytogenes*

Détermination de la présence ou de l'absence de ce microorganisme, dans une masse ou un volume déterminé, quand les essais sont effectués selon la présente méthode.

2. Principe

En général, la recherche de *Listeria monocytogenes*, nécessite au moins quatre étapes successives telles que décrites de (2.1) à (2.4). Et tel qu'illustré également par la représentation schématique du mode opératoire suivant :

Figure 1**2.1 Enrichissement primaire en milieu sélectif liquide**

Prise d'essai de 25 gr ou 25 ml d'échantillon dans le milieu sélectif Fraser au demi. Incubation à 30° C pendant 18 à 24 h

2.2 Enrichissement secondaire et isolement primaire.

Après la période d'incubation du milieu (2.1) procéder :
* d'une part, à l'enrichissement secondaire dans du bouillon Fraser en tubes à raison de 0,1 ml de la solution obtenue en (2.1), à incuber à 37°C pendant 24h,

* et d'autre part, à l'isolement primaire par stries sur une plaque de gélose Oxford ou Palcam. L'incubation se fera à 37°C pendant 24 à 48 heures.

2.3 Confirmation

Après la période d'incubation des milieux (2.2) procéder :

* d'une part, à l'isolement secondaire par stries sur une plaque de gélose Oxford ou Palcam, à partir du bouillon d'enrichissement secondaire. L'incubation se fera à 37°C pendant 24 à 48 heures,

* et d'autre part, à la lecture des plaques de gélose Oxford ou Palcam. Observer les colonies caractéristiques, et repiquer trois à cinq d'entre elles sur milieu TSYEA en vue d'une purification. L'incubation des plaques de gélose TSYEA se fera à 37°C pendant 24 à 48 heures.

2.4 Identification biochimique

Après la période d'incubation, procéder d'abord :

* à l'identification du genre *Listeria* basée sur l'aspect morphologique des colonies, la coloration de Gram et sur la réaction Catalase,

* puis à l'identification de l'espèce *Listeria monocytogenes*, basée essentiellement sur l'hydrolyse de l'esculine, la mobilité à 22-25°C, les réactions (Vauges Prauskawer VP) et du rouge de méthyle, l'hémolyse ou le Camp-Test, la fermentation du glucose sans gaz, le type respiratoire.

3. Milieux de culture et réactifs**3. 1 Milieux de culture**

3.1.1 Bouillon d'enrichissement primaire : milieu de base.

Composition :

Peptone de protéase.....	5,0 g
Tryptone	5,0 g
Extrait de viande de bœuf	5,0 g
Extrait de levure	5,0 g
NaCl	20,0 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	12,0 g
KH ₂ PO ₄	1,35 g
Esculine	1,0 g
Chlorure de lithium	3,0 g
Eau.....	1000ml

Préparation :

Faire dissoudre les composants dans de l'eau, puis chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,2.

Répartir ensuite le milieu à raison de :

- 225 ml par flacon qui serviront aux enrichissements primaires ;
- 10 ml par tube qui serviront aux enrichissements secondaires.

Stériliser ensuite le milieu à 121°C pendant 15 minutes.

3.1.2 Supplément sélectif pour Bouillon Fraser

Au moment de l'utilisation du bouillon Fraser au demi tout comme le bouillon Fraser, ils doivent être additionnés de leur supplément dont la formule est la suivante :

Acide nalidixique	22,5 mg
Acriflavine	28,125 mg
Citrate de Fer (III) ammoniacal	1,125 mg

Reconstituer stérilement un flacon de supplément par 22,5 ml d'un mélange 1/1 eau/éthanol stérile (soit 11,25 ml d'eau distillée stérile et 11,25 ml d'éthanol).

Mélanger doucement pour dissoudre.

Ajouter ensuite aseptiquement :

* 2,25 ml de la solution ainsi préparée, à 225 ml de bouillon Fraser au demi ;

* 0,10 ml de la solution ainsi préparée, à 10 ml de bouillon Fraser.

Bien mélanger avant d'introduire l'inoculum.

Une fois reconstitué, le supplément doit être maintenu à + 4°C, à l'abri de la lumière et ne doit pas dépasser les 8 jours.

3.1.3. Milieu d'isolement (gélose Oxford) milieu de base

Composition :

Gélose Columbia.....	39 g
Esculine.....	1 g
Citrate de fer(3+) ammoniacal.....	0,5 g
Chlorure de lithium.....	15 g
Eau.....	1000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans de l'eau, puis chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,2 à 25°C. Répartir ensuite le milieu à raison de 225 ml par flacon puis stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

3.1.4 Supplément sélectif pour gélose Oxford.

Composition :

Cycloheximide	200 mg
Sulfate de colistine.....	10 mg
Acriflavine.....	2,5 mg
Céfotétan.....	1 mg
Fosfomycine.....	5 mg
Ethanol.....	2,5 ml
Eau.....	2,5 ml

Préparation :

Dissoudre les ingrédients solides dans le mélange éthanol/ eau. Stériliser par filtration.

