
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour la recherche et le
dénombrement de *Listeria
monocytogenes* —**

Partie 1:

Méthode de recherche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the
detection and enumeration of Listeria monocytogenes —*

ISO 11290-1:1996

Part 1: Detection method

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/siv/e241f5-a05d-4c46-8a53-59b1c7854353/iso-11290-1-1996>



Sommaire

| | Page |
|--------------------|------|
| 1 | 1 |
| 2 | 1 |
| 3 | 1 |
| 4 | 1 |
| 5 | 2 |
| 6 | 3 |
| 7 | 3 |
| 8 | 3 |
| 9 | 4 |
| 10 | 8 |
| 11 | 8 |
| Annexes | |
| A | 9 |
| B | 10 |
| C | 17 |

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11290-1:1996
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e2f41f5-a05d-4c46-8a53-59b1c7854353/iso-11290-1-1996>

© ISO 1996

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

La Norme internationale ISO 11290-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

L'ISO 11290 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de Listeria monocytogenes*:

- *Partie 1: Méthode de recherche*
- *Partie 2: Méthode de dénombrement*

Les annexes A et B font partie intégrante de la présente Norme internationale. L'annexe C est donnée uniquement à titre d'information.

Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que cette méthode horizontale ne convienne pas exactement, dans tous ses détails, pour certains produits pour lesquels il peut être nécessaire d'employer des méthodes différentes ou spécifiques à ces produits. Néanmoins, tous les efforts devront être faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois qu'il sera possible et l'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées.

Lorsque la présente partie de l'ISO 11290 sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure cette méthode horizontale aura été suivie et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut être réalisée de façon immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes Internationales et/ou des normes nationales qui ne concordent pas avec cette méthode horizontale, existent peut-être déjà. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner sur la présente partie de l'ISO 11290, si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11290-1:1996
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e2ef1f5-a05d-4c46-8a53-59b1c7854353/iso-11290-1-1996>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* —

Partie 1: Méthode de recherche

AVERTISSEMENT — Afin de sauvegarder la santé du personnel de laboratoire, il est fortement recommandé que les essais de recherche des *Listeria monocytogenes* soient réalisés dans les laboratoires équipés à cet effet et sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit pris pour se débarrasser des éléments incubés. Il est en particulier fortement recommandé que les femmes enceintes ne manipulent pas de cultures de *L. monocytogenes*.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11290 prescrit une méthode horizontale pour la recherche de *Listeria monocytogenes*.

La présente partie de l'ISO 11290 est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, avec les quelques restrictions signalées dans l'introduction.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 11290. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie de l'ISO 11290 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique*.

ISO 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 11290, les définitions suivantes s'appliquent.

3.1 *Listeria monocytogenes*: Microorganismes formant des colonies typiques sur des milieux sélectifs et possédant les caractéristiques biochimiques, morphologiques et physiologiques décrites lorsque l'essai est effectué conformément à la présente partie de l'ISO 11290.

3.2 recherche de *Listeria monocytogenes*: Détermination de la présence ou de l'absence de ces microorganismes dans une masse ou un volume déterminé(e) de produit, lorsque l'essai est effectué conformément à la présente partie de l'ISO 11290.

4 Principe

Dans le cadre de la présente partie de l'ISO 11290, la recherche de *L. monocytogenes* nécessite quatre phases successives (voir en annexe A une représentation schématique du mode opératoire).

NOTE 1 Les *Listeria* spp. peuvent être présentes en petit nombre et sont souvent accompagnées d'un nombre beaucoup plus élevé d'autres microorganismes appartenant à d'autres genres; un enrichissement sélectif est donc nécessaire. De plus, il est aussi nécessaire de rechercher les *Listeria* spp. ayant subi une altération et le milieu d'enrichissement sélectif primaire, présentant une concentration réduite en inhibiteurs, permet de remplir au moins en partie cette fonction.

4.1 Enrichissement primaire en milieu d'enrichissement sélectif liquide avec concentration réduite en agents sélectifs (bouillon Fraser-demi)

Inoculation d'un milieu d'enrichissement sélectif primaire, contenant un volume de chlorure de lithium et un demi-volume d'acriflavine et d'acide nalidixique (bouillon Fraser-demi), qui est également utilisé comme diluant pour la prise d'essai (9.1).

Incubation de la prise d'essai à 30 °C pendant 24 h.

