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

Partie 1:
Méthode de recherche
(standards.iteh.ai)

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f1610250-86d9-41ef-acc6-e67157a9ac11/iso-10272-1-2017>
Part 1: Detection method



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10272-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fl610250-86d9-41ef-accce67157a9ac11/iso-10272-1-2017>



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.....	v
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
4.1 Généralités.....	2
4.2 Enrichissement en milieu sélectif liquide.....	2
4.2.1 Mode opératoire de recherche A.....	2
4.2.2 Mode opératoire de recherche B.....	2
4.2.3 Mode opératoire de recherche C.....	2
4.3 Isolement sur milieu sélectif solide.....	3
4.3.1 Mode opératoire de recherche A.....	3
4.3.2 Mode opératoire de recherche B.....	3
4.3.3 Mode opératoire de recherche C.....	3
4.3.4 Modes opératoires de recherche A, B et C.....	3
4.4 Confirmation.....	3
5 Milieus de culture et réactifs	3
6 Matériel et consommables	3
7 Échantillonnage	4
8 Préparation de l'échantillon pour essai	4
9 Mode opératoire	4
9.1 Généralités.....	4
9.2 Prise d'essai et suspension mère.....	5
9.2.1 Généralités.....	5
9.2.2 Mode opératoire de recherche A.....	5
9.2.3 Mode opératoire de recherche B.....	5
9.2.4 Mode opératoire de recherche C.....	5
9.3 Enrichissement.....	6
9.3.1 Mode opératoire de recherche A.....	6
9.3.2 Mode opératoire de recherche B.....	6
9.4 Isolement.....	6
9.4.1 Mode opératoire de recherche A.....	6
9.4.2 Mode opératoire de recherche B.....	6
9.4.3 Modes opératoires de recherche A, B et C.....	6
9.5 Confirmation de <i>Campylobacter</i>	6
9.5.1 Généralités.....	6
9.5.2 Sélection des colonies à confirmer.....	7
9.5.3 Examen de la morphologie et de la mobilité.....	7
9.5.4 Étude de la croissance aérobie à 25 °C.....	7
9.5.5 Recherche de l'activité de l'oxydase.....	7
9.5.6 Interprétation.....	7
9.6 Identification de l'espèce de <i>Campylobacter</i> (facultative).....	8
9.6.1 Généralités.....	8
9.6.2 Recherche de l'activité de la catalase.....	8
9.6.3 Recherche de l'hydrolyse de l'hippurate.....	8
9.6.4 Recherche de l'hydrolyse de l'acétate d'indoxyle.....	8
9.6.5 Interprétation.....	9
10 Expression des résultats	9
11 Caractéristiques de performance de la méthode	9

11.1	Étude interlaboratoires	9
11.2	Sensibilité	9
11.3	Spécificité	9
11.4	LOD ₅₀	9
12	Rapport d'essai	10
Annexe A	(normative) Représentation schématique des modes opératoires	11
Annexe B	(normative) Milieux de culture et réactifs	12
Annexe C	(informative) Études de validation des méthodes et caractéristiques de performance	21
Bibliographie	24

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 10272-1:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fl610250-86d9-41ef-acc-e67157a9ac11/iso-10272-1-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fl610250-86d9-41ef-acc-e67157a9ac11/iso-10272-1-2017>

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](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11610250-86d9-41ef-acc6-67157a9ac11/iso-10272-1-2017).

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*, 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 10272-1:2006), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les modifications suivantes ont été apportées:

- ajout des échantillons provenant de l'étape de production primaire au domaine d'application;
- extension de la méthode de recherche afin d'inclure l'option consistant à utiliser un deuxième bouillon d'enrichissement (bouillon de Preston), principalement pour résoudre les problèmes de résistance de la flore annexe aux β -lactamines de troisième génération (comme la cefopérazone dans le bouillon de Bolton);
- extension de la méthode de recherche afin d'inclure l'ensemencement direct sur mCCDA;
- suppression de la note relative à l'utilisation de récipients fermés avec espace libre réduit comme alternative à l'incubation en atmosphère microaérophile;
- remplacement des essais de confirmation de l'étude de la croissance microaérophile à 25 °C et de la croissance aérobie à 41,5 °C par l'étude de la croissance aérobie à 25 °C;
- ajout à l'[Annexe B](#) d'essais de performance relatifs à l'assurance qualité des milieux de culture;
- ajout des caractéristiques de performance à l'[Annexe C](#).