Au moment de l'emploi faire fondre le milieu puis le refroidir à une température de l'ordre de 48°C. Ajouter par la suite 2,25 ml du supplément sélectif Oxford reconstitué.

Homogénéiser et couler en boîtes de Pétri stériles.

Laisser solidifier sur paillasse puis les sécher à l'étuve.

Les boîtes ainsi préparées peuvent également être conservées à +4°C pendant 4 à 5 jours.

3.1.5. Milieu d'isolement (gélose Palcam) milieu de base

Composition :

Peptone	23,0 g
Amidon	1,0 g
Agar - Agar	20,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
D(-) mannitol	10,0 g
Ammonium de fer III citrate	0,5 g
Esculine	0,8 g
Glucose	0,5 g
Chlorure de lithium	15,0 g
Rouge de Phénol	0,08 g
Eau	1000 ml

Dissoudre les composants dans de l'eau, puis chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,2 à 25°C. Répartir ensuite le milieu à raison de 225 ml par flacon puis stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

Préparation :

Au moment de l'emploi faire fondre le milieu puis le refroidir à une température de l'ordre de 48°C. Ajouter par la suite 2,25 ml du supplément Palcam reconstitué.

Homogénéiser et couler en boîtes de Pétri stériles.

Laisser solidifier sur paillasse puis les sécher à l'étuve.

Les boîtes ainsi préparées peuvent également être conservées à +4°C pendant 4 à 5 jours.

3.1.6 Milieu de culture gélosé : Tryptone soja extrait de levure (TSYEA)

Composition :

Bouillon tryptone soja	30,0 g
Extrait de levure	6,0 g
Agar Agar (1)	9 à 18,0 g
Eau	1000 ml
Digestat enzymatique de caseïne	17,0 g
Digestat enzymatique de farine de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogénophosphate dipotassique	2,5 g
Glucose	2,5 g

Dissoudre les composants dans de l'eau, puis chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,3 à 25°C. Répartir ensuite le milieu à raison de 225 ml par flacon puis stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

Au moment de l'emploi, faire fondre le milieu puis le refroidir à une température de l'ordre de 48°C. Couler en boîtes de Pétri, laisser solidifier sur paillasse puis les sécher à l'étuve.

Les boîtes ainsi préparées peuvent également être conservées à +4°C pendant 4 à 5 jours.

(1) selon le pouvoir gélifiant de l'Agar-Agar

3.1.7 Gélose au sang

Base de gélose au sang n° 2 (1)..... 40 g
Eau 1000 ml

Composition :

Peptone de protéose 15 g
Digestat de foie 2,5 g
Extrait de levure 5 g
Chlorure de sodium 5 g
Agar-Agar (selon le pouvoir gélifiant de l'agar) 12 à 18 g

Préparation

- Dissoudre la base de gélose au sang déshydratée dans l'eau, en portant à ébullition.
- Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 à 25° C.
- Répartir la base dans des flacons de 500 ml de capacité maximale.
- Stériliser à l'autoclave (4.1.1.2) réglé à 121° C pendant 15 minutes.
- Refroidir le milieu à 45° C. Ajouter le sang défibriné et bien mélanger.
- Répartir le milieu par quantités d'environ 20 ml dans des boîtes de Pétri stériles et le laisser se solidifier.

3.1.8. Base

Protéose peptone 10 g
Extrait de bœuf 1 g
Chlorure de sodium 5 g
Pourpre de bromocrésol 0,02 g
Eau 1000 ml

3.1.8.1 Préparation

- Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition.
- Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 6,8 à 25° C.
- Répartir dans des tubes par quantités telles qu'après il reste 9 ml.
- Stériliser à l'autoclave (4.1.1.2) réglé à 121° C pendant 20 minutes.

3.1.8.2 Solutions d'hydrates de carbone**Composition :**

Hydrate de carbone (2) 5 g
Eau 100 ml

Préparation

Dissoudre séparément chaque hydrate de carbone.

3.1.8.3 Milieu complet

Pour chacun des hydrates de carbone, ajouter aseptiquement 1 ml de solution (3.1.8.2) à 9 ml milieu de base (3.1.8.1).