4.2 Enrichissement secondaire dans un milieu d'enrichissement sélectif liquide avec concentration complète en agents sélectifs (bouillon Fraser)

Inoculation du milieu d'enrichissement secondaire liquide complet (bouillon Fraser) avec une culture obtenue comme indiqué en 4.1.

Incubation du bouillon Fraser à 35 °C ou 37 °C pendant 48 h.

4.3 Isolement et identification

À partir des cultures obtenues en 4.1 et 4.2, isolement sur les deux milieux sélectifs solides:

- a) gélose Oxford;
- b) gélose PALCAM.

Incubation à 30 °C, 35 °C ou 37 °C et examen après 24 h et, si nécessaire, après 48 h, pour détecter la présence de colonies caractéristiques présumées être des *L. monocytogenes*.

4.4 Confirmation

Repiquage des colonies présumées être des *L. monocytogenes*, isolées comme décrit en 4.3, et confirmation au moyen des essais biochimiques, physiologiques et morphologiques appropriés.

5 Milieux de culture et réactifs

5.1 Généralités

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

NOTE 2 En raison du nombre important de milieux de culture et de réactifs, il a été jugé préférable, pour la clarté du texte, de donner leur composition et leur préparation dans l'annexe B.

5.2 Milieu d'enrichissement sélectif primaire: bouillon Fraser avec concentration réduite en agents sélectifs (bouillon Fraser-demi)

Voir article B.1.

5.3 Milieu d'enrichissement sélectif secondaire avec concentration complète en agents sélectifs (bouillon Fraser)

Voir article B.2.

5.4 Milieux d'isolement sélectifs solides

5.4.1 Premier milieu: gélose Oxford

Voir article B.3.

5.4.2 Deuxième milieu: gélose PALCAM

Voir article B.4.

5.5 Milieu de culture solide: Tryptone de soja — extrait de levure (TSYEA)

Voir article B.5.

5.6 Milieu de culture liquide: Tryptone de soja — extrait de levure (TSYEB)

Voir article B.6.

5.7 Gélose au sang de mouton

Voir article B.7.

5.8 Bouillon pour l'utilisation des glucides (rhamnose, xylose)

Voir article B.8.

5.9 Gélose motilité (facultatif)

Voir article B.9.

5.10 Milieu et cultures de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen)

Voir article B.10.

5.11 Solution de peroxyde d'hydrogène

Voir article B.11.

5.12 Tampon (PBS)

Voir article B.12.

6 Appareillage et verrerie

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

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

Voir l'ISO 7218.

6.2 Enceinte de séchage ou étuve, réglable entre 25 °C ± 1 °C et 50 °C ± 1 °C.

6.3 Étuves, permettant de maintenir les milieux inoculés, les boîtes et les flacons à l'intérieur des plages de températures suivantes:

- 25 °C ± 1 °C;
- 30 °C ± 1 °C;
- 35 °C ± 1 °C ou 37 °C ± 1 °C.

6.4 Bains d'eau, réglables à 47 °C ± 2 °C.

6.5 Anse bouclée, d'environ 3 mm de diamètre, et **fil droit** en platine irridié ou en nickel-chrome, ou **pipette Pasteur** ou **anse bouclée à usage unique**.

6.6 pH-mètre, ayant une précision de lecture de ± 0,01 unité pH à 25 °C, permettant de réaliser des mesures précises à ± 0,1 unité pH.

6.7 Tubes à essai, flacons ou fioles, de capacités appropriées, pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture et l'incubation des milieux liquides.

6.8 Éprouvettes graduées, de 50 ml à 1 000 ml de capacité, pour la préparation des dilutions et des milieux complets.

6.9 Pipettes graduées à écoulement total, de 1 ml à 10 ml de capacités nominales, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml.

6.10 Boîtes de Petri, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

6.11 Jarres, pour l'incubation en atmosphère microaérobie (facultatif).

6.12 Mélange gazeux (facultatif), de composition spécifiée pour l'incubation en atmosphère microaérobie:

5 % à 12 % de CO₂, 5 % à 15 % de O₂ et 75 % de N₂.

6.13 Dispositif pour le test d'illumination de Henry (facultatif).

Voir l'annexe C.

6.14 Microscope, de préférence à contraste de phase et avec lame et lamelle.

7 Échantillonnage

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

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 11290. S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique sur l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai et suspension mère

Voir l'ISO 6887 et la Norme internationale spécifique traitant du produit concerné.