Une liste de toutes les parties de la série ISO 10272 est disponible sur le site Internet de l'ISO.

Introduction

Les principaux changements énumérés dans l'avant-propos qui ont été apportés au présent document par rapport à l'ISO 10272-1:2006 sont considérés comme mineurs (voir l'ISO 17468).

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il se peut que la présente méthode horizontale ne convienne pas exactement, dans tous ses détails, à certains d'entre eux et que, pour certains autres, il puisse être nécessaire d'employer d'autres méthodes. Néanmoins, il est à espérer que tous les efforts seront entrepris dans tous les cas afin d'appliquer, dans la mesure du possible, la présente méthode horizontale et qu'il n'y aura d'écarts par rapport à celle-ci qu'en cas d'absolue nécessité et pour des raisons techniques.

Lors du prochain réexamen périodique du présent document, il sera tenu compte de toutes les évolutions intervenues depuis sa publication et, notamment, dans quelle mesure cette méthode horizontale aura été suivie ainsi que les raisons des dérogations dans le cas de produits particuliers. L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut être instantanée et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou nationales ne concordant pas avec la présente méthode horizontale existent peut-être déjà. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec les spécifications du présent document et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 10272-1:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fl610250-86d9-41ef-acc6-67157a9ac11/iso-10272-1-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fl610250-86d9-41ef-acc6-67157a9ac11/iso-10272-1-2017>

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

Partie 1: Méthode de recherche

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de recherche de *Campylobacter* ne soient effectués que dans des laboratoires correctement équipés, sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit apporté à l'élimination de tous les matériaux incubés. Il convient que les personnes qui utilisent le présent document connaissent les pratiques classiques de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les aspects de la sécurité (s'il y en a) qui sont liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode horizontale de recherche par enrichissement ou ensemencement direct de *Campylobacter* spp. Il s'applique:

- aux produits destinés à la consommation humaine;
- aux produits destinés à l'alimentation des animaux;
- aux échantillons environnementaux prélevés dans les secteurs de la production et de la manutention des aliments; et
- aux échantillons au stade de la production primaire tels que les matières fécales des animaux, la poussière et les prélèvements de surface.

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*

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

Campylobacter

microorganismes formant des colonies caractéristiques sur des milieux sélectifs solides lorsqu'ils sont incubés en atmosphère microaéroophile à 41,5 °C et possédant la mobilité et la morphologie caractéristiques, ainsi que les propriétés biochimiques et de croissance décrites lorsque les essais sont réalisés conformément au présent document

Note 1 à l'article: Le présent document vise les espèces *Campylobacter* thermotolérantes pertinentes pour la santé humaine. Les espèces thermotolérantes le plus souvent rencontrées et les plus pertinentes pour la santé humaine sont *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*. D'autres espèces ont toutefois été décrites (*Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, et autres).

3.2

recherche des *Campylobacter*

détection ou non-détection de *Campylobacter* (3.1) dans une quantité déterminée de produit, lorsque l'essai est réalisé conformément au présent document

4 Principe

4.1 Généralités

La recherche de *Campylobacter* exige trois étapes successives telles que spécifiées à l'[Annexe A](#).

En fonction du type d'échantillon et de la finalité de l'essai, trois modes opératoires de recherche peuvent être utilisés:

- **Mode opératoire de recherche A:** recherche de *Campylobacter* par enrichissement, dans des échantillons contenant de faibles nombres de *Campylobacter*, peu de flore annexe et/ou des formes stressées de *Campylobacter*;
- **Mode opératoire de recherche B:** recherche de *Campylobacter* par enrichissement, dans des échantillons contenant de faibles nombres de *Campylobacter* et beaucoup de flore annexe;
- **Mode opératoire de recherche C:** recherche de *Campylobacter* par ensemencement direct, dans des échantillons contenant de grands nombres de *Campylobacter*.