Si de plus petits volumes de milieu de base ont été préparés, ajouter alors également de plus petits volumes de solution d'hydrate de carbone.

(1) Composition de la base de gélose au sang n° 2.

(2) 100 ml de solution de L-raminose et 100 ml de solution de D-xylose sont nécessaires.

3.1.9 Milieu de mobilité**Composition :**

Peptone de caséine 20,0 g
Peptone de viande 6,1 g
Agar-agar 3,5 g
Eau 1000 ml

Préparation

- Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition.
- Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,3 à 25° C.
- Répartir dans des tubes par quantités d'environ 5 ml.
- Stériliser à l'autoclave (4.1.1.2) réglé à 121° C pendant 15 minutes.

3.1.10 Essai de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen)

Les boîtes de gélose au sang (3.1.7) peuvent convenir pour cet essai, mais il est préférable d'utiliser des boîtes de Pétri à très minces couches de gélose au sang de mouton (3.1.10.3).

3.1.10.1 Base**Composition :**

Base de gélose au sang n° 2 (voir 3.1.7) 40 g
Eau 1000 ml

Préparation

- Dissoudre la base déshydratée dans l'eau en portant à ébullition.
- Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25° C.
- Répartir dans des tubes ou des flacons par quantités de 100 ml.
- Stériliser l'autoclave (4.1.1.2) réglé à 121° C pendant 15 min. Laisser refroidir à 45° C.

3.1.10.2 Milieu au sang**Composition :**

Couche de base (3.1.10.1) 100 ml
Sang défibriné de cheval ou de mouton 7 ml

Préparation

Ajouter le sang défibriné à la base fondue et stérilisée (3.1.10.1).

3.1.10.3 Milieu complet

— Répartir la base (3.1.8.1) dans des boîtes de Pétri stériles par quantités d'environ 10 ml et laisser se solidifier. Verser une très fine couche du milieu de sang (3.1.10.2) en utilisant des quantités n'excédant pas 3 ml par boîte.

— Laisser se solidifier en une pellicule uniforme. Si le sang est ajouté à des boîtes contenant la base préparée à l'avance, il peut s'avérer nécessaire de chauffer les boîtes pendant 20 min. en les plaçant dans une étuve réglée à 37° C avant de verser la pellicule de sang.

— Sécher les boîtes avant l'emploi.

3.1.10.4 Cultures de réaction CAMP

Une souche faiblement β -hémolytique de *Staphylococcus aureus* (par exemple, NCTC 1803) et une souche de *Rhodococcus equi* (par exemple, NCTC 1621) sont nécessaires pour réaliser l'essai de CAMP. Toutes les souches de *Staphylococcus aureus* ne se prêtent pas à l'essai de CAMP.

— Conserver les cultures de *S. aureus*, *R. equi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *L. ivanovii* en ensemençant les tubes inclinés de TSYEA (3.1.6), et en incubant à 37° C pendant 24 h à 48 h, ou jusqu'à ce qu'une croissance se produise, et les conserver au réfrigérateur (4.1.10) à 4° C.

— Repiquer les cultures au moins 1 fois par mois.

3.2 Réactif-Solution de peroxyde d'hydrogène, 3% (V/V)

4. Appareillage et verrerie

Stéiliser tous les appareils qui entreront en contact avec les milieux de culture, le liquide de dilution ou l'échantillon, sauf s'il s'agit d'appareils livrés en condition stérile (en particulier les appareils en matière plastique).

4.1 Appareillage

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

4.1.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

4.1.1.1 Four, réglable à 173° C $\pm$ 3.

4.1.1.2 Autoclave, réglable à 121° C $\pm$ 1.

4.1.2. Etuve, réglable à 30° C $\pm$ 1.

4.1.3 Etuve, réglable à 37° C $\pm$ 1.

4.1.4 Etuve, réglable à 25° C $\pm$ 1.

4.1.5 Bains d'eau, réglables à 45° C $\pm$ 1 ou à 37° C $\pm$ 1.

4.1.6 Appareillage pour l'homogénéisation

Utiliser l'un des appareils suivants :

a) **homogénéisateur rotatif**, dont la fréquence de rotation est comprise entre 8000 tours/ min et 45000 tours/ min, avec des bols en verre ou en métal, munis de couvercles résistant aux conditions de stérilisation; ou

b) **homogénéisateur de type péristaltique (stomacher)**, avec des sacs stériles en matière plastique.

Les bols ou les sacs en matière plastique doivent avoir une capacité suffisante pour permettre de mélanger correctement la prise d'essai avec la quantité appropriée de diluant. En général, le volume du récipient doit être environ le double du volume de la prise d'essai additionnée du diluant.