Pour la préparation de la suspension mère, utiliser comme diluant le milieu d'enrichissement primaire sélectif spécifié en 5.2.

En général, pour préparer la suspension mère, ajouter une prise d'essai de x g ou x ml dans $9x$ ml ou $9x$ g du milieu d'enrichissement sélectif primaire (5.2), de façon à obtenir un rapport prise d'essai/milieu d'enrichissement de 1/10 (rapport masse/volume ou volume/volume).

9.2 Enrichissement primaire

Incuber à l'étuve [6.3 b)] la suspension mère, préparée selon 9.1, à 30 °C pendant 24 h ± 2 h.

NOTE 3 Une coloration noire peut se développer au cours de l'incubation.

9.3 Enrichissement secondaire

9.3.1 Après incubation de la suspension mère (enrichissement primaire) pendant 24 h ± 2 h (9.2), transférer 0,1 ml de la culture obtenue en 9.2 (quelle que soit sa coloration) dans un tube à essai (6.7) contenant 10 ml du milieu d'enrichissement (bouillon Fraser) (5.3).

9.3.2 Incuber le milieu inoculé (9.3.1) pendant 48 h ± 2 h à 35 °C ou 37 °C.

NOTE 4 Il convient que la température d'incubation du milieu inoculé soit fixée par les parties concernées et indiquée dans le rapport d'essai.

9.4 Isolement et identification

9.4.1 À partir de la culture d'enrichissement primaire, incubée pendant 24 h ± 2 h à 30 °C (9.2), ensemencer, à l'aide d'une anse bouclée ou d'une pipette Pasteur (6.5), la surface du premier milieu d'isolement sélectif (gélose Oxford) (5.4.1) pour obtenir des colonies bien séparées.

Procéder de la même façon avec le deuxième milieu d'isolement sélectif (gélose PALCAM) (5.4.2).

NOTE 5 Cet isolement est pratiqué quelle que soit la coloration du milieu d'enrichissement.

9.4.2 À partir du milieu d'enrichissement secondaire, incubé pendant 48 h ± 2 h à 35 °C ou 37 °C (9.3.2), répéter le mode opératoire décrit en 9.4.1 avec les deux milieux d'isolement sélectifs.

9.4.3 Retourner les boîtes obtenues en 9.4.1 et 9.4.2 et les incuber dans une étuve (6.3) réglée à 30 °C, 35 °C ou 37 °C. Les boîtes de gélose PALCAM sont incubées soit en atmosphère microaérobie dans une jarre (6.11) contenant le mélange gazeux (6.12), soit en atmosphère aérobie.

NOTE 6 Une incubation de la gélose Oxford à 30 °C convient pour des aliments peu contaminés par une flore annexe. Pour des produits fortement contaminés par une flore annexe, il est préférable d'incuber la gélose Oxford à 35 °C ou 37 °C, car les *Listeria* spp. tendent à se développer en même temps que la flore annexe. Dans tous les cas, il convient que la température d'incubation de la gélose soit fixée par les parties concernées et indiquée dans le rapport d'essai.

9.4.4 Après incubation pendant 24 h, et 18 h à 24 h supplémentaires (si le développement est faible ou si aucune colonie n'est observée après 24 h d'incubation), examiner les boîtes (9.4.3), afin de rechercher la présence de colonies présumées être des *Listeria* spp.

9.4.4.1 Gélose Oxford: les colonies typiques de *Listeria* spp., cultivées sur gélose Oxford pendant 24 h, sont de petites colonies (1 mm) de couleur grisâtre, entourées d'un halo noir. Après 48 h, les colonies deviennent plus foncées avec éventuellement des reflets verdâtres, présentent un diamètre d'environ 2 mm, sont entourées d'un halo noir et présentent une dépression centrale.

9.4.4.2 Gélose PALCAM: dans le cas d'une incubation en atmosphère microaérobie, après incubation, laisser les boîtes de gélose PALCAM retrouver leur couleur pourpre en exposant le milieu à l'air libre pendant 1 h. Après 24 h, les *Listeria* spp. se présentent sous forme de petites ou très petites colonies vertes avec des reflets grisâtres, ou vert olive, de 1,5 mm à 2 mm de diamètre, avec parfois un centre noir mais toujours entourées d'un halo noir. Après 48 h, les *Listeria* spp. se présentent sous forme de colonies vertes de 1,5 mm à 2 mm de diamètre, avec une dépression centrale, et entourées d'un halo noir.

