
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Méthode horizontale
pour la recherche de *Yersinia*
enterocolitica pathogènes**

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the
detection of pathogenic Yersinia enterocolitica*

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



Numéro de référence
ISO 10273:2017(F)

© ISO 2017

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



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.....	vii
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Abréviations	2
5 Principe	2
5.1 Généralités.....	2
5.2 Ensemencement direct à partir du milieu liquide d'enrichissement.....	2
5.3 Enrichissement dans le milieu liquide d'enrichissement et le milieu liquide sélectif d'enrichissement.....	2
5.4 Isolement après enrichissement et identification.....	3
5.5 Confirmation.....	3
6 Milieux de culture et réactifs	3
7 Matériel et consommables	3
8 Échantillonnage	4
9 Préparation de l'échantillon pour essai	4
10 Mode opératoire (voir Annexe A)	4
10.1 Prise d'essai et suspension mère.....	4
10.2 Ensemencement direct sur gélose sélective.....	5
10.3 Enrichissement.....	5
10.4 Isolement et incubation des boîtes.....	5
10.4.1 Isolement à partir du PSB et de l'ITC par traitement au KOH sur gélose CIN.....	5
10.4.2 Isolement à partir du PSB et de l'ITC par traitement au KOH sur gélose chromogène (facultatif).....	5
10.5 Identification des colonies caractéristiques.....	5
10.6 Confirmation.....	6
10.6.1 Généralités.....	6
10.6.2 Sélection des colonies en vue de la confirmation.....	6
10.6.3 Détermination des espèces de <i>Yersinia</i> pathogènes.....	7
10.6.4 Confirmation des <i>Y. enterocolitica</i> pathogènes.....	9
10.6.5 Interprétation des essais de confirmation de <i>Y. enterocolitica</i>	10
10.6.6 Interprétation des essais de confirmation de <i>Y. enterocolitica</i> pathogènes.....	11
10.7 Biotypage de <i>Y. enterocolitica</i> (facultatif).....	11
10.7.1 Généralités.....	11
10.7.2 Fermentation du xylose.....	11
10.7.3 Essai tween-estérase.....	11
10.7.4 Fermentation de la salicine (facultatif) et du tréhalose.....	12
10.7.5 Formation d'indole.....	12
10.7.6 Interprétation des essais de biotypage.....	12
11 Expression des résultats	13
12 Caractéristiques de performance de la méthode	13
12.1 Étude interlaboratoires.....	13
12.2 Sensibilité.....	13
12.3 Spécificité.....	13
12.4 LOD ₅₀	13
13 Rapport d'essai	13
14 Assurance de la qualité	14

Annexe A (normative) Schémas des modes opératoires	15
Annexe B (normative) Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs	17
Annexe C (informative) Études de validation de méthode et caractéristiques de performance	32
Annexe D (informative) Mode opératoire pour l'enrichissement par le froid	35
Bibliographie	40

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai

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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html.

Le présent document a été élaboré(e) 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 troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 10273:2003), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications apportées à cette troisième édition sont:

- pour la confirmation des *Y. enterocolitica* pathogènes, des essais liés à la pathogénicité ont été ajoutés ou spécifiés et mis en exergue. En conséquence, l'adjectif «préssumé» a été supprimé du titre