4.1.7 **Anses bouclées**, en platine/iridié ou en nickel-chrome, ou en matière plastique, d'environ 3 mm de diamètre.

4.1.8 **Fil d'ensemencement**, en platine/iridié, en nickel-chrome ou en matière plastique.

4.1.9 **pH-mètre à température compensée** pour mesurer le pH des milieux préparés et des réactifs, précis à $\pm$ 0,1 unité de pH à 25° C.

4.1.10 **Réfrigérateur** pour conserver les milieux préparés et les réactifs, pouvant fonctionner à une température comprise entre +2° C et +5° C.

4.1.11 **Faisceau de lumière blanche**

4.1.12 **Miroir**, plat ou concave.

4.1.13 **Trépied**, pour éclairer les boîtes de Pétri.

4.1.14 **Microscope** à contraste de phase, avec objectif à immersion à l'huile.

4.2 Verrerie

La verrerie doit résister à des stérilisations répétées.

4.2.1 **Flacons de culture**, pour la stérilisation et la conservation de milieux de culture et l'incubation de milieux liquides.

4.2.2 **Tubes de culture**, de 16 mm de diamètre et 125 mm de longueur. (Des tubes à couvercle métallique peuvent être utilisés).

4.2.3 **Eprouvettes graduées**, pour la préparation des milieux complets.

4.2.4 **Pipettes graduées**, de 25 ml, 10 ml et 1 ml de capacité, graduées respectivement en 0,5 ml, 0,5 ml et 0,1 ml.

4.2.5 **Boîtes de Pétri stériles**.

4.2.6 **Lames** pour microscope.

4.2.7 **Billes en verre**.

5. Echantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

Il convient de suivre les instructions pour l'échantillonnage à des fins microbiologiques.

6. Préparation de l'échantillon

6.1 Lait

Agiter soigneusement l'échantillon afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des microorganismes, en retournant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien la laisser se disperser si elle se forme. L'intervalle de temps entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 min.

6.2 Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre, lactose, caséine, caséinate

Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en secouant et en retournant manuellement de façon répétée. Si le récipient est trop rempli pour permettre une bonne agitation, transférer dans un récipient plus grand, puis mélanger.

6.3 Beurre

Faire fondre l'échantillon dans un récipient stérile dans un bain d'eau (4.1.5) maintenu à 45° C. Agiter pendant la fusion et retirer immédiatement le récipient du bain d'eau dès que l'échantillon est juste fondu.

6.4 Fromage

Normalement, l'échantillon pour laboratoire peut être composé de la pâte et de la croûte. Les portions du fromage constituant l'échantillon pour essai devront faire l'objet d'un accord entre les parties intéressées concernées.

Opérer comme décrit au point (7.1.5).

6.5 Glaces de consommation

Procéder comme dans le cas du beurre (6.3) mais utiliser un bain d'eau (4.1.5) maintenu à une température inférieure à 37° C, ne doit pas dépasser cette température.

6.6 Lait fermentés, yaourts, crèmes desserts

Mélanger le contenu du récipient fermé en secouant et en retournant manuellement de façon répétée, ou ouvrir le récipient et mélanger le contenu aseptiquement en utilisant une spatule ou une cuillère stérile.

7. Mode opératoire

7.1 Ensemencement du milieu d'enrichissement

Pour examiner plus d'une prise d'essai de 25 g d'un lot spécifié de lait ou de produit laitier et que l'on peut prouver que le groupement (mise en commun des diverses prises d'essai) n'affectera pas le résultat pour le lait ou les produits laitiers, les prises d'essai peuvent être regroupées. Par exemple, s'il faut examiner 10 prises d'essai de 25 g, on pourra regrouper les 10 unités pour former une seule prise d'essai de 250 g et la dissoudre ou la mélanger dans 2,25 l de milieu d'enrichissement.

Ajouter une prise d'essai au milieu d'enrichissement (3.1.1) comme décrit de (7.1.1) à (7.1.7).

7.1.1 Lait

Ajouter 25 ml de la prise d'essai à 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1) et mélanger.

7.1.2 Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre et caséinate

Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1). Dissoudre en agitant.

7.1.3 Caséine

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans le récipient stérile de l'homogénéisateur (4.1.6) et ajouter 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1) à 45° C.

— Dissoudre soigneusement la prise d'essai par homogénéisation (1 min à 3 minutes).

7.1.4 Beurre

Agiter l'échantillon pour essai fondu, puis à l'aide d'une pipette chauffée à environ 45° C, transférer 25 ml dans un flacon contenant 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1). Mélanger soigneusement.

