



Spécification technique

ISO/TS 15213-3

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

Partie 3: Recherche de *Clostridium* *perfringens*

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

Part 3: Detection of Clostridium perfringens

Première édition
2024-05

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

[ISO/TS 15213-3:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/94d25072-f5ab-4ac6-8098-3afa81a87e37/iso-ts-15213-3-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/94d25072-f5ab-4ac6-8098-3afa81a87e37/iso-ts-15213-3-2024>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2024

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	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	2
3 Termes et définitions	2
4 Principe	3
4.1 Généralités	3
4.2 Enrichissement en milieu sélectif liquide	3
4.3 Isolement sur milieu sélectif solide	3
4.4 Confirmation	3
5 Milieux de culture et réactifs	3
6 Appareillage et consommables	3
7 Échantillonnage	4
8 Préparation de l'échantillon pour essai	5
9 Mode opératoire	5
9.1 Généralités	5
9.2 Prise d'essai et suspension mère	5
9.3 Enrichissement sélectif	5
9.4 Isolement	5
9.5 Confirmation de <i>C. perfringens</i>	6
9.5.1 Sélection des colonies à confirmer	6
9.5.2 Essai à la phosphatase acide	6
9.5.3 Essai sur gélose SIM (Mobilité indole sulfite)	7
9.5.4 Différenciation entre souches de <i>C. perfringens</i> pathogènes et non pathogènes pour l'Homme (facultatif)	7
9.5.5 Interprétation	7
10 Expression des résultats	7
11 Caractéristiques de performance indicatives de la méthode	7
11.1 Validation basée sur les principes de l'ISO 17468	7
11.2 Caractéristiques de performance indicatives	7
12 Rapport d'essai	10
13 Contrôle qualité	10
Annexe A (normative) Logigramme du mode opératoire	11
Annexe B (normative) Milieux de culture et réactifs	12
Annexe C (informative) Caractéristiques de performance indicatives de la méthode utilisant la gélose d'isolement TSC et l'essai de confirmation à la phosphatase acide	21
Annexe D (informative) Caractéristiques de performance indicatives de la méthode utilisant la gélose d'isolement TSC et l'essai sur gélose SIM	24
Annexe E (informative) Caractéristiques de performance indicatives de la méthode utilisant la gélose d'isolement LENA et l'essai de confirmation à la phosphatase acide	27
Annexe F (informative) Caractéristiques de performance indicatives de la méthode utilisant la gélose d'isolement LENA et l'essai de confirmation sur gélose SIM	30
Annexe G (informative) Différenciation moléculaire entre <i>Clostridium perfringens</i> pathogènes et non pathogènes	33
Bibliographie	34

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/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).

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.

Introduction

Clostridium (C.) perfringens est une bactérie à coloration de Gram positive, anaérobie, formant des spores. S'agissant d'une bactérie ubiquitaire, *C. perfringens* se trouve principalement dans le sol, mais 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 différentes toxines dites «majeures» et «mineures». Les toxi-infections alimentaires liées à *C. perfringens* sont essentiellement causées par des isolats de *C. perfringens* qui produisent l'entérotoxine CPE (Clostridium Perfringens Enterotoxin).

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 de *C. perfringens*, capables de résister à la lyse enzymatique, 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 la recherche 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. Sulfite-réductrices est décrite dans l'ISO 15213-1 et l'ISO 15213-2 décrit la méthode de dénombrement de *C. perfringens*. 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 mises en œuvre consécutivement dans un laboratoire.

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

[ISO/TS 15213-3:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/94d25072-f5ab-4ac6-8098-3afa81a87e37/iso-ts-15213-3-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/94d25072-f5ab-4ac6-8098-3afa81a87e37/iso-ts-15213-3-2024>

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

Partie 3: Recherche de *Clostridium perfringens*

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les analyses de recherche de *Clostridium perfringens* ne soient effectuées 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 contaminés. Il convient que les utilisateurs du présent document connaissent les pratiques normales de laboratoire. Le présent document ne prétend pas traiter 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 définit la recherche de *Clostridium* (*C.*) *perfringens*.

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.

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.

NOTE Des études interlaboratoires avec un petit nombre de laboratoires participants (<10) ont été réalisées pour les catégories d'aliments suivants:

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

La méthode a également été validée avec un petit nombre de laboratoires participants pour la catégorie suivante:

- les échantillons environnementaux (production d'aliments ou d'aliments pour animaux).

