

NORME
INTERNATIONALE

ISO
15213-2

Première édition
2023-11

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

Partie 2:

**Dénombrement de *Clostridium*
perfringens par la technique de
comptage des colonies**

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

*Part 2: Enumeration of Clostridium perfringens by colony-count
technique*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/211af75b-7d82-49f5-90a0-5d6db0d80f35/iso-15213-2-2023>



Numéro de référence
ISO 15213-2:2023(F)

© ISO 2023

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 15213-2:2023](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f1af75b-7d82-49f5-90a0-5d6db0d80f35/iso-15213-2-2023)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f1af75b-7d82-49f5-90a0-5d6db0d80f35/iso-15213-2-2023>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2023

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	2
3 Termes et définitions	2
4 Principe	3
4.1 Généralités	3
4.2 Préparation des dilutions	3
4.3 Dénombrement	3
4.4 Confirmation	4
5 Milieux de culture et réactifs	4
6 Équipement et consommables	4
7 Échantillonnage	5
8 Préparation de l'échantillon pour essai	5
9 Mode opératoire	5
9.1 Généralités	5
9.2 Prise d'essai, suspension mère et dilutions	5
9.3 Traitement thermique pour la sélection des spores	6
9.4 Ensemencement et incubation	6
9.5 Dénombrement des colonies caractéristiques	7
9.6 Confirmation de <i>C. perfringens</i>	7
9.6.1 Sélection des colonies à confirmer	7
9.6.2 Essai à la phosphatase acide	8
9.6.3 Essai sur gélose SIM (mobilité indole sulfite)	8
9.6.4 Différenciation entre souches de <i>C. perfringens</i> pathogènes et non pathogènes pour l'Homme (facultatif)	8
9.6.5 Interprétation	8
10 Expression des résultats	8
11 Validation de la méthode	9
11.1 Étude interlaboratoires	9
11.2 Caractéristiques de performance	9
12 Rapport d'essai	10
13 Assurance qualité	10
Annexe A (normative) Logigramme du mode opératoire	11
Annexe B (normative) Milieux de culture et réactifs	13
Annexe C (informative) Études de validation de la méthode et caractéristiques de performance	19
Annexe D (informative) Différenciation moléculaire entre <i>C. perfringens</i> pathogènes et non pathogènes	22
Bibliographie	44

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'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de propriété revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse www.iso.org/brevets. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/iso/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 463, *Microbiologie de la chaîne alimentaire*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette première édition de l'ISO 15213-2 annule et remplace l'ISO 7937:2004, qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- le Domaine d'application a été élargi aux échantillons prélevés au stade de la production primaire;
- le traitement thermique de 10 min à 80 °C est à présent facultatif, il est appliqué si la flore annexe est élevée ou pour le dénombrement uniquement des spores de *Clostridium (C.) perfringens* dans l'échantillon;
- le milieu sélectif précédemment appelé «gélose sulfite à la cyclosérine (SC)» est à présent appelé «gélose tryptose-sulfite à la cyclosérine (gélose TSC)» sans changement de formulation;
- les méthodes de confirmation décrites ont été modifiées conformément à l'ISO 14189;
- le logigramme à l'[Annexe A](#) normative qui donne une brève description du mode opératoire a été révisé;
- les critères pour les essais de performance du milieu de culture ont été ajoutés à l'[Annexe B](#);
- les caractéristiques de performance ont été ajoutées à l'[Annexe C](#) (informative);

- à l'[Annexe D](#) (informative), deux méthodes moléculaires ont été ajoutées pour une différenciation entre les *C. perfringens* pathogènes et les *C. perfringens* non pathogènes, et une méthode moléculaire est décrite pour la différenciation des souches de type A de *C. perfringens* portant un gène *cpe* codé sur le matériel chromosomique de celles portant un gène *cpe* codé sur les plasmides.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 15213 se trouve sur le site Web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 15213-2:2023](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f1af75b-7d82-49f5-90a0-5d6db0d80f35/iso-15213-2-2023>

Introduction

Clostridium (C.) perfringens est une bactérie à coloration de Gram-positive, anaérobie, qui forme des spores. S'agissant d'une bactérie ubiquitaire, *C. perfringens* se retrouve principalement dans le sol, mais elle se retrouve également dans le tube digestif des humains et des animaux. La présence d'un nombre élevé de *C. perfringens* peut donc indiquer une préparation ou une manipulation inadéquate des produits alimentaires.