4.2 Enrichissement en milieu sélectif liquide

4.2.1 Mode opératoire de recherche A

Ajout de la prise d'essai au bouillon d'enrichissement de Bolton.

Incubation en atmosphère microaéroophile à 37 °C pendant 4 h à 6 h, puis à 41,5 °C pendant 44 h.

4.2.2 Mode opératoire de recherche B

Ajout de la prise d'essai au bouillon d'enrichissement de Preston.

Incubation en atmosphère microaéroophile à 41,5 °C pendant 24 h.

4.2.3 Mode opératoire de recherche C

La technique d'enrichissement n'est pas utilisée.

4.3 Isolement sur milieu sélectif solide

4.3.1 Mode opératoire de recherche A

À partir de la culture d'enrichissement obtenue en 4.2, deux milieux sélectifs solides sont ensemencés:

- une gélose modifiée à la céfopérazone, au charbon et au désoxycholate (gélose mCCD);
- un autre milieu sélectif solide pour *Campylobacter* basé sur des principes de sélection différents de ceux de la gélose mCCD.

4.3.2 Mode opératoire de recherche B

À partir de la culture d'enrichissement obtenue en 4.2, la gélose sélective mCCD est ensemencée.

4.3.3 Mode opératoire de recherche C

Ensemencement direct ou après suspension dans un volume approprié de liquide de la prise d'essai sur une gélose mCCD sélective.

4.3.4 Modes opératoires de recherche A, B et C

Incubation des milieux sélectifs solides en atmosphère microaérophile à 41,5 °C et examen au bout de 44 h afin de détecter la présence de colonies présumées de *Campylobacter*.

4.4 Confirmation

Examen au microscope de la morphologie et de la mobilité des colonies présumées de *Campylobacter*, repiquage de ces colonies sur un milieu non sélectif (gélose au sang), puis confirmation par recherche de l'activité de l'oxydase et test de croissance aérobie à 25 °C. Identification facultative des espèces de *Campylobacter* par des tests biochimiques et/ou des méthodes moléculaires spécifiques.

5 Milieux de culture et réactifs

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218 et l'ISO 11133.

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

Pour les essais de performance des milieux de culture, voir l'[Annexe B](#).

6 Matériel et consommables

Le matériel jetable est une alternative acceptable à la verrerie réutilisable si ses spécifications sont appropriées.

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

6.1 Étuves, réglables à 25 °C ± 1 °C, 37 °C ± 1 °C et 41,5 °C ± 1 °C.

6.2 Bain d'eau, réglable à 37 °C ± 1 °C.

6.3 Anses stériles, de 10 µl et 1 µl de volume, et **aiguille** ou **fil à ensemencer**.

L'anse en nickel-chrome ne convient pas au test de l'oxydase (9.5.5).

6.4 Microscope, de préférence à contraste de phase, pour observer la morphologie et le mouvement caractéristiques des *Campylobacter*.

6.5 Appareillage approprié à la culture en atmosphère microaérophile, permettant de maintenir tout au long de l'incubation une teneur de 5 % ± 2 % en oxygène, de 10 % ± 3 % en dioxyde de carbone, ≤10 % en hydrogène (facultatif) et le complément en azote.

Une atmosphère microaérophile appropriée peut être obtenue en utilisant des jarres étanches aux gaz et des sachets générateurs de gaz (suivre rigoureusement les instructions du fabricant). Alternativement, il est possible d'injecter dans la jarre ou l'étuve, avant l'incubation, un mélange gazeux avec les proportions des différents gaz appropriés.

6.6 Boîtes de Petri stériles, d'un diamètre de 90 mm environ, de préférence dotées d'aérations pour faciliter l'incubation microaérophile.

6.7 Réfrigérateurs, réglables à 3 °C ± 2 °C et 5 °C ± 3 °C.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Voir la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO/TS 17728 pour les aliments, dans l'ISO 13307 pour l'échantillonnage au stade de production primaire, dans l'ISO 17604 pour l'échantillonnage sur les carcasses et dans l'ISO 18593 pour l'échantillonnage des surfaces.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, et il convient que l'échantillon n'ait pas été endommagé ou altéré lors du transport ou du stockage.