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. La méthode n'a pas été validée pour la catégorie «aliments pour animaux», car les échantillons pour essai utilisés dans l'étude interlaboratoires étaient déjà naturellement contaminés par *C. perfringens*. Étant donné le nombre limité de laboratoires participants dans les études interlaboratoires, les caractéristiques de performance calculées peuvent être utilisées comme valeurs indicatives pour la performance de la méthode. Pour de plus amples informations sur la validation, voir l'[Article 11](#) et les [Annexes C à F](#).

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 pour les examens microbiologiques*

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:

- 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 sporulées formant des colonies caractéristiques sur un milieu sélectif spécifique dans des conditions d'anaérobiose strictes

Note 1 à l'article: Les colonies de *C. perfringens* présumées sont des bactéries formant des spores qui sont capables 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 sur le milieu sélectif spécifié dans des conditions d'anaérobiose strictes et qui possèdent l'enzyme phosphatase acide, ou sont capables de produire des sulfites, ne sont pas capables de produire de l'indole et ne sont pas mobiles (gélose Sulfate Indole Motility)

3.3

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

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

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

3.4

recherche de *C. perfringens* recherche de *Clostridium perfringens*

détermination de colonies confirmées de *C. perfringens* (3.2) dans une masse, un volume de produit, sur une surface ou un objet donnés, 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

La recherche de *C. perfringens* requiert trois étapes successives telles que spécifiées à l'Annexe A.

4.2 Enrichissement en milieu sélectif liquide

Un milieu de culture sélectif (à température ambiante) est ensemencé avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit initial est liquide, ou avec une quantité déterminée d'une suspension mère dans le cas d'autres produits. Le milieu sélectif ensemencé est incubé à 46 °C pendant 18 h.

4.3 Isolement sur milieu sélectif solide

À partir des cultures obtenues en 4.2, deux milieux sélectifs gélosés sont ensemencés. Les boîtes sont incubées à 37 °C et à 46 °C respectivement pendant 24 h en anaérobiose.

4.4 Confirmation

Des essais de confirmation sont réalisés. Le résultat est exprimé en tant que *C. perfringens* «détecté» ou «non détecté» par volume d'échantillon. En complément, la méthode mentionnée à l'Annexe G peut être utilisée pour une différenciation moléculaire entre les souches de *C. perfringens* non pathogènes et 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 ainsi que 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 Appareillage et consommables

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, à condition que ses spécifications soient appropriées. L'appareillage 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 créer et 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/enceintes anaérobies, 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 règle générale, l'incubation en anaérobiose nécessite une atmosphère contenant une fraction volumique d'oxygène inférieure à 1 % et une fraction volumique de dioxyde de carbone comprise entre 9 % et 13 %.

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

6.3 Enceinte de séchage, ou four, ventilée, réglable entre 25 °C et 50 °C.

6.4 Congélateurs, réglable à -20 °C ± 2 °C et en dessous de -70 °C.

6.5 Étuve(s), réglable(s) à 37 °C ± 1 °C, 46 °C ± 1 °C.

6.6 pH-mètre, avec une précision d'étalonnage de ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

6.7 Réfrigérateur, fonctionnant à 5 °C ± 3 °C.

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

6.9 Pipettes graduées ou pipettes automatiques stériles, de capacités nominales de 10 ml et 1 ml.

6.10 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 (oëse métallique).

6.11 Boîtes de Petri stériles, d'un diamètre d'environ 90 mm.

6.12 Bain-marie à régulation thermostatique, réglable à une température comprise entre 44 °C et 47 °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.

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.

Si l'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 et suspension mère

Suivre les modes opératoires conformément à la série de normes ISO 6887 et à la Norme internationale relative au produit concerné.

Préparer la suspension mère si le produit concerné n'est pas liquide. Ajouter 1 ml (6.9) de l'échantillon liquide ou 1 ml (6.9) de la suspension mère (0,1 g de produit) à 9 ml de Milieu Perfringens Rapide (RPM, B.2). Sinon, 10 ml (6.9) de l'échantillon liquide ou de la suspension mère (1 g de produit) sont ajoutés à 90 ml de RPM (B.12).