Un nombre élevé de *C. perfringens* dans les aliments prêts à consommer peut provoquer des maladies chez l'Homme, qui se traduisent essentiellement par une diarrhée. Les souches sont classées par type toxinique, selon leur capacité à produire des toxines dites «majeures» et «mineures». Les toxi-infections alimentaires sont causées par des isolats de *C. perfringens* qui produisent l'entérotoxine *C. perfringens* (CPE).

Un élément caractéristique est la thermorésistance des spores: elles ont la capacité de germer et de se multiplier dans les aliments prêts à consommer après le processus de cuisson. L'ingestion d'aliments contaminés est suivie d'une maladie gastro-intestinale lorsque les entérotoxines enzymo-résistantes de *C. perfringens* sont libérées pendant la phase de sporulation dans l'intestin grêle. Les souches sont classées par type.

Le présent document décrit la méthode horizontale pour le dénombrement de *C. perfringens* dans les aliments, les aliments pour animaux, les échantillons environnementaux et les échantillons prélevés au stade de la production primaire. La méthode de dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. Sulfito-réductrices est décrite dans l'ISO 15213-1. La méthode de détection de *C. perfringens* est décrite dans l'ISO/TS 15213-3. Ces trois parties sont publiées dans le cadre d'une série de Normes internationales, car les méthodes sont étroitement liées les unes aux autres. Ces méthodes sont souvent utilisées conjointement dans un laboratoire et les milieux et leurs caractéristiques de performance peuvent être similaires.

Les principales modifications techniques énumérées dans l'Avant-propos et introduites dans le présent document par rapport à l'ISO 7937:2004 sont considérées comme des modifications significatives (voir l'ISO 17468).

ISO 15213-2:2023

Ces modifications ont un impact majeur sur les caractéristiques de performance de la méthode. 15213-2-2023

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

Partie 2:

Dénombrement de *Clostridium perfringens* par la technique de comptage des colonies

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de dénombrement de *Clostridium perfringens* 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 utilisateurs du présent document connaissent les pratiques de laboratoire normales. Le présent document ne prétend pas aborder la totalité des aspects liés à la sécurité qui pourraient découler de son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de mettre en place des pratiques de santé et de sécurité appropriées.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie le dénombrement de *Clostridium (C.) perfringens* par la technique de comptage des colonies.

Le présent document s'applique:

- aux produits destinés à la consommation humaine;
- aux produits destinés à l'alimentation animale;
- aux échantillons environnementaux prélevés dans les secteurs de la production et de la distribution des aliments;
- aux échantillons issus du stade de la production primaire.

NOTE Cette méthode a été validée dans le cadre d'une étude interlaboratoires pour les catégories d'aliments suivantes:

- les produits à base de viande prêts à consommer et prêts à réchauffer;
- les œufs et ovoproduits (dérivés);
- les fruits et légumes transformés;
- les préparations et céréales pour nourrissons;
- les aliments composés et les composants de repas.

Elle a également été validée pour les autres catégories suivantes:

- les produits destinés à l'alimentation animale et les aliments pour animaux;
- les échantillons environnementaux (production d'aliments ou d'aliments pour animaux).

Cette méthode ayant été validée pour au moins cinq catégories d'aliments, elle s'applique à un large éventail d'aliments. Pour des informations détaillées sur la validation, voir l'[Article 11](#) et l'[Annexe C](#). Étant donné que cette méthode n'est pas couramment utilisée pour les échantillons au stade de la production primaire, cette catégorie n'a pas été incluse dans l'étude interlaboratoires. Par conséquent, aucune caractéristique de performance n'a été déterminée pour cette catégorie.