Étant donné que les *Campylobacter* sont très sensibles à la congélation, mais qu'ils survivent bien à basse température, il convient de ne pas congeler les échantillons à analyser, mais de les conserver à 3 °C (6.7) et de les analyser le plus rapidement possible. Par ailleurs, éviter la déshydratation des échantillons.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai à partir de l'échantillon de laboratoire, conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné: voir l'ISO 6887 (toutes les parties). En l'absence de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Généralités

En fonction du type d'échantillon et de la finalité de l'essai, un ou plusieurs des trois modes opératoires de recherche est/sont utilisé(s):

- **mode opératoire de recherche A:** recherche de *Campylobacter* par enrichissement, dans des échantillons contenant de faibles nombres de *Campylobacter*, peu de flore annexe et/ou des formes stressées de *Campylobacter*, par exemple dans les produits cuits ou surgelés;
- **mode opératoire de recherche B:** recherche de *Campylobacter* par enrichissement, dans des échantillons contenant de faibles nombres de *Campylobacter* et beaucoup de flore annexe, par exemple dans les viandes crues (notamment la volaille) ou le lait cru;

- **mode opératoire de recherche C:** recherche de *Campylobacter* par ensemencement direct, dans des échantillons contenant des nombres élevés de *Campylobacter*, par exemple dans les matières fécales, le contenu cæcal de volailles ou la viande de volaille crue. Ce mode opératoire peut être utilisé en association avec la technique décrite dans l'ISO 10272-2 afin de compter le nombre de *Campylobacter* par g, par ml ou par cm² dans la prise d'essai.

S'il existe peu d'informations quant à la meilleure méthode à utiliser pour le type particulier d'échantillon à soumettre à essai, utiliser le mode opératoire de recherche C, en parallèle avec les modes opératoires de recherche A et/ou B.

En général, le mode opératoire B est adapté aux produits (notamment cuits ou surgelés) contenant une importante microflore résistante aux β -lactamines de troisième génération, comme la céfopérazone. La céfopérazone est utilisée dans le bouillon de Bolton (mode opératoire de recherche A) et dans la gélose mCCD. Le bouillon de Preston (mode opératoire de recherche B) se base sur des principes de sélection différents et est de ce fait plus adapté pour supprimer ce type de microflore résistante.

9.2 Prise d'essai et suspension mère

9.2.1 Généralités

De façon générale, pour préparer la suspension mère, utiliser comme diluant le milieu d'enrichissement spécifié en 9.2.2 ou 9.2.3. Préchauffer le milieu d'enrichissement à température ambiante avant utilisation.

En général, une quantité de la partie d'essai (masse ou volume) est mélangée avec une quantité de milieu d'enrichissement (masse ou volume) pour obtenir une dilution au 1:10. Cependant, pour certains types d'échantillons (par exemple les pèdi-chiffonnètes ou les écouvillons de prélèvement), il peut être nécessaire d'utiliser un autre rapport.

Le présent document a été validé pour des prises d'essai de 10 g (ou ml), à l'exception des échantillons cæcaux. Une prise d'essai plus petite peut être utilisée, sans nécessiter de validation/vérification supplémentaire, à condition de maintenir un rapport identique entre le bouillon d'enrichissement et la prise d'essai. Une plus grande prise d'essai que celle validée initialement peut être utilisée, si une étude de validation/vérification a montré que cela n'entraîne aucun effet indésirable sur la recherche de *Campylobacter*.

NOTE La validation peut être effectuée conformément aux documents pertinents de l'ISO 16140 (toutes les parties). La vérification du regroupement des échantillons peut être effectuée conformément au protocole décrit dans l'Annexe D de l'ISO 6887-1:2017 (protocole de vérification du regroupement des échantillons pour les essais qualitatifs).