7.1.5 Fromage

— Peser 25 g de l'échantillon pour essai dans le récipient stérile de l'homogénéisateur, (4.1.6).

— Ajouter 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1) préchauffé à 37° C environ. Mélanger soigneusement la prise d'essai par homogénéisation.

7.1.6 Produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation)

Transférer 25 g de l'échantillon pour essai fondu à l'aide d'une pipette dans un flacon contenant 225 ml de milieu d'enrichissement (2.1) et mélanger.

7.1.7 Lait fermentés, yaourts, crèmes et desserts

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché et contenant des billes en verre (4.2.7) et 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1).

— Mélanger en agitant.

Si l'on examine des échantillons à basse valeur de pH, vérifier aseptiquement le pH de la suspension avec un papier indicateur coloré et, si nécessaire, l'ajuster à 7,0 ± 0,5 à 25° C.

7.2 Incubation

Incuber le milieu d'enrichissement ensemencé pendant 48 h dans l'étuve (4.1.2) réglée à 30° C.

7.3 Isolement et identification présumée

7.3.1 Ensemencer en stries avec une anse (4.1.7) à partir du milieu d'enrichissement la surface d'une boîte de gélose d'Oxford (3.1.3) pour obtenir des colonies bien isolées.

7.3.2 Retourner la boîte et la placer dans l'étuve (4.1.3) réglée à 37° C pendant 48 h.

7.3.3 Examiner la boîte pour vérifier la présence de colonies typiques de *Listeria spp.* (colonies entourées par des halos bruns foncés ou noirs).

7.4 Confirmation

7.4.1 Sélection de colonies pour confirmation

A partir de chaque boîte de milieu d'isolement (gélose d'Oxford), (3.1.3), sélectionner cinq colonies typiques ou suspectes ou, s'il y a moins de cinq colonies, sélectionner toutes les colonies pour confirmation.

7.4.2 Incubation

Ensemencer en stries les colonies sélectionnées sur la surface des boîtes par (TSYEA) (7.3.2) d'une façon permettant aux colonies bien isolées de se développer. Placer les boîtes dans l'étuve (4.1.3) réglée à 37° C pendant 24 h ou jusqu'à ce que la croissance soit satisfaisante.

L'épaisseur du milieu de gélose (15 ml/boîte) est importante pour une bonne illumination de Henry (voir ci-dessous).

Examiner les boîtes à l'aide d'un faisceau de lumière blanche (4.1.11), suffisamment puissante pour bien éclairer les boîtes et orienté de façon à éclairer le fond de la boîte sous un angle de 45° (voir figure 2).

Lorsqu'on examine sous cette lumière en éclairage oblique (illumination de Henry) en regardant le dessus de la boîte, les colonies de *Listeria spp.* sont de couleur bleue, et présentent une surface granuleuse.

Si les boîtes (TSYEA) ne présentent pas de grandes colonies typiques bien isolées, il convient d'ensemencer à nouveau en stries une colonie et de procéder comme décrit précédemment.

7.4.3 Réaction par catalase

Prélever une colonie typique et la mettre en suspension dans une goutte de solution de peroxyde d'hydrogène à 3% (3.2) sur une lame.

La présence de *Listeria spp.* positives par catalase est démontrée par la formation de bulles de gaz.

7.4.4 Morphologie et propriétés de coloration

7.4.4.1 Préparer une culture dans le milieu (TSYEA) (3.1.6) correspondant à une colonie typique utilisée dans la réaction hémolytique (7.4.5).

Choisir une colonie typique et la mettre en suspension dans un tube contenant du TSYEA. Incuber dans l'étuve (4.1.4) réglée entre 20° C et 25° C jusqu'à l'apparition d'un trouble important (entre 8 h et 24 h).

Examen des boîtes pour détecter des colonies suspectes

Réaliser une préparation humide en utilisant une anse remplie de culture incubée et l'examiner au microscope (4.1.4). Les *Listeria spp.* se présentent sous forme de minces bâtonnets courts ayant une mobilité lente en pirouette.

Des cultures développées à une température supérieure à 25° C peuvent ne pas présenter cette mobilité. Il faut toujours comparer avec une culture connue. Les *cocci*, les grands bâtonnets ou les bâtonnets présentant une mobilité rapide ne sont pas des *Listeria spp.*

Un essai complémentaire de contrôle de la mobilité peut être effectué en ensemençant, avec un fil à ensemencement (4.1.8), le milieu de mobilité (3.1.9) par piqûres avec une culture prélevée à partir d'une colonie typique de (TSYEA) (7.4.2) et incuber dans l'étuve (4.1.4) réglée à 25° C pendant 48 h.

