
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Méthode horizontale
pour la recherche et le
dénombrement de *Listeria*
monocytogenes et de *Listeria* spp. —**

Partie 2:
Méthode de dénombrement
(standards.iteh.ai)

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the
detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of
Listeria spp. —*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf3ada12-23f9-4e07-9c09-2d6a582d9408/iso-11290-2-2017>

Part 2: Enumeration method



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11290-2:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf3ada12-23f9-4e07-9c09-2d6a582d9408/iso-11290-2-2017>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

| | |
|---|-----------|
| Avant-propos..... | iv |
| Introduction..... | v |
| 1 Domaine d'application | 1 |
| 2 Références normatives | 1 |
| 3 Termes et définitions | 2 |
| 4 Principe | 2 |
| 4.1 Généralités..... | 2 |
| 4.2 Suspension mère..... | 2 |
| 4.3 Ensemencement en surface..... | 2 |
| 4.4 Incubation..... | 2 |
| 4.5 Confirmation..... | 3 |
| 4.6 Dénombrement..... | 3 |
| 5 Milieux de culture et réactifs | 3 |
| 6 Matériel et consommables | 3 |
| 7 Échantillonnage | 3 |
| 8 Préparation de l'échantillon pour essai | 4 |
| 9 Mode opératoire | 4 |
| 9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions..... | 4 |
| 9.2 Inoculation et incubation..... | 4 |
| 9.3 Dénombrement des colonies caractéristiques..... | 5 |
| 9.4 Confirmation de <i>L. monocytogenes</i> ou <i>Listeria</i> spp..... | 5 |
| 9.4.1 Sélection des colonies pour confirmation..... | 5 |
| 9.4.2 Confirmation de <i>L. monocytogenes</i> | 6 |
| 9.4.3 Confirmation de <i>Listeria</i> spp..... | 10 |
| 9.5 Interprétation des propriétés morphologiques et physiologiques et des réactions biochimiques..... | 11 |
| 9.6 Caractérisation supplémentaire de souches isolées (facultative)..... | 11 |
| 10 Expression des résultats | 11 |
| 11 Caractéristiques de performance de la méthode | 11 |
| 11.1 Étude de validation de la méthode..... | 11 |
| 11.2 Limite de répétabilité..... | 11 |
| 11.3 Limite de reproductibilité..... | 12 |
| 12 Rapport d'essai | 12 |
| 13 Assurance qualité | 12 |
| Annexe A (normative) Logigramme du mode opératoire | 13 |
| Annexe B (normative) Composition et préparation des milieux et des réactifs | 14 |
| Annexe C (informative) Distinction de <i>Listeria</i> spp. des autres genres | 22 |
| Annexe D (informative) Réactions pour l'identification des espèces de <i>Listeria</i> | 23 |
| Annexe E (informative) Résultats des études interlaboratoires pour le dénombrement de <i>Listeria monocytogenes</i> | 25 |
| Bibliographie | 28 |

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/foreword.html.

Le présent document a été élaboré par le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, de l'Organisation internationale de normalisation (ISO), conformément à l'accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 11290-2:1998) qui a fait l'objet d'une révision technique. Elle intègre également l'amendement ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004.

Les principales modifications par rapport à ISO 11290-2:1998 sont les suivantes.

- Le dénombrement de *Listeria monocytogenes* a été modifiée comme indiqué ci-dessous.
- Suspension mère en eau peptonée tamponnée, bouillon Fraser-demi avec ou sans suppléments, et tout diluant approprié auquel il est fait référence dans l'ISO 6887 (toutes les parties).
- Suppression de l'étape de revivification.
- L'aspect microscopique, la réaction à la catalase et le test de CAMP sont facultatifs pour la confirmation.
- Inclusion de nouvelles caractéristiques de performance.
- En outre, le dénombrement des *Listeria* spp. a été inclus dans le domaine d'application et le titre modifié en conséquence.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 11290 est disponible sur le site web de l'ISO.