Cette méthode horizontale a été initialement développée pour l'examen de tous les échantillons provenant de la chaîne alimentaire. Sur la base des informations disponibles au moment de la publication du présent document, cette méthode est considérée comme parfaitement adaptée à l'examen de tous les échantillons provenant de la chaîne alimentaire. Cependant, en raison de la grande diversité des produits de la chaîne alimentaire, il est possible que cette méthode horizontale ne soit pas appropriée dans ses moindres détails à tous les produits. Néanmoins, il est attendu que les modifications requises soient réduites au minimum afin qu'elles n'entraînent pas de déviation significative de cette méthode horizontale.

Cette technique est adaptée, sans toutefois s'y limiter, au dénombrement des micro-organismes dans les échantillons d'essai avec un minimum de 10 colonies dénombrées par boîte. Cela correspond à un niveau de contamination attendu supérieur à 10 UFC/ml pour les échantillons liquides ou supérieur à 100 UFC/g pour les échantillons solides.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils 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 19036:2019, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives*

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:

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

3.1
***C. perfringens* présumées**
Clostridium perfringens présumées
bactéries formant des spores qui forment des colonies caractéristiques dénombrables dans un milieu sélectif spécifique dans des conditions d'anaérobiose strictes

Note 1 à l'article: Les *C. perfringens* présumées sont des bactéries formant des spores qui sont en mesure de produire des colonies caractéristiques dans les conditions spécifiées dans le présent document.

3.2***C. perfringens* confirmées***Clostridium perfringens* confirmées

bactéries qui produisent des colonies caractéristiques dans le milieu sélectif spécifié dans des conditions d'anaérobiose strictes et possèdent l'enzyme phosphatase acide

3.3***C. perfringens* pathogènes pour l'Homme***Clostridium perfringens* pathogènes pour l'Homme

souches de *C. perfringens* confirmées (3.2) qui sont en mesure de produire l'entérotoxine de *C. perfringens* (CPE), codée par le gène *cpe*

Note 1 à l'article: Le gène *cpe* peut être localisé sur le chromosome ou sur les plasmides. Ces isolats sont en mesure de produire la CPE dans l'intestin grêle pendant la sporulation et de provoquer des maladies chez l'Homme.

3.4**dénombrement de *C. perfringens***dénombrement de *Clostridium perfringens*

détermination du nombre d'unités formant colonies (ufc) de *C. perfringens confirmées* (3.2) par gramme, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif d'échantillonnage lorsqu'un essai spécifié est réalisé

Note 1 à l'article: Les essais spécifiés sont présentés à l'[Article 9](#).

4 Principe**4.1 Généralités**

Une quantité déterminée de l'échantillon d'essai liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits, est déposée dans une boîte de Petri vide et bien mélangée à un milieu de culture gélosé fondu spécifié, constituant ainsi une boîte coulée. Des boîtes supplémentaires sont préparées dans les mêmes conditions à partir de dilutions décimales de l'échantillon pour essai. Après solidification du milieu gélosé, une surcouche est utilisée pour empêcher les colonies d'envahir la surface du milieu. Si l'objectif est de ne dénombrer que les spores, un traitement thermique de 10 min à 80 °C est effectué avant la mise en culture. Par ailleurs, une méthode de différenciation moléculaire entre les souches de *C. perfringens* pathogènes et non pathogènes pour l'Homme est décrite à l'[Annexe D](#).

Lorsqu'il est attendu que le nombre d'UFC soit au niveau ou proche de la limite de détermination, il est préférable d'utiliser des boîtes en double. En cas d'utilisation de boîtes en double exemplaire, il convient que la somme des colonies dans les deux boîtes soit au minimum égale à 10. Dans ce cas, il est attendu que le niveau de contamination soit supérieur à 5 UFC/ml pour les échantillons liquides ou supérieur à 50 UFC/g pour les échantillons solides.

La technique d'ensemencement en profondeur avec une surcouche est particulièrement appropriée pour le dénombrement de produits susceptibles de contenir des colonies envahissantes qui peuvent masquer les colonies des micro-organismes ciblés.

Le dénombrement de *C. perfringens* exige quatre étapes telles que spécifiées à l'[Annexe A](#) normative.

