

6. Recherche des Salmonella

6.1 Utiliser les milieux complets déshydratés correspondant aux indications données ci-dessous.

6.2 Mode opératoire

6.2.1 Préenrichissement

Afin de réduire la charge de travail, prélever aseptiquement de chacune des cinq unités, 250 ml de lait et les rassembler dans un récipient stérile de 1,5 à 2 litres.

Abandonner à la température ambiante pendant 1 heure, si nécessaire, ajuster le pH à 6,8 environ. Introduire aseptiquement 2,25ml d'une solution aqueuse à 1 % de vert brillant. Mélanger soigneusement.

Incuber à l'étuve à 37° C pendant 20h ± 2 heures.

6.2.2 Enrichissement

Introduire 10 ml de lait préenrichi dans 100 ml de bouillon Muller Kauffmann au tétrathionate et au vert brillant ; faire incuber dans un bain d'eau à 43°C ± 1 pendant quarante-huit heures. Et dans 100 ml de bouillon au sélénite-cystine, faire incuber à l'étuve à 37°C ± 1 pendant quarante-huit heures.

6.2.3 Isolement

Après l'incubation, pratiquer à partir de chaque bouillon des isolements. Effectuer les isolements à la surface de deux milieux sélectifs solides coulés de préférence dans des boîtes de Pétri de 140 mm.

Utiliser la gélose au vert brillant et au rouge de phénol, et la gélose au sulfate de bismuth.

En raison de l'existence possible de Salmonella atypiques, lactose +, on peut substituer la gélose au vert brillant et au rouge de phénol par un autre milieu sélectif, par exemple : la gélose XLD, la gélose Hektoen.

Retourner les boîtes à l'étuve à 37° C pendant dix huit à vingt heures. Si le développement est insuffisant, poursuivre l'incubation.

Soumettre aux épreuves biochimiques classiques un nombre suffisant de colonies caractéristiques ou douteuses.



Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes pour les crèmes glacées et les glaces au lait.

Le ministre du commerce,

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 une méthode de dénombrement des coliformes pour les crèmes glacées et les glaces au lait.

Art. 2. — Pour le dénombrement des coliformes dans les crèmes glacées et les glaces au lait, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode 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 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

METHODE DE DENOMBREMENT DES COLIFORMES DANS LES CREMES GLACEES ET LES GLACES AU LAIT

1. DEFINITION

On appelle "coliformes", les bactéries en forme de bâtonnets, Gram négatives, aérobies et facultativement anaérobies, non sporulées, qui fermentent le lactose avec formation de gaz et d'acide.

2. PRINCIPE DE LA METHODE

2.1 Méthode de référence

Trois séries de dilutions en parallèle obtenues à partir de l'échantillon du produit servant à ensemencer le milieu liquide sélectif «Vert Brillant lactosé à la bile de bœuf» dans des tubes à essai contenant de petits tubes de Durham. On incube les tubes pendant 48 heures + 2 h à 30°C ± 1.

Les tubes positifs (production de gaz dans les tubes de Durham) seront soumis à confirmation par repiquage d'une ose dans un nouveau tube du même milieu. A partir des tubes pour lesquels le test est positif, après confirmation, on détermine le nombre le plus probable de bactéries coliformes par g du produit en se référant au tableau du nombre le plus probable (NPP) pour trois séries parallèles.

2.2 Méthode de routine

On ensemence le milieu solide « Rouge Violet Bile Agar » coulé en boîtes de Pétri, avec une série de dilutions de l'échantillon du produit. Après une incubation de $22\text{h} \pm 2\text{h}$ à $30^\circ\text{C} \pm 1$, on compte le nombre de colonies rouges caractéristiques. Ce nombre, après avoir été multiplié par le facteur de dilution, exprime le nombre de bactéries coliformes par g du produit.

(La méthode au vert brillant figurant au paragraphe 2.1 peut également, après modification, être utilisée en tant que méthode de routine. Dans ce cas, on omettra l'ensemencement en séries parallèles nécessaires à l'utilisation du tableau du NPP et la confirmation des tubes positifs).

3. ECHANTILLONNAGE

3.1 Echantillonnage de laboratoire

3.1.1 Dans le cas des crèmes glacées ou glaces au lait se présentant sous la forme de petits emballages, on prélèvera des unités complètes dans leur emballage d'origine.