— Examiner la croissance autour des piqûres. Les *Listeria spp.* sont mobiles et produisent un motif de croissance typique en ombrelle.

En cas de résultat négatif, incuber pendant 5 jours supplémentaires et observer à nouveau les piqûres.

7.4.4.2 Effectuer un essai sur une colonie typique sur (TSYEA) (7.4.2) pour la réaction de Gram. Les *Listeria spp.* sont des germes Gram positif.

7.4.5 Hémolyse

— Si les caractéristiques morphologiques et physiologiques et la réaction par catalase indiquent la présence de *Listeria spp.*, ensemencer les boîtes de gélose au sang (3.1.7) pour déterminer la réaction hémolytique.

— Bien sécher la surface de gélose avant l'utilisation. Tracer une grille sur le fond de la boîte pour définir une trame de 20 à 25 espaces par boîte.

— Prendre une colonie typique à partir de la boîte (TSYEA) et inoculer un espace pour chaque culture à l'aide d'un fil d'ensemencement (4.1.8).

— Piquer simultanément des cultures de contrôle positives et négatives (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. innocua*).

Après incubation à 37° C pendant 48 h dans l'étuve (4.1.3), examiner les souches d'essai et les cultures de contrôle.

— Les *L. monocytogenes* présentent des zones claires étroites et légères (l'hémolyse); les *L. innocua* ne doivent présenter aucune zone claire autour du point de piqûre.

— Les *L. ivanovii* présentent habituellement des zones larges et bien délimitées de fi-hémolyse. Maintenir les boîtes sous une lumière vive pour comparer les cultures en essai avec des cultures de contrôle.

7.4.6 Confirmation biochimique

Pour ces essais, utiliser une culture dans du TSYEA (7.4.4.1).

7.4.6.1 Utilisation d'hydrate de carbone

— Ensemencer chacun des bouillons de fermentation d'hydrate de carbone (3.1.8.2) avec le contenu d'une anse ou 0,1 ml de culture (TSYEA) (7.4.6).

— Incuber à 37° C dans l'étuve (4.1.3) pendant 7 jours.

Toutefois, les réactions positives (formation d'acide) sont révélées par une coloration jaune et se produisent généralement dans un délai de 24 h à 48 h.

7.4.6.2 Essai de CAMP

Ensemencer en stries les cultures de *S. aureus* et *R. equi* en lignes simples en travers de la boîte de gélose au sang (3.1.7 ou 3.1.10) de telle sorte que les 2 cultures soient parallèles et diamétralement opposées (voir figure 3).

Il est nécessaire d'avoir un inoculum fin et égal. Ceci peut être obtenu en utilisant une aiguille d'ensemencement (4.1.8) ou une anse (4.1.7) maintenue à angle droit par rapport à la gélose.

Ensemencer en stries la souche d'essai de façon similaire à angle droit par rapport à ces cultures de telle sorte que la culture d'essai et les cultures de réaction ne se touchent pas mais soient distantes d'environ 1 mm à 2 mm en leur écart le plus proche.

Plusieurs souches d'essai peuvent être ensemencées en stries sur la même boîte.

— Simultanément, ensemencer en stries les cultures de contrôle de *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *L. ivanovii*. Si la gélose au sang (3.1.7) est utilisée incuber les boîtes à 37° C pendant 18 h à 24 h, dans l'étuve (4.1.3). Si des boîtes à double souches sont utilisées incuber à 37° C pendant 12 h à 18 h, dans l'étuve (4.1.3).

Considérer la réaction comme positive s'il y a une zone développée de fi-hémolyse à l'intersection de la souche d'essai et de la culture de *S. aureus* une réaction positive.

La réaction positive avec *R. equi* se traduit par la présence d'une large «tête de flèche» (5 mm à 10 mm) d'hémolyse.

Ceci se traduit par une petite zone arrondie d'hémolyse développée, s'étendant seulement sur environ 2 mm à partir de la souche d'essai et à l'intérieur de la zone faiblement hémolytique due à la croissance de la culture de *S. aureus*. Une réaction similaire peut être observée à l'intérieur de la culture d'essai avec *R. equi*, mais elle est considérée comme négative.

Il n'apparaît pas de grandes zones d'hémolyse autour de la culture *S. aureus*.

7.5 Interprétation des propriétés morphologiques et physiologiques et de la réaction biochimique (voir tableau 1)

— Toutes les *Listeria* spp. se présentent sous forme de petits bâtonnets Gram positifs (uniquement avec les cultures de 24h) qui présentent une mobilité à l'état frais et dans le milieu de mobilité.