4.2 Préparation des dilutions

Pour la préparation des dilutions décimales à partir des prises d'essai, suivre le mode opératoire spécifié dans la série de normes ISO 6887.

4.3 Dénombrement

Des boîtes de Petri sont ensemencées avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit initial est liquide, ou avec une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas d'autres produits. Des boîtes de Petri supplémentaires sont ensemencées dans les mêmes conditions à partir de

dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère. Un milieu sélectif est ajouté (technique d'ensemencement en profondeur) et une surcouche du même milieu est ensuite coulée.

Les boîtes sont incubées dans des conditions anaérobies à 37 °C pendant 20 h. Après incubation, les colonies caractéristiques, qui présentent une coloration allant du noir ou gris au jaune-brun, sont dénombrées. La couleur des colonies et la zone environnante changent en raison de la formation de sulfure de fer(II) résultant de la réaction entre les ions sulfures et le fer trivalent [Fe(III)] présent dans le milieu.

4.4 Confirmation

Des essais de confirmation sont réalisés. Le résultat calculé est exprimé en unités formant colonie de *C. perfringens* confirmées par volume d'échantillon. En complément, la méthode décrite à l'[Annexe D](#) peut être utilisée pour une différenciation moléculaire entre les souches de *C. perfringens* pathogènes et non pathogènes pour l'Homme.

5 Milieux de culture et réactifs

Suivre les pratiques courantes de laboratoire conformément à l'ISO 7218. La composition des milieux de culture et des réactifs et leur préparation sont spécifiées à l'[Annexe B](#). Pour les essais de performance des milieux de culture, suivre les modes opératoires conformément à l'ISO 11133 et à l'[Annexe B](#).

6 Équipement et consommables

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, à condition que ses spécifications soient convenables. Le matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit doit être utilisé.

6.1 Appareillage approprié pour créer une anaérobiose, une jarre pouvant être hermétiquement fermée ou tout autre équipement approprié permettant de maintenir les conditions d'anaérobiose pendant toute la durée d'incubation du milieu de culture. D'autres systèmes offrant des résultats équivalents, tels que des chambres d'anaérobiose, peuvent être utilisés. Suivre les instructions du fabricant pour leur installation et leur entretien.

La composition de l'atmosphère requise peut être obtenue par ajout d'un mélange de gaz (par exemple à partir d'une bouteille de gaz) après évacuation de l'air de la jarre, par déplacement de l'atmosphère dans une chambre ou par tout autre moyen approprié (comme des cartouches de gaz disponibles dans le commerce). En général, l'incubation anaérobie nécessite une atmosphère contenant une fraction volumique d'oxygène de 1 % et une fraction volumique de dioxyde de carbone comprise entre 9 % et 13 %.

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

6.3 Congélateur, réglable à $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et à $-70\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

6.4 Étuve, réglable à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.5 pH-mètre, d'une exactitude d'étalonnage de $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C.

6.6 Réfrigérateur, réglable à $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

6.7 Flacons, fioles ou tubes stériles, d'une capacité appropriée. Des flacons, fioles ou tubes avec capuchons à vis en métal non toxique ou en plastique peuvent être utilisés.

6.8 Pipettes graduées ou **pipettes automatiques stériles**, de capacités nominales de 10 ml, 1 ml et 0,1 ml.

6.9 Anses stériles, d'environ 3 mm de diamètre (volume de 10 µl) et d'un volume de 1 µl, ou aiguille ou fil à ensemercer.

6.10 Boîtes de Petri stériles, d'environ 90 mm de diamètre et (facultatif) de grandes dimensions (environ 140 mm de diamètre).

6.11 Bain-marie à régulation thermostatique, réglable à une température comprise entre 44 °C et 47 °C et à 80 °C ± 2 °C.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Suivre 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 parviennent à un accord sur ce sujet.