Introduction

Les principales modifications, énumérées dans l'avant-propos, introduites dans ce document comparativement à l'ISO 11290-2:1998, sont considérées comme majeures (voir l'ISO 17468^[28]). Les modifications techniques ont été évaluées et considérées comme n'ayant pas d'effet significatif sur les caractéristiques de performance de la méthode ou sur les résultats des essais.

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. Néanmoins, cette méthode horizontale est destinée à être appliquée chaque fois qu'il sera possible et l'on n'aura recours à des dérogations que pour des raisons techniques justifiées.

Lorsque le présent document sera réexaminé, 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 présente méthode horizontale existent peut-être déjà. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec le présent document et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques bien établies.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 11290-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf3ada12-23f9-4e07-9c09-2d6a582d9408/iso-11290-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf3ada12-23f9-4e07-9c09-2d6a582d9408/iso-11290-2-2017>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11290-2:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf3ada12-23f9-4e07-9c09-2d6a582d9408/iso-11290-2-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf3ada12-23f9-4e07-9c09-2d6a582d9408/iso-11290-2-2017>

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. —

Partie 2: Méthode de dénombrement

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de détection des *L. monocytogenes* et *Listeria* spp. ne soient réalisés que dans des laboratoires équipés à cet effet, sous le contrôle d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit pris lors de l'élimination de tous les éléments incubés. Il convient que les utilisateurs du présent document maîtrisent les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document ne prétend pas aborder la totalité des aspects liés à la sécurité qui pourraient découler de son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'établir les pratiques de sécurité et de santé appropriées. Il est en particulier fortement recommandé que les essais de recherche de *L. monocytogenes* soient réalisés dans des laboratoires appliquant des conditions de biosécurité de niveau 2. Il est fortement recommandé que le personnel de laboratoire féminin soit informé du risque particulier pour le fœtus en développement dû à l'infection de la mère par le biais d'une exposition aux *L. monocytogenes* et *Listeria* spp., et que les femmes enceintes ainsi que le personnel de laboratoire souffrant de pathologies sous-jacentes ou affectant l'immunité cellulaire ne manipulent pas les cultures de *L. monocytogenes* et *Listeria* spp.

1 Domaine d'application ISO 11290-2:2017

Le présent document spécifie une méthode horizontale pour https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf3ada12-23f9-4e07-9c09-21615871b408/iso-11290-2-2017

- le dénombrement de *L. monocytogenes*; et
- le dénombrement de *Listeria* spp. (y compris *L. monocytogenes*).

Le présent document s'applique aux:

- produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale; et
- échantillons de l'environnement de production et de distribution des aliments.

Il est possible que cette méthode ne permette pas de dénombrer ou de confirmer certaines espèces de *Listeria* récemment décrites [3], [6], [9], [11].

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 6887 (toutes les parties), *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

ISO 11290-1, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de Listeria monocytogenes et de Listeria spp.* — Partie 1: Méthode de recherche

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>.
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>.

3.1 Listeria monocytogenes
micro-organismes formant des colonies typiques sur des milieux sélectifs solides et possédant les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques décrites lorsque les essais sont effectués conformément au présent document

3.2 dénombrement de Listeria monocytogenes
détermination du nombre d'unités formant colonies (UFC) de *Listeria monocytogenes*, par gramme, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif de prélèvement, lorsque l'analyse est exécutée conformément au présent document

3.3 Listeria spp.
micro-organismes formant des colonies typiques sur des milieux sélectifs solides et possédant les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques décrites lorsque les essais sont effectués conformément au présent document

3.4 dénombrement de Listeria spp.
détermination du nombre d'unités formant colonies (UFC) de *Listeria spp.*, par gramme, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif de prélèvement, lorsque l'analyse est exécutée conformément au présent document

4 Principe

4.1 Généralités

Dans le cadre du présent document, le dénombrement de *L. monocytogenes* et de *Listeria spp.* nécessite cinq étapes successives, comme décrit dans le logigramme de l'[Annexe A](#).

4.2 Suspension mère

Préparation de la suspension mère dans un diluant approprié selon le type d'échantillon.

4.3 Ensemencement en surface

Ensemencement en surface sur gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti^{[13],[14]}, d'une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits et/ou de dilutions décimales si nécessaire.