3.1.2 Dans le cas de crèmes glacées et de glaces au lait en vrac (pour la vente dans les tea-rooms, dans les restaurants, ou par distributeurs automatiques pour self service, etc.) ; et en grands emballages, on prélèvera, en s'entourant de précautions aseptiques, 30 à 50 grammes du produit au total en procédant par sondage à des endroits aussi variés que possible. Ces échantillons seront conservés à -5°C dans des flacons à large col, munis de couvercle à vis.

3.1.3 Les échantillons (3.1.1 et 3.1.2) devront être maintenus congelés avant l'analyse. Ils seront transportés au laboratoire pour analyse, dans des récipients réfrigérés. L'analyse devra de préférence être effectuée immédiatement.

Dans le cas contraire, conserver les échantillons dans une enceinte réfrigérée à -15°C maximum.

3.2 Préparation des échantillons

3.2.1 Avant ensemencement du milieu, les échantillons seront liquéfiés de la façon suivante :

Dans le cas des échantillons prélevés selon 3.11 : ôter l'emballage et disposer les échantillons dans un récipient stérile en verre que l'on refermera.

Dans le cas des échantillons prélevés selon 3.12 : les maintenir dans les flacons.

Ces deux types d'échantillons seront liquéfiés, dans les récipients ou les flacons, en les plaçant, juste le temps nécessaire à leur fusion, au bain-marie ou dans un incubateur, à $45^\circ\text{C} \pm 1$.

3.2.2 Mélanger intimement les échantillons liquéfiés et prélever, en s'entourant de précautions aseptiques, 10 grammes (ou un poids voisin exactement connu) dans un flacon cylindre - conique contenant des perles de verre. On pourra se servir à cet effet d'une cuillère ou d'une pipette, en fonction de la consistance du produit.

3.2.3 A ces 10 g (ou à un poids voisin de ces 10 g) ajouter dans le flacon contenant des perles de verre, 90 ml (ou 9 fois le poids voisin de 10 g exactement connu), d'une solution de Ringer au quart préalablement chauffée à 45°C . Après avoir bouché le flacon, agiter le contenu vingt fois par des mouvements d'une amplitude de 30 cm environ.

4. APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire.

5. MILIEUX DE CULTURE

5.1 La composition du milieu « Vert Brillant lactosé à la bile de bœuf » est la suivante :

Peptone.....	10 g
Lactose	10 g
Bile de bœuf déshydratée.....	20 g
Vert brillant.....	0,0133 g
Eau distillée (dans un appareil en verre).....	1000 ml

5.2 Pour préparer 1000 ml du milieu, dissoudre peptone et lactose dans environ 500 ml d'eau distillée. Dissoudre 20 g de bile de bœuf anhydre dans 200 ml d'eau distillée. Le pH de cette solution doit être compris entre 7,0 et 7,5. Mélanger les deux solutions; ajuster le pH, mesuré à l'aide d'une électrode en verre à 7,4; ajouter 13,3 ml d'une solution aqueuse à 0,1% de vert brillant. Le volume est à compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

5.3 Verser 10 ml du milieu (5.2) dans les tubes à essai. Ces tubes sont munis de tubes de Durham. Après le remplissage, stériliser pendant 15 minutes dans des autoclaves réglés à 121°C . Après stérilisation, le pH doit être de $7,2 \pm 0,1$.

Pour les ensemencements de 10 g, les constituants du milieu doivent être augmentés de 100% et les tubes à essai munis de tubes Durham doivent recevoir 10 ml du milieu.

5.4 La composition du milieu « Rouge Violet Bile Agar » suivante :

Extrait de levure.....	3 g
Peptone	7 g
Sels biliaires.....	1,5 g
Lactose	10 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Rouge neutre.....	0,03 g
Cristal violet.....	0,002 g
Gélose.....	10 à 15 g
(en fonction des propriétés gélifiantes de la gélose utilisée).	

5.5 Dissoudre les ingrédients dans de l'eau distillée ; laisser reposer pendant quelques minutes ; mélanger ensuite énergiquement et ajuster le pH à 7,4 en le mesurant à l'aide d'une électrode de verre. Porter à ébullition en agitant de temps en temps; laisser bouillir pendant deux minutes. Refroidir le milieu à 45°C environ et en couler 10 ml par boîte de Pétri.