Des techniques d'échantillonnage recommandées sont décrites dans les documents suivants:

- l'ISO/TS 17728 pour les aliments et les aliments pour animaux;
- l'ISO 707 pour le lait et les produits laitiers;
- l'ISO 6887-3 pour les mollusques crus, les tuniciers et les échinodermes de zones de production primaire;
- l'ISO 13307 pour le stade de la production primaire;
- l'ISO 17604 pour les carcasses;
- l'ISO 18593 pour les surfaces.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f1af75b-7d82-49f5-90a0-5d6db0d80f35/iso-15213-2-2023>

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif du produit étudié. Il convient que l'échantillon n'ait pas été endommagé ni modifié au cours du transport ou du stockage.

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. Suivre les modes opératoires spécifiés dans la série de normes ISO 6887. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées s'accordent sur ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Généralités

Le mode opératoire présenté à l'[Annexe A](#) doit être suivi.

9.2 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Suivre les modes opératoires conformément à la série de normes ISO 6887 et à la Norme internationale relative au produit concerné. Préparer une seule série de dilutions décimales à partir de la prise d'essai si le produit est liquide et à partir de la suspension mère dans le cas des autres produits.

9.3 Traitement thermique pour la sélection des spores

S'il ne s'agit que de dénombrer les spores, chauffer la série de dilutions décimales à 80 °C au bain-marie (6.11) pendant 10 min ± 1 min. Le traitement thermique doit être effectué dans les 15 min suivant la préparation de la suspension mère afin d'éviter toute germination des spores. Si le tube n'est pas placé dans le bain-marie dans les 15 min, il convient de le placer immédiatement dans un bac à glace pendant 2 h au maximum.

Durant le traitement thermique, il convient de surveiller la température en plaçant un thermomètre adapté dans un flacon de référence de taille identique au flacon de l'échantillon et contenant le même volume d'eau à la même température initiale que l'échantillon traité (6.7). Il convient de ne pas fermer hermétiquement les tubes durant le traitement thermique. Le temps nécessaire pour atteindre 80 °C ne doit pas dépasser 5 min et peut être réduit au minimum en s'assurant que le niveau d'eau arrive au moins 4 cm au-dessus du niveau de l'échantillon et que le bain-marie soit équipé d'une pompe de circulation afin d'optimiser l'échange thermique.

Commencer le temps de chauffage (10 min) lorsque la température de l'échantillon de référence atteint 80 °C. Après le traitement thermique, il convient que les échantillons soient refroidis immédiatement jusqu'à environ 20 °C.

Il convient que le traitement thermique réduise également la flore compétitive dans certaines matrices contenant un niveau élevé de flore annexe (par exemple, le lactosérum liquide, l'ensilage).

9.4 Ensemencement et incubation

9.4.1 Prendre deux boîtes de Petri stériles d'environ 90 mm de diamètre (6.10). Au moyen d'une pipette stérile (6.8), transférer dans chaque boîte 1 ml d'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère (dilution à 10⁻¹) dans le cas d'autres produits. Si des boîtes sont préparées à partir de plusieurs dilutions, le nombre de boîtes par dilution peut être réduit à un (voir ISO 7218). Lorsque, pour certains produits, il est nécessaire d'estimer de faibles nombres de *C. perfringens*, la limite de dénombrement peut être abaissée d'un facteur de 10 en examinant 10 ml de la suspension mère dans trois grandes boîtes de Petri (140 mm) (6.10).

9.4.2 Prendre une autre boîte de Petri stérile (6.10). Utiliser une autre pipette stérile (6.8) pour déposer 1 ml de la dilution à 10⁻¹ (produits liquides) ou 1 ml de la dilution à 10⁻² (autres produits).

9.4.3 Si nécessaire, répéter le mode opératoire avec d'autres dilutions, en utilisant une nouvelle pipette stérile (6.8) pour chaque dilution décimale.

9.4.4 Le cas échéant et si possible, sélectionner uniquement les étapes de dilutions critiques (au moins deux dilutions décimales successives) afin d'ensemencer des boîtes de Petri (6.10) sur lesquelles pourront être dénombrées entre 10 et 365 colonies par boîte (de 90 mm de diamètre) ou entre 10 et 360 colonies par boîte (de 140 mm de diamètre).