9.5 Confirmation du genre *Listeria* spp.

9.5.1 Sélection des colonies pour la confirmation

9.5.1.1 Pour la confirmation, prélever, à partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs (voir 9.4.4.1 et 9.4.4.2), cinq colonies présumées être des *Listeria* spp.

Si une boîte présente moins de cinq colonies présu-
mées, retenir toutes les colonies présumées.

9.5.1.2 Ensemencer en stries les colonies sélection-
nées sur la surface des boîtes de gélose tryptone de
soja — extrait de levure (TSYEA) (5.5), préalablement
séchées, de façon à permettre le développement de
colonies bien isolées.

Placer les boîtes dans l'étuve [6.3 c)] réglée à 35 °C
ou 37 °C pendant 18 h à 24 h ou jusqu'à un dévelop-
pement satisfaisant.

NOTE 7 Il convient que la température d'incubation du mi-
lieu inoculé soit fixée par les parties concernées et indiquée
dans le rapport d'essai.

Les colonies typiques, de 1 mm à 2 mm de diamètre,
sont convexes, incolores, translucides à bords régu-
liers. Si les colonies ne sont pas bien isolées, repiquer
une colonie typique de *Listeria* spp. sur une nouvelle
boîte de TSYEA. Effectuer les essais suivants à partir
de colonies d'une culture pure sur TSYEA.

NOTE 8 Le test d'illumination de Henry (voir l'annexe C)
peut être réalisé si nécessaire. Pour ce test, il est important
que la couche du milieu gélosé (15 ml/boîte) soit mince.

9.5.2 Réaction de la catalase

Prélever une colonie isolée en 9.5.1.2 et la mettre en
suspension sur une lame dans une goutte de la solu-
tion de peroxyde d'hydrogène (5.1.1). La formation de
bulles indique une réaction positive.

9.5.3 Coloration de Gram

Effectuer une coloration de Gram d'une colonie isolée
en 9.5.1.2. Les *Listeria* spp. apparaissent sous forme
de petits et minces bacilles Gram positif.

9.5.4 Examen de la mobilité (si nécessaire)¹⁾

Prélever une colonie isolée en 9.5.1.2 et la mettre en
suspension dans un tube contenant le bouillon TSYEB
(5.6).

Incuber à l'étuve [6.3 a)] à 25 °C pendant 8 h à 24 h,
jusqu'à ce qu'un trouble soit observé.

Déposer une goutte de la culture précédente, à l'aide
d'une anse bouclée (6.5), sur une lame propre de
microscope et examiner au microscope (6.14) entre

lame et lamelle. Les *Listeria* spp. apparaissent sous
forme de bacilles minces et courts, et sont animées
d'une mobilité en «pirouette».

Ce type de phénomène n'est parfois pas constaté
pour les cultures développées à une température su-
périeure à 25 °C. Comparer toujours le résultat avec
une culture connue. Les coques, les bacilles longs ou
les bacilles qui se déplacent rapidement ne sont pas
des *Listeria* spp.

En alternative, il est également possible d'examiner la
mobilité, en ensemencant par piqûre avec le fil droit
(6.5) la gélose motilité (5.9) à partir d'une culture d'une
colonie typique sur gélose TSYEA (9.5.1.2). Incuber à
l'étuve [6.3 a)] à 25 °C pendant 48 h.

Examiner le développement autour de la piqûre. Les
Listeria spp. sont mobiles et donnent une culture typi-
que en forme de parapluie. Si la culture n'est pas suf-
fisante, incuber jusqu'à 5 jours supplémentaires et
observer à nouveau la piqûre.