5.6 Le milieu doit être préparé peu avant l'utilisation et ne doit pas être stérilisé à l'autoclave, ce qui atténuerait sa sélectivité. Le milieu doit être employé, si possible, dans les trois heures suivant sa préparation.

5.7 Il est recommandé d'utiliser pour ces milieux (5.1 et 5.4) une préparation anhydre prête à l'emploi. Dans ce cas, les prescriptions techniques doivent être suivies scrupuleusement et on préparera toujours un témoin.

6. DILUANT

Solution de Ringer au quart. La composition de la solution concentrée est la suivante :

Chlorure de sodium (NaCl).....	9,00 g
Chlorure de potassium (KCl).....	0,42 g
Chlorure de calcium anhydre (CaCl ₂).....	0,24 g
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃).....	0,20 g
Eau distillée (dans un appareil en verre).....	1000 ml

Pour l'emploi, ajouter une partie de la solution précédente, à trois parties d'eau distillée. La solution diluée est stérilisée par chauffage pendant 15 minutes à 120° C.

On peut également employer une solution de peptone à 0,1% en lieu et place de la solution de Ringer diluée au quart.

On peut également utiliser des pastilles prêtes à l'emploi représentant une dose toute préparée.

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.

7. MODE OPERATOIRE

7.1 Préparation des dilutions

7.1.1 Pour l'ensemencement direct du milieu nutritif

Cas de la méthode de référence (2.1) : on introduit 1 ml de l'échantillon dans chacun des trois tubes contenant 10 ml de vert brillant lactosé à la bile de bœuf et un tube de Durham, et on mélange soigneusement cette portion de l'échantillon avec le milieu nutritif en évitant toutefois la formation de bulles d'air dans le tube de Durham.

Cas de la méthode de routine (2.2) : on procède de la même façon que ci-dessus mais on n'ajoute 1 ml de l'échantillon qu'à un seul tube (au lieu de trois). Si on utilise le milieu « Rouge violet Bile Agar », on introduit directement 1 ml de l'échantillon dans une boîte de Pétri.

7.1.2 On procédera comme suit pour les autres dilutions

Inoculer 1 ml du mélange (3.2.3) directement dans le milieu nutritif ou dans les boîtes de Pétri. On obtient ainsi la dilution 10-1.

10 ml du mélange (3.2.3) sont ajoutés à 90 ml d'une solution de Ringer au quart et on inocule 1 ml de ce mélange dans les milieux nutritifs ou dans les boîtes de Pétri. On obtient ainsi la dilution 10-3. On poursuivra de la même façon pour les autres dilutions.

7.2 Ensemencement du milieu

7.2.1 Ensemencement des tubes avec le «Vert Brillant lactosé à la bile de bœuf» :

Ensemencer les tubes avec la quantité désirée de l'échantillon et les dilutions correspondantes à l'aide d'une pipette stérile. Mélanger soigneusement, en évitant d'introduire des bulles d'air dans les tubes de Durham;

Ensemencer en parallèle dans trois tubes chaque quantité d'échantillon et chaque dilution et opérer au moins sur trois dilutions par exemple 1g ; 0,1 g et 0,01 g.

En général, on doit prévoir un nombre de dilutions suffisant pour que les trois tubes parallèles de la dilution la plus élevée demeurent négatifs. Ce n'est que par ce moyen que les résultats les plus exacts peuvent être obtenus.

7.2.2 Ensemencement des boîtes de Pétri

Introduire dans les boîtes 1 ml de l'échantillon, et 1 ml des autres dilutions désirées;

Dans chaque boîte, verser 10 ml du milieu « Rouge Violet Bile Agar » fondu, amené à une température de 45° C.

Immédiatement après avoir versé le milieu, le mélanger à l'inoculum par cinq mouvements de va-et-vient, suivis de cinq mouvements circulaires dans le sens des aiguilles d'une montre, puis de cinq mouvements de va-et-vient exécutés perpendiculairement aux premiers, et enfin de cinq mouvements circulaires en sens contraire des aiguilles d'une montre. Après géification, recouvrir la surface de la boîte de 4 ml de milieu encore liquide et laisser géifier.