9.4.5 Couler environ 12 ml à 15 ml pour les boîtes de Petri de 90 mm ou 30 ml à 35 ml pour les boîtes de Petri de 140 mm de la gélosé de tryptose-sulfite à la cyclosérine (gélosé TSC) (voir B.2), fondu et tempéré entre 44 °C et 47 °C (6.11), dans chaque boîte de Petri (6.10).

9.4.6 Mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu de culture en faisant tourner les boîtes de Petri et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface horizontale fraîche.

9.4.7 Après solidification complète, couler une surcouche d'environ 5 ml de la gélosé TSC (voir B.2) pour les boîtes de Petri de 90 mm (6.10) ou 12 ml pour les boîtes de Petri de 140 mm (6.10) afin d'empêcher les colonies d'envahir la surface du milieu. Laisser solidifier comme spécifié en 9.4.6.

9.4.8 Retourner les boîtes obtenues en 9.4.7 et incuber (6.4) les boîtes à 37 °C en anaérobiose (6.1).

9.5 Dénombrement des colonies caractéristiques

9.5.1 Après 20 h ± 2 h d'incubation, examiner les boîtes (voir 9.4.8) afin de rechercher la présence de bactéries *C. perfringens* présumées. Une plus longue durée d'incubation peut conduire à un noircissement excessif des boîtes.

Les colonies caractéristiques, présentant une coloration noire ou grise à jaune-brun (même si la coloration est légère) sur la gélose TSC, sont dénombrées.

Les boîtes doivent être dénombrées dans les 30 min qui suivent la fin de l'incubation en anaérobiose, car la couleur des colonies peut s'estomper rapidement et finir par disparaître sous l'effet de l'exposition à l'oxygène. Si des jarres anaérobies sont utilisées, il convient de contrôler les boîtes jarre par jarre ou par petites fractions si l'incubation a été réalisée dans une étuve anaérobie (6.1, 6.4).

NOTE Un noircissement diffus et non spécifique du milieu peut se produire. Le développement de bactéries anaérobies, qui produisent de l'hydrogène (et non du H₂S), peut également réduire le sulfite présent et entraîner un noircissement général du milieu, rendant le dénombrement des colonies caractéristiques difficile.

9.5.2 Sélectionner les boîtes (voir 9.5.1) contenant moins de 150 colonies présumées (pour les boîtes de Petri de 90 mm de diamètre) ou moins de 365 colonies (pour les boîtes de Petri de 140 mm de diamètre). Dénombrer ces colonies et noter le nombre de colonies présumées par boîte. Sélectionner ensuite, au hasard, cinq de ces colonies dans chaque boîte pour confirmation (voir 9.6). Pour le dénombrement des boîtes présentant des nombres élevés ou faibles de colonies présumées, voir l'ISO 7218.

9.6 Confirmation de *C. perfringens*

9.6.1 Sélection des colonies à confirmer

9.6.1.1 En vue de la confirmation, prélever cinq colonies présumées dans chaque boîte retenue pour le dénombrement (voir 9.5.2). Si plusieurs morphologies sont présentes parmi les colonies, sélectionner une colonie de chaque morphologie pour la sous-culture et la confirmation.

9.6.1.2 Étaler chaque colonie sélectionnée à l'aide d'une anse stérile (6.9) sur une boîte de gélose au sang non sélective, par exemple, de la gélose Columbia (voir B.3). Si la gélose au sang n'est pas disponible, une base de gélose Columbia ou un autre milieu riche en nutriments (par exemple, la gélose tryptone soja ou la gélose pour infusion cœur-cervelle) peuvent être utilisés.

Laisser les boîtes de gélose se stabiliser à température ambiante si elles étaient stockées à une température inférieure. Si nécessaire, sécher la surface des boîtes avant utilisation (voir l'ISO 11133).

Plusieurs isolats peuvent être striés sur des secteurs identifiés. Il convient que les stries donnent des colonies bien isolées.