9.6 Confirmation de l'espèce

L. monocytogenes

9.6.1 Recherche de l'hémolyse

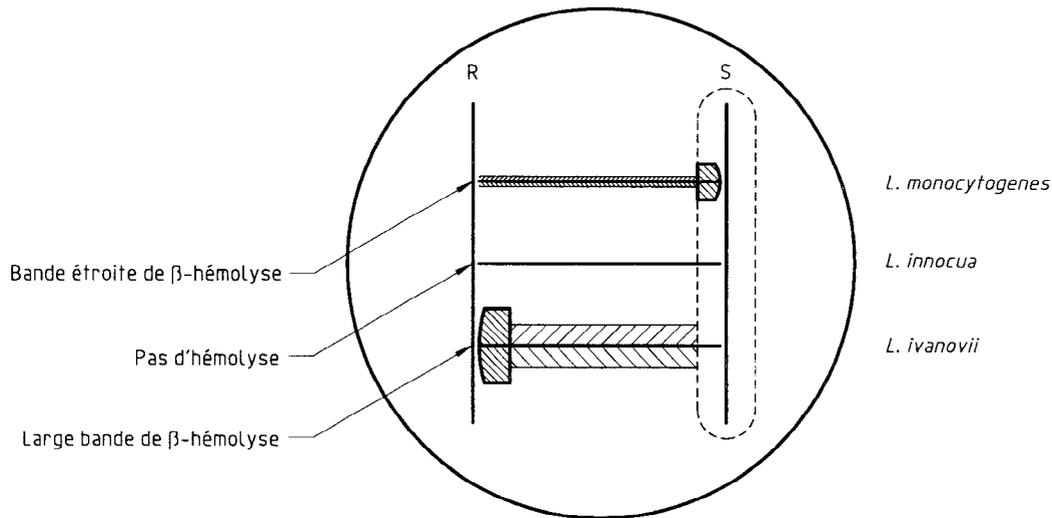
Si les caractéristiques physiologiques et morphologi-
ques, ainsi que la réaction de la catalase, indiquent la
présence éventuelle de *Listeria* spp., inoculer les boî-
tes de gélose au sang de mouton (5.7) pour observer
la réaction hémolytique.

Juste avant l'emploi, sécher soigneusement la surface
de la gélose. Prélever une colonie isolée en 9.5.1.2 et
inoculer par piqûre chaque culture à l'aide d'un fil droit
(6.5). Inoculer simultanément par piqûre les cultures
témoins positif (*L. monocytogenes*) et négatif (*L. inno-
cua*).

Après incubation à 35 °C ou 37 °C pendant 24 h ± 2 h,
examiner les souches d'essai et les souches témoins.
Les *L. monocytogenes* montrent des zones étroites,
claires et légères de β-hémolyse²⁾ (voir figure 1). On
n'observe pas de zone claire autour de la piqûre pour
les *L. innocua*. Les *L. seeligeri* montrent une faible
zone d'hémolyse. Les *L. ivanovii* forment habituelle-
ment de larges zones de β-hémolyse nettement dé-
limitées. Examiner les boîtes à la lumière blanche pour
comparer les cultures d'essai et les témoins.

1) Cet examen n'est pas nécessaire dans tous les cas si l'analyse est effectuée par un microbiologiste pratiquant régulièrement la recherche de *L. monocytogenes*.

2) Cela est mieux observé en enlevant toute colonie qui s'est développée à la surface de la gélose autour de la piqûre d'inoculation.



NOTES

1 Ensemencer les boîtes de gélose au sang (5.7 ou B.10.3) comme illustré sur le diagramme. Les lignes verticales représentent les stries de *S. aureus* (S) et de *R. equi* (R). 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*.

Figure 1 — Inoculation et interprétation des boîtes de test de CAMP

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11290-1:1996

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e2f41f5-a05d-4c46-8a53-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e2f41f5-a05d-4c46-8a53-89e1d3854353/iso-11290-1-1996)

NOTE 9 La réaction hémolytique peut également être terminée en pratiquant le test à l'aide d'hématies. Émulsionner la colonie dans 150 µl de bouillon TSYEB (5.6); incuber à 35 °C ou 37 °C pendant 2 h. Ajouter 150 µl d'hématies de mouton en solution PBS à 2 % (5.12). Incuber à 35 °C ou 37 °C pendant 15 min à 60 min, puis réfrigérer à 3 °C ± 2 °C pendant 2 h environ. Examiner alors la présence ou l'absence d'hémolyse. Si la réaction est douteuse, laisser à 3 °C ± 2 °C jusqu'à 24 h.

9.6.2 Utilisation des glucides

Inoculer à l'aide d'une anse bouclée (6.5) chaque bouillon pour l'utilisation des glucides (5.8), à partir d'une culture à partir de TSYEB (9.5.4). Incuber à 35 °C ou 37 °C jusqu'à 5 jours. La formation d'une coloration jaune indique une réaction positive (formation d'acide) qui se produit généralement au bout de 24 h à 48 h.

9.6.3 Test de CAMP

Ensemencer par strie simple chacune des cultures de *Staphylococcus aureus* et de *Rhodococcus equi* (B.10.4) sur la gélose au sang de mouton (5.7 ou B.10.3). Les deux stries doivent être parallèles et dia-

métralement opposées (voir figure 1). Il est nécessaire que l'inoculum soit étroit et régulier. Pour cela, pendant l'ensemencement, maintenir le fil d'ensemencement ou l'anse (6.5) perpendiculaire à la gélose.