Il est possible de mélanger ou de regrouper des échantillons du même type afin de réduire la charge de travail lorsqu'un grand nombre d'échantillons doit être examiné. Cela peut être nécessaire pour refléter la qualité microbiologique d'un grand lot de produit d'échantillons environnementaux ou requis par la législation régionale.

De même, un certain nombre de prises d'essai peuvent être regroupées et examinées ensemble dans de plus grandes quantités de milieux, ou les cultures de (pré)enrichissement des prises d'essai peuvent être regroupées et soumises à un seul essai. Ces modes opératoires de regroupement sont décrits dans l'ISO 6887-1. La possibilité de regrouper des échantillons d'un certain type doit être vérifiée conformément au protocole décrit dans l'ISO 6887-1 .

NOTE La validation de cette méthode peut être effectuée conformément aux documents appropriés de l'ISO 16140 (toutes les parties).

9.3 Enrichissement sélectif

Incuber le bouillon d'enrichissement sélectif RPM dans des tubes ou flacons fermés (9.2) à 46 °C (6.5) pendant 18 h ± 2 h.

9.4 Isolement

Laisser les boîtes de milieu d'ensemencement (B.3 et B.4) se stabiliser à température ambiante si elles étaient stockées à une température inférieure. Si nécessaire, sécher la surface des boîtes (voir ISO 11133) dans une enceinte de séchage ou un four (6.3) avant utilisation.

À partir de l'enrichissement sélectif obtenu en 9.3, ensemercer à l'aide d'une anse de 10 µl (6.10) la surface d'une boîte de Pétri (6.11) contenant le milieu sélectif gélosé tryptose-sulfite à la cyclosérine (TSC, B.3) et d'une boîte de Pétri (6.11) contenant le milieu sélectif gélosé lactose au jaune d'œuf et à la néomycine (LENA, B.4).

Incuber les boîtes gélosées TSC en anaérobiose (6.1) dans une étuve (6.5) à 37 °C pendant 24 h ± 2 h. Incuber les boîtes gélosées LENA en anaérobiose (6.1) dans une étuve (6.5) à 46 °C pendant 24 h ± 2 h.

NOTE Après ensemencement des boîtes gélosées TSC, une surcouche de gélose TSC peut être utilisée pour empêcher les colonies d'envahir la surface du milieu. Verser environ 5 ml du milieu TSC (voir B.3) en surcouche et laisser solidifier les boîtes de Pétri sur une surface fraîche horizontale.

9.5 Confirmation de *C. perfringens*

9.5.1 Sélection des colonies à confirmer

9.5.1.1 Les colonies typiques sur gélose TSC sont noires ou grises à jaune-brun, même si la couleur est pâle.

Les colonies typiques sur LENA présentent une couleur jaune (fermentation acide à partir du lactose) et une précipitation (réaction à la lécithinase).

Les boîtes gélosées TSC doivent être lues 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 enceinte anaérobie (6.1, 6.5).

Pour confirmation, prélever cinq colonies présumées de *C. perfringens* dans chaque boîte contenant des colonies typiques (voir 9.4). Si plusieurs morphologies sont présentes parmi les colonies, sélectionner une colonie de chaque morphologie pour la sous-culture et la confirmation.

9.5.1.2 Laisser les boîtes gélosées 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).

Étaler chaque colonie sélectionnée à l'aide d'une anse stérile (6.10) sur une boîte de gélose au sang non sélective, par exemple, de la gélose Columbia (B.5). 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 d'infusion de cœur et de cervelle) peuvent être utilisés avec ou sans sang. Plusieurs isolats peuvent être étalés sur des secteurs identifiés de boîtes gélosées non sélectives. Il convient que les stries donnent des colonies bien isolées.

Incuber les boîtes en anaérobiose (6.1) à 37 °C (6.5) 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 par essai à la phosphatase acide (9.5.2), ou par essai sur gélose SIM (Mobilité Indole Sulfite) (9.5.3).

NOTE Des modes opératoires alternatifs (voir l'ISO 7218) peuvent être utilisés pour confirmer que les colonies typiques correspondent à *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 (6.7) pendant 48 h au maximum avant lecture. Pour les boîtes incubées en anaérobiose, maintenir l'atmosphère anaérobie.

9.5.2 Essai à la phosphatase acide

9.5.2.1 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.

9.5.2.2 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.6) sont déposées 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.

9.5.2.3 Une couleur violacée développée dans les 3 min à 4 min est considérée comme une réaction positive.