Incuber les boîtes en anaérobiose (6.1) à 37 °C (6.4) pendant 20 h ± 2 h. Immédiatement après incubation, sélectionner des colonies fraîchement cultivées et bien isolées en vue de la confirmation. La confirmation peut être réalisée soit par essai à la phosphatase acide, soit par essai sur gélose SIM (mobilité indole sulfite).

NOTE Des modes opératoires alternatifs (voir l'ISO 7218) peuvent être utilisés pour confirmer que les isolats font partie des *C. perfringens*, sous réserve d'avoir validé la pertinence du mode opératoire alternatif (voir l'ISO 16140-4 ou l'ISO 16140-6).

Après incubation, ces boîtes peuvent être réfrigérées à 5 °C (6.6) pendant 48 h au maximum avant analyse. Pour les boîtes incubées en anaérobiose, maintenir l'atmosphère anaérobie.

9.6.2 Essai à la phosphatase acide

9.6.2.1 Il est établi que, outre *C. perfringens*, d'autres souches de *Clostridium* (par exemple, certaines souches de *C. baratii*) peuvent produire de la phosphatase acide, mais cette aptitude est très limitée. Un pourcentage très faible de faux positifs est donc attendu.

9.6.2.2 Les colonies se développant en anaérobiose sur des boîtes de gélose au sang ou de gélose nutritive sont étalées sur un papier filtre et 2 à 3 gouttes de réactif de la phosphatase acide (B.4) sont placées sur les colonies. Si un kit d'essai disponible dans le commerce est utilisé, suivre les instructions du fabricant.

NOTE Il est possible d'ajouter au goutte-à-goutte le réactif de la phosphatase acide sur les colonies, si aucune autre étude des colonies n'est nécessaire.

9.6.2.3 L'apparition d'une couleur violacée dans les 3 min à 4 min est considérée comme une réaction positive.

9.6.3 Essai sur gélose SIM (mobilité indole sulfite)

Des colonies qui se sont développées en anaérobiose sur des boîtes de gélose au sang ou sur des boîtes de gélose nutritive sont inoculées par piqûre droite et profonde dans des tubes contenant de la gélose SIM (B.5). Incuber les tubes pendant 22 h ± 2 h à 37 °C (6.4). Après incubation, la lecture des tubes est effectuée pour déterminer:

- la production de sulfite: les tubes présentant un noircissement sont positifs;
- la mobilité: les tubes présentant une croissance en dehors de la piqûre d'inoculation sont positifs;
- la production d'indole: les tubes présentant un anneau de couleur rouge après ajout du réactif de Kovacs (B.6) sont positifs.

C. perfringens est positive à la production de sulfite et négative à la production d'indole et à la mobilité.

9.6.4 Différenciation entre souches de *C. perfringens* pathogènes et non pathogènes pour l'Homme (facultatif)

En complément, la méthode décrite à l'Annexe D peut être utilisée pour une différenciation moléculaire entre les souches de *C. perfringens* pathogènes et non pathogènes pour l'Homme.

9.6.5 Interprétation

C. perfringens produit des colonies de couleur noire ou grise à jaune-brune sur la gélose TSC, même si la coloration est légère, et possède la phosphatase acide ou est positive à la production de sulfite, négative à la production d'indole et à la mobilité dans la gélose SIM.

10 Expression des résultats

Pour le calcul des résultats, suivre le ou les modes opératoires conformément à l'ISO 7218. Calculer et exprimer les résultats en nombre de *C. perfringens* confirmées ou, si la méthode de l'Annexe D a également été utilisée, de *C. perfringens*, pathogènes pour l'Homme confirmées en UFC par gramme, par millilitre ou par centimètre carré. Lorsque la zone échantillonnée n'est pas connue, exprimer les résultats par dispositif d'échantillonnage, tel que tissu, éponge, écouvillon ou baguette.

Si un prétraitement thermique pour la sélection de spores (9.3) a été utilisé, le résultat est exprimé en nombre de spores de *C. perfringens* confirmées ou si la méthode de l'Annexe D a également été utilisée pour une différenciation, en nombre de spores de *C. perfringens* pathogènes pour l'Homme confirmées en UFC par gramme, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif d'échantillonnage.