4.4 Incubation

Incubation des boîtes de Petri à 37 °C et examen après 24 h et après 24 h supplémentaires.

4.5 Confirmation

Confirmation des colonies présumées de *L. monocytogenes* et/ou de *Listeria* spp. par des essais morphologiques et/ou biochimiques appropriés.

4.6 Dénombrement

À partir du nombre de colonies confirmées, calcul du nombre de *L. monocytogenes* et/ou de *Listeria* spp. par gramme, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif de prélèvement.

5 Milieux de culture et réactifs

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 11133.

La composition des milieux de culture et des réactifs et leur préparation sont décrites à l'[Annexe B](#).

6 Matériel et consommables

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

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

Comme spécifié dans l'ISO 7218.

6.2 Enceinte de séchage ou étuve, pouvant être maintenue à une température comprise entre 25 °C et 50 °C.

6.3 Étuves, réglables à 37 °C ± 1 °C et 25 °C ± 1 °C (facultatifs).

6.4 Bain d'eau, réglable de 47 °C à 50 °C.

6.5 Anses bouclées stériles d'environ 3 mm de diamètre ou de 10 µl, et aiguille ou fil à ensemercer.

6.6 Étaleurs en verre ou en matière plastique, stériles.

6.7 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.

6.8 Pipettes graduées à écoulement total ou pipettes automatiques, de capacités nominales de 1 ml et 10 ml.

6.9 Boîtes de Petri, de 90 mm et/ou 140 mm de diamètre.

6.10 Microscope, de préférence à contraste de phase, avec lames et lamelles couvre-objet.

6.11 Réfrigérateur, réglable à 5 °C ± 3 °C.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode indiquée dans le présent document. S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique pour l'échantillonnage du produit concerné, il convient que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet. Pour les échantillons d'aliments, consulter l'ISO/TS 17728. Pour les échantillons d'environnement, voir l'ISO 18593 et voir la Référence [23].

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou du stockage (voir l'ISO 7218).

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique appropriée au produit concerné [voir l'ISO 6887 (toutes les parties) et l'ISO 18593]. 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, suspension mère et dilutions

De l'eau peptonée tamponnée, aussi bien qu'un autre diluant approprié décrit dans l'ISO 6887 (toutes les parties) ou dans la Norme internationale spécifique du produit concerné, peut être utilisée comme diluant pour la suspension mère.

Le bouillon Fraser-demi (comme précisé dans l'ISO 11290-1), avec ou sans supplément d'agents sélectifs, peut être utilisé comme diluant pour la suspension mère lorsque la méthode de recherche (comme précisée dans l'ISO 11290-1) et la présente méthode de dénombrement sont réalisées sur le même échantillon pour essai. Il convient d'ajouter les agents sélectifs (si nécessaire) à la suspension, de préférence après le dénombrement et avant la méthode de recherche.

Si le bouillon Fraser-demi est utilisé, ensemencer les boîtes le plus tôt possible, et jusqu'à 45 min.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

9.2 Inoculation et incubation

ISO 11290-2:2017

9.2.1 Répartir, à l'aide d'une pipette stérile (6.8), 0,1 ml de la suspension mère (ou de l'échantillon s'il s'agit d'un liquide) et 0,1 ml des dilutions décimales suivantes, chacune ensemencée à la surface d'une petite boîte (90 mm) de gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti (voir B.2).

Lorsque, pour certains produits, il est souhaitable d'estimer de faibles nombres de *L. monocytogenes* et/ou de *Listeria* spp., les limites de détection peuvent être augmentées d'un facteur 10 en examinant 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit initial est liquide ou 1 ml de la suspension mère pour les autres produits. Répartir le volume de 1 ml d'inoculum sur la surface d'une grande boîte de Petri (140 mm) ou sur la surface de trois petites boîtes (90 mm), préalablement séchées si nécessaire dans une étuve (6.2). Si uniquement la suspension mère est ensemencée, préparer alors des boîtes en double en utilisant trois autres petites boîtes de Petri ou une autre grande boîte de milieu (voir l'ISO 7218).