9.2.2 Mode opératoire de recherche A

En général, pour préparer la suspension mère, mélanger une quantité de 10 g ou 10 ml de la prise d'essai avec 90 ml du milieu d'enrichissement, à savoir le bouillon de Bolton (B.2), de façon à obtenir une dilution de 1 pour 10, puis homogénéiser (voir l'ISO 7218).

9.2.3 Mode opératoire de recherche B

En général, pour préparer la suspension mère, mélanger une quantité de 10 g ou 10 ml de la prise d'essai avec 90 ml du milieu d'enrichissement, à savoir le bouillon de Preston (B.3), de façon à obtenir une dilution de 1 pour 10, puis homogénéiser (voir l'ISO 7218).

9.2.4 Mode opératoire de recherche C

9.2.4.1 Pour les échantillons cæcaux ou fécaux, utiliser une anse (6.3) ou un écouvillon stérile afin de placer une partie de la prise d'essai bien mélangée dans la première moitié de la boîte de

gélose mCCD (B.4). Utiliser une autre anse pour procéder à l'ensemencement en stries sur la seconde moitié de la boîte.

9.2.4.2 Pour tous les autres échantillons, ajouter un volume approprié de liquide (eau peptonnée ou bouillon de Preston), par exemple selon un rapport de 1 sur 2 (fraction volumique), bien mélanger, puis ensemer en stries sur la gélose à l'aide d'une anse (6.3) ou ajouter un volume approprié et l'étendre sur la boîte de gélose mCCD (B.4).

NOTE L'utilisation d'un second milieu d'ensemencement (B.5) avec des agents sélectifs différents de ceux de la gélose mCCD pourrait optimiser la recherche de *Campylobacter*, notamment en présence d'une flore annexe résistante aux β -lactamines de 3e génération comme la céfopérazone.

9.3 Enrichissement

9.3.1 Mode opératoire de recherche A

Incuber la suspension mère (9.2.2) en atmosphère microaéroophile (6.5) à 37 °C (6.1) pendant 4 h à 6 h, puis à 41,5 °C (6.1) pendant 44 h \pm 4 h.

9.3.2 Mode opératoire de recherche B

Incuber la suspension mère (9.2.3) en atmosphère microaéroophile (6.5) à 41,5 °C (6.1) pendant 24 h \pm 2 h.

9.4 Isolement

9.4.1 Mode opératoire de recherche A

Utiliser la culture obtenue dans le milieu d'enrichissement (9.3.1) pour ensemer à l'aide d'une anse stérile de 10 μ l (6.3) la surface du premier milieu d'isolement sélectif, c'est-à-dire la gélose mCCD (B.4).

Procéder de même avec le second milieu d'isolement sélectif choisi (B.5).

9.4.2 Mode opératoire de recherche B

Utiliser la culture obtenue dans le milieu d'enrichissement (9.3.2) pour ensemer à l'aide d'une anse stérile de 10 μ l (6.3) la surface du milieu d'isolement, c'est-à-dire la gélose mCCD (B.4).

9.4.3 Modes opératoires de recherche A, B et C

Incuber les boîtes (9.2.4, 9.4.1 et 9.4.2) à 41,5 °C (6.1) en atmosphère microaéroophile (6.5).

Après 44 h \pm 4 h d'incubation, examiner les boîtes afin de rechercher la présence de colonies caractéristiques et/ou suspectes de *Campylobacter*.

Sur la gélose mCCD, les colonies caractéristiques sont grisâtres, souvent avec un reflet métallique, plates et humides, avec une tendance à s'étaler. Les colonies ont tendance à moins s'étaler sur des surfaces de gélose plus sèches. D'autres formes de colonies peuvent apparaître.

NOTE La reconnaissance des colonies de *Campylobacter* est, dans une large mesure, une question d'expérience et leur apparence peut varier quelque peu, non seulement d'une souche à l'autre, mais également entre deux lots du milieu de culture sélectif utilisé.

9.5 Confirmation de *Campylobacter*

9.5.1 Généralités

Les *Campylobacter* s'altérant rapidement à l'air libre, suivre sans tarder le mode opératoire décrit de 9.5.2 à 9.5.5.