— Elles sont positives à la catalase. Les *L. monocytogenes* utilisent la rhamnose mais pas la xylose.

— Les *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. seeligeri* (réaction faible) produisent une a-hémolyse dans les ensemencements sur la gélose au sang.

Retirer la colonie pour examiner l'hémolyse en dessous de la colonie. Sur les trois *Listeria* spp. hémolytiques, seule la *L. monocytogenes* n'utilise pas la xylose et s'avère positive pour ce qui concerne l'utilisation de rhamnose.

— *L. monocytogenes* et *L. seetigeri* (réactions faibles) présentent une réaction positive à l'essai de CAMP avec *S. aureus* mais pas avec *R. equi*.

— *L. ivanovii* réagit avec *R. equi* mais pas avec *S. aureus*. Les autres *Listeria* spp. présentent des réactions négatives à l'essai de CAMP avec les deux cultures de réaction.

7.6 Confirmation définitive

Les souches qui sont considérées comme étant des *Listeria* spp. (7.5) peuvent être confirmées par une identification définitive.

— Avec le lait cru, il a parfois été observé, qu'en procédant à un repiquage du bouillon d'enrichissement après incubation pendant 24 h et 48 h, on pouvait améliorer la sensibilité de la méthode.

— On a observé que la méthode est moins sensible pour certains fromages à croûte lavée et certains fromages persillés que pour d'autres produits (ainsi, la sensibilité de la méthode pour le fromage Limburger est plus faible à des concentrations de *L. monocytogenes* inférieures à deux par gramme environ). Pour certains types de fromages, l'incubation du bouillon d'enrichissement doit être étendue à 7 jours.

Lorsque le bouillon d'enrichissement a été incubé pendant 48 h, puis après 7 jours, il convient d'ensemencer les boîtes de milieu d'isolement.

— Il est possible d'utiliser la méthode pour la détection de *L. monocytogenes* dans des échantillons prélevés sur les sites de production. Toutefois, aucun essai en commun n'a encore été entrepris pour savoir si cet organisme est retrouvé dans ces échantillons.

7.7 Cultures de contrôle

Afin de s'assurer que les milieux d'enrichissement et d'identification sont capables de permettre la croissance des *L. monocytogenes*, introduire une dilution de la culture de référence de souches récemment isolées, dans un flacon de contrôle du milieu d'enrichissement (voir 7-2). Ajouter 10 à 100 cellules de *L. monocytogenes* par flacon.

Procéder avec les flacons de contrôle de la même façon qu'avec les cultures d'essai pour démontrer que la culture de contrôle positive est retrouvée.

8. Expression des résultats

Selon l'interprétation des résultats qui a été faite signaler la présence ou l'absence de *L. monocytogenes* dans la prise d'essai, en spécifiant la masse en grammes ou le volume en millilitres de l'échantillon soumis à l'essai.

9. Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué, si elle est connue, la méthode utilisée, le résultat d'essai obtenu, et si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le résultat d'essai.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Tableau 1 – Réaction pour l'identification de *Listeria* spp

Espèce	Production d'acide		Essai de CAMP	
	Raminose	Xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. équi</i>
<i>L. monocytogènes</i>	+	—	+	—
<i>L. innocua</i>	V	—	—	—
<i>L. ivanovii</i>	—	+	—	+
<i>L. seeligeri</i>	—	+	(+)	—
<i>L. welshimeri</i>	V	+	—	—
<i>L. grayi</i>	—	—	—	—
<i>L. murrayi</i>	V	—	—	—
V = réaction variable (+) = réaction faible + = réaction positive — = pas de réaction				