Répéter l'opération en utilisant 0,1 ml de la suspension mère (ou de l'échantillon s'il s'agit d'un liquide) et 0,1 ml des dilutions décimales suivantes, si nécessaire, chacune ensemencée à la surface d'une petite boîte (90 mm) de milieu gélosé.

9.2.2 Étaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible sur la surface de la boîte de gélose en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'étaleur (6.6). Utiliser un nouvel étaleur stérile pour chaque dilution. Laisser les boîtes fermées couvercle au-dessus pendant environ 15 min à température ambiante pour permettre à l'inoculum d'être absorbé dans la gélose.

Il est possible d'utiliser le même étaleur pour toutes les boîtes d'un échantillon donné, en commençant par la dilution la plus élevée.

9.2.3 Incuber les boîtes de gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti préparées en 9.2.2 retournées à 37 °C (6.3) pendant 24 h ± 2 h et pour une incubation supplémentaire à 37 °C pendant 24 h ± 2 h.

9.3 Dénombrement des colonies caractéristiques

9.3.1 Après incubation pendant 24 h ± 2 h (avant tout développement excessif de colonies avec des halos opaques de grande taille et se chevauchant, susceptibles de rendre la lecture difficile), et pendant 24 h ± 2 h supplémentaires (qui peuvent favoriser le développement de colonies et d'un halo opaque), examiner les boîtes de Petri (9.2.3) pour détecter les colonies présumées de *L. monocytogenes* (voir en 9.3.2) et/ou de *Listeria* spp. (voir 9.3.3).

9.3.2 Considérer comme *L. monocytogenes* les colonies bleues-vertes entourées d'un halo opaque (colonies typiques). Les colonies de *L. ivanovii* sont également bleues-vertes et entourées d'un halo opaque.

NOTE 1 Certaines souches de *L. monocytogenes* exposées à des conditions de stress, en particulier à un stress acide, peuvent être entourées d'un halo très faible (ou même ne montrer aucun halo).

NOTE 2 De rares souches de *L. monocytogenes* sont caractérisées par une activité PI-PLC (phosphatidylinositol phospholipase C) lente. De telles bactéries sont détectées lorsque la durée totale de l'incubation est plus longue, par exemple 4 jours. Certaines de ces souches peuvent être pathogènes[10]. Aucune souche de *L. monocytogenes* n'a été décrite comme étant négative à la phosphatidylinositol phospholipase C.

9.3.3 Considérer comme des *Listeria* spp. présomptives les colonies bleues-vertes avec ou sans halo opaque.

NOTE Certains organismes autres que *Listeria* spp. peuvent donner des colonies bleues sur ce milieu. Voir l'Annexe C.

iTeh STANDARD PREVIEW

9.3.4 Compter toutes les colonies présumées de *L. monocytogenes* (9.3.2) dans chaque boîte de Petri contenant moins de 150 colonies caractéristiques de *L. monocytogenes*, ou moins de 360 colonies caractéristiques de *L. monocytogenes* si des boîtes de Petri de 140 mm sont utilisées.

ISO 11290-2:2017

9.3.5 Compter toutes les colonies présumées de *Listeria* spp. (9.3.3) dans chaque boîte de Petri contenant moins de 150 colonies caractéristiques de *Listeria* spp., ou moins de 360 colonies caractéristiques de *Listeria* spp. si des boîtes de Petri de 140 mm sont utilisées.

En cas de cultures mixtes de colonies bleues-vertes avec ou sans halo opaque, ou en cas de colonies bleues-vertes avec des halos opaques de grande taille et se chevauchant, il est préférable de compter les colonies dans chaque boîte de Petri contenant moins de 100 colonies caractéristiques de *Listeria* spp., ou moins de 240 colonies caractéristiques de *Listeria* spp. si des boîtes de Petri de 140 mm sont utilisées.

9.4 Confirmation de *L. monocytogenes* ou *Listeria* spp.

9.4.1 Sélection des colonies pour confirmation

9.4.1.1 Considérer chaque groupe de trois boîtes de Petri de 90 mm utilisé pour la suspension mère comme une boîte.

Si une boîte présente moins de cinq colonies présumées, les prélever toutes pour la confirmation.