De façon similaire et perpendiculairement à ces cultures, ensemencer la souche d'essai isolée en 9.5.1.2 de manière à ce que la culture d'essai et les cultures de *Staphylococcus aureus* et de *Rhodococcus equi* ne se touchent pas, mais ne soient séparées que d'environ 1 mm à 2 mm. Plusieurs souches d'essai peuvent être déposées sur la même boîte.

Ensemencer en même temps des cultures témoins de *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *L. ivanovii*. Si la gélose au sang (5.7) est utilisée, incuber les boîtes à 35 °C ou 37 °C pendant 18 h à 24 h. Si des boîtes à double couches (B.10.3) sont utilisées, les incuber à 35 °C ou 37 °C pendant 12 h à 18 h.

Considérer la réaction comme positive s'il y a une augmentation de la zone de β-hémolyse à l'intersection de la souche d'essai avec chacune des cultures de *Staphylococcus aureus* et de *Rhodococcus equi*.

La réaction positive avec *Rhodococcus equi* se traduit par la présence d'une large zone d'hémolyse (5 mm à 10 mm) en «pelle». Des petites zones, d'environ

1 mm, de faible hémolyse à l'intersection de la souche d'essai avec la zone de diffusion de la culture de *Rhodococcus equi* sont considérées comme des réponses négatives.

Une réaction positive avec *Staphylococcus aureus* apparaît sous forme d'une petite zone d'hémolyse accentuée le long de la strie de culture, ne s'étendant qu'à 2 mm environ de la souche d'essai et dans la zone légèrement hémolytique due à la croissance de la culture de *Staphylococcus aureus*. Il ne se produit pas de larges zones d'hémolyse dans la zone de proximité entre *Staphylococcus aureus* et *L. monocytogenes*.

9.7 Interprétation des propriétés morphologiques et physiologiques et des réactions biochimiques

Toutes les *Listeria* spp. se présentent sous forme de petits bacilles Gram positif qui sont mobiles. Leur réaction à la catalase est positive. Les *L. monocytogenes* se distinguent des autres espèces selon les caractéristiques présentées dans le tableau 1.

9.8 Confirmation définitive

Les souches considérées comme étant des *L. monocytogenes* (9.7) peuvent être envoyées à un laboratoire de référence reconnu pour l'identification des *Listeria*, en vue d'une détermination du sérotype et, éventuellement, du lysotype.

Dans ce cas, l'envoi doit être accompagné de toutes les informations disponibles concernant la ou les souche(s).

9.9 Cultures témoins

Afin de contrôler l'aptitude des milieux d'enrichissement et d'identification à permettre le développement sélectif des *L. monocytogenes*, introduire une dilution de la culture de référence, composée de souches récemment isolées de *L. monocytogenes* et de souches témoins négatifs (par exemple Lactobacilles, *Streptococcus*), dans un flacon témoin contenant le milieu d'enrichissement primaire (voir 9.2). Ajouter 10 à 100 cellules de *L. monocytogenes* ou de souches témoins négatifs par flacon.

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

ISO 11290-1:1996

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e2f41f5-a05d-4c46-8a53-59b1c7854353/iso-11290-1-1996>

Tableau 1 — Réactions pour l'identification des *Listeria* spp.

| Espèce | Hémolyse | Production d'acide | | Test de CAMP | |
|--|----------|--------------------|--------|------------------|----------------|
| | | Rhamnose | Xylose | <i>S. aureus</i> | <i>R. equi</i> |
| <i>L. monocytogenes</i> | + | + | – | + | – |
| <i>L. innocua</i> | – | V | – | – | – |
| <i>L. ivanovii</i> | + | – | + | – | + |
| <i>L. seeligeri</i> | (+) | – | + | (+) | – |
| <i>L. welshimeri</i> | – | V | + | – | – |
| <i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i> | – | – | – | – | – |
| <i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i> | – | V | – | – | – |
| V: réaction variable (+): réaction faible +: réaction positive à plus de 90 % –: absence de réaction | | | | | |
| NOTE — Il existe de rares souches de <i>L. monocytogenes</i> qui ne présentent pas de β -hémolyse, ni de réaction positive au test de CAMP, dans les conditions décrites dans la présente partie de l'ISO 11290. | | | | | |