7.3 Incubation des tubes et des boîtes de Pétri

7.3.1 Les tubes (par. 7.2) seront incubés pendant 48 h. ± 2 h à 30°C ± 1 .

7.3.2 Les boîtes de Pétri préparées comme décrit au paragraphe 7.2.2 ci-dessus sont incubées pendant 22 h. ± 2 h. à 30°C ± 1 .

La durée d'incubation doit être respectée scrupuleusement.

7.4 Dénombrement des bactéries coliformes

7.4.1 Cas de la méthode de référence (2.1)

Le test est considéré comme positif lorsqu'il y a production visible de gaz dans les tubes de Durham. Le nombre de tubes positifs confirmés (2.1) est déterminant pour la lecture du nombre le plus probable (NPP) de bactéries coliformes selon le tableau ci-dessous, pour trois séries parallèles.

Le NPP détermine le nombre de bactéries coliformes dans le volume de crème glacée ou de glace au lait, en règle générale 1g ou 0,1 g ou 0,01 g avec lequel on a ensemencé en parallèle les 3 premiers tubes à partir desquels on constitue l'index.

Le nombre de bactéries coliformes sera exprimé par le nombre le plus probable (NPP) par 1 g de crème glacée ou glace au lait.

Si tous les tubes sont positifs, il faut répéter l'analyse en utilisant des dilutions plus élevées (par exemple 0,1 g - 0,01 ou 0,001 g ou encore plus élevées). Si l'on trouve un chiffre index ne figurant pas dans le tableau, on peut conclure qu'une erreur a été commise dans les manipulations.

7.4.2 Cas de la méthode de routine (2.2)

7.4.2.1 **Après la durée** d'incubation prescrite ci-dessus, compter à l'œil nu, les colonies rouges caractéristiques des bactéries coliformes;

7.4.2.2 **Au cas où la méthode simplifiée** (par 2.2) faisant appel au Vert Brillant lactosé à la bile de bœuf, est utilisée, il faudra déterminer jusqu'à quelle dilution on peut déceler une formation de gaz dans les tubes de Durham. Une formation positive de gaz indique dans quelle portion de l'échantillon on peut trouver des coliformes.

Les résultats feront donc état de la détection de bactéries coliformes dans 1 g ou 0,1 g ou 0,01 g etc.

8. EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Méthode de référence (2.1)

Nombre le plus probable par g selon le tableau ci-dessous.

8.2 Méthode de routine (2.2)

8.2.1 Nombre de colonies par g = nombre de colonies défini sous 7.4.2.1 multiplié par l'inverse de la dilution.

8.2.2 Si l'on utilise la méthode simplifiée (2.2) indiquer le nombre de coliformes positifs dans 1g, 0,1g ou 0,01 g etc.

9. REPETABILITE

9.1 Méthode de référence (2.1)

La différence entre les résultats de déterminations effectuées en double (résultats obtenus simultanément ou rapidement l'un après l'autre par le même analyste) ne doit pas s'écarter de plus de 30 % du résultat le plus bas.

9.2 Méthode de routine (3.2)

Une seule détermination suffit.

Tableau : NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP) POUR TROIS SERIES PARALLELES

INDEX TUBES POSITIFS DE :			NPP (pour 1 g)	INDEX TUBES POSITIFS DE :			NPP (pour 1 g)
1 g	0,1 g	0,01 g		1 g	0,1 g	0,01 g	
0	0	0	0	2	2	3	4,0
0	0	1	0,3	2	3	0	3,0
0	1	0	0,3	2	3	1	3,5
0	1	1	0,6	2	3	2	4,0
0	2	0	0,6	3	0	0	2,5
1	0	0	0,4	3	0	1	4,0
1	0	1	0,7	3	0	2	6,5
1	0	3	1,1	3	1	0	4,5
1	1	0	0,7	3	1	1	7,5
1	1	1	1,1	3	1	2	11,5
1	2	0	1,1	3	1	3	16,0
1	2	1	1,5	3	2	0	9,5
1	3	0	1,6	3	2	1	15,0
2	0	0	0,9	3	2	2	20,0
2	0	1	1,4	3	2	3	30,0
2	0	2	2,0	3	3	0	25,0
2	1	0	1,5	3	3	1	45,0
2	1	1	2,0	3	3	2	110,0
2	1	2	3,0				
2	2	0	2,0				
2	2	1	3,0				
2	2	2	3,5				