9.4.1.2 Pour la confirmation de *L. monocytogenes* présumées, prélever, à partir de chaque boîte de Petri, représentant chaque dilution, cinq colonies au total, représentatives de chaque type de colonie (par exemple, avec un halo de grande taille et avec un halo de petite taille).

Isoler les colonies sélectionnées à la surface de boîtes préalablement séchées de gélose non sélective, par exemple de la gélose au sang, de la gélose nutritive, de la gélose tryptone soja et extrait de levure (TSYEA) (B.1), de façon à permettre le développement de colonies isolées.

L'utilisation de gélose au sang en culture pure permet d'interpréter l'hémolyse, si positive, dès ce stade (voir [9.4.2.5](#) et [Annexe D](#)). Si l'isolement sur gélose au sang ne présente pas d'hémolyse, alors la recherche de l'hémolyse doit être réalisée par piqûre ([9.4.2.5.2](#)) ou dans un milieu liquide ([9.4.2.5.3](#)).

Placer les boîtes de Petri dans l'étuve réglée à 37 °C pendant 18 h à 24 h ou jusqu'à un développement satisfaisant.

Si les colonies ne sont pas isolées, repiquer une colonie typique de *L. monocytogenes* sur une autre boîte non sélective.

Effectuer les essais suivants ([9.4.2](#)) à partir de colonies d'une culture pure sur gélose non sélective.

9.4.1.3 Pour la confirmation de *Listeria* spp. présumées, prélever, à partir de chaque boîte de Petri, représentant chaque dilution, cinq colonies au total, représentatives de chaque type de colonie (par exemple, colonies de grande taille et de petite taille, avec ou sans halo).

Pour la confirmation de *Listeria* spp., utiliser des boîtes de TSYEA.

Isoler les colonies sélectionnées sur la surface de boîtes de TSYEA ([B.1](#)) préalablement séchées, de façon à permettre le développement de colonies isolées.

Placer les boîtes de Petri dans l'étuve réglée à 37 °C pendant 18 h à 24 h ou jusqu'à un développement satisfaisant.

Les colonies typiques de *Listeria* spp. Sur TSYEA, sont de 1 mm à 2 mm de diamètre, convexes, incolores et opaques à bords réguliers. Lorsque les boîtes sont placées à la lumière (artificielle ou naturelle) à un angle de 45 degrés environ, les colonies présentent une couleur bleu-gris et une surface granuleuse.

Si les colonies ne sont pas isolées, repiquer une colonie typique de *Listeria* spp. sur une autre boîte non sélective.

Effectuer les essais suivants ([9.4.3](#)) à partir de colonies typiques d'une culture pure sur TSYEA.

9.4.2 Confirmation de *L. monocytogenes*

9.4.2.1 Généralités

Effectuer les essais de confirmation de *L. monocytogenes*. Des souches témoins positives et négatives appropriées doivent être utilisées pour chaque test de confirmation.

Effectuer au moins les essais obligatoires répertoriés (en gras) dans le [Tableau 1](#).

Tableau 1 — Essais de confirmation de *L. monocytogenes*

| Essais | Essais de confirmation de <i>L. monocytogenes</i> | Résultats |
|---------------------|---|--|
| Obligatoires | Bêta-hémolyse (9.4.2.4) | + |
| | L-Rhamnose (9.4.2.7) | + |
| | D-Xylose (9.4.2.7) | - |
| Facultatifs | Aspect microscopique (9.4.3.4) | Bacilles fins et courts ou coccobacilles |
| | Catalase (9.4.2.2) | + |
| | Mobilité à 25 °C (9.4.2.3) | + |
| | Test de CAMP (9.4.2.6) | + |

Des détails sur les résultats des essais de confirmation sont disponibles dans l'[Annexe D](#).

NOTE Un autre mode opératoire comme mentionné dans l'ISO 7218 peut être utilisé pour confirmer que l'isolat appartient à l'espèce *Listeria monocytogenes*, à condition de vérifier que le mode opératoire est bien approprié.