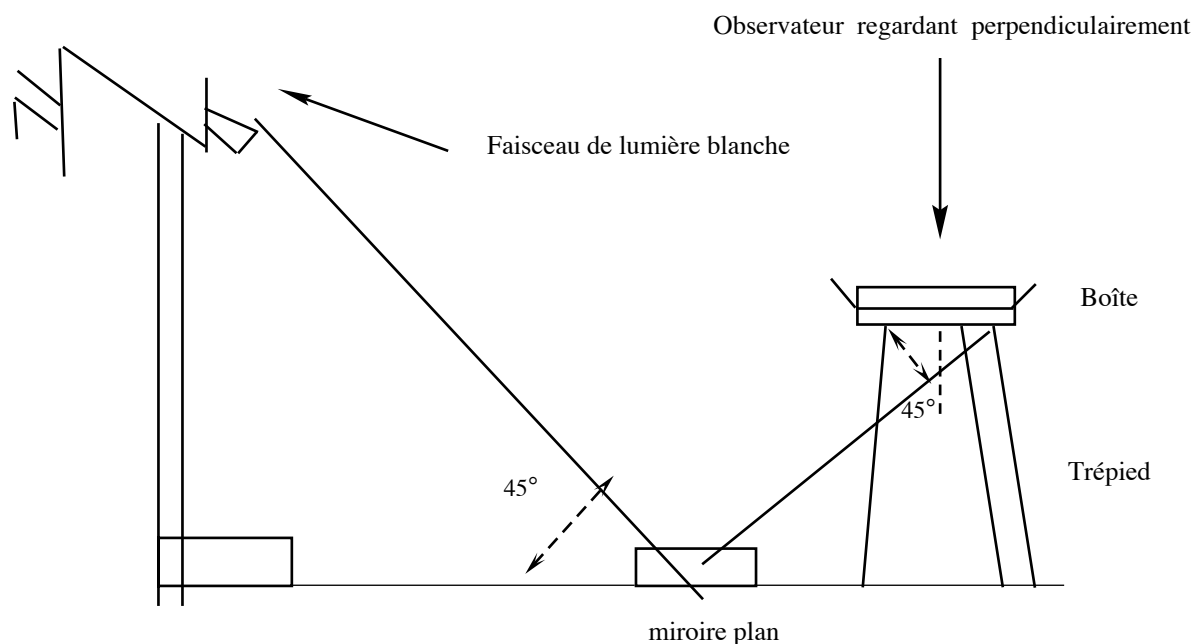


Figure 2- Examen des boîtes pour déceler des colonies suspectes

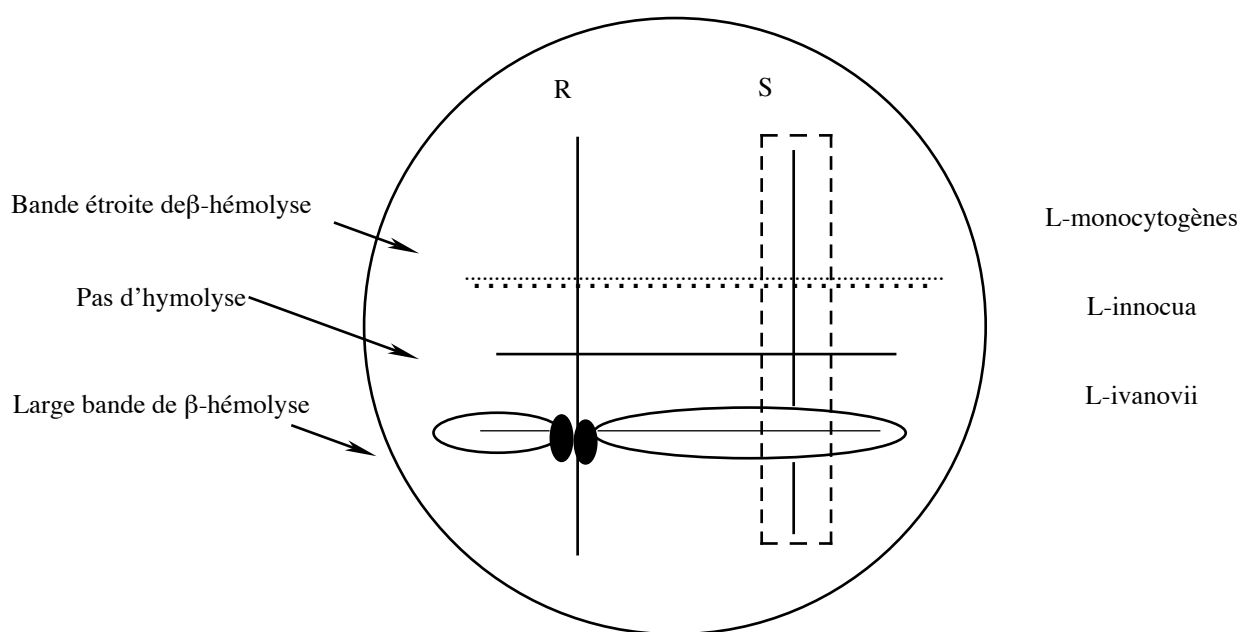


Figure 3- Ensemencement des boîtes pour l'essai de CAMP

Remarques

- 1- Ensemencement de fines boîtes de gélose au sang comme illustré sur le diagramme. Les lignes verticales représentent les stries de *S. aureus* (S). Les lignes horizontales représentent les stries des cultures d'essai les parties hachurées indiquent les zones d'hémolyse développée.
- 2- La partie en pointillés délimite la zone d'influence de la culture de *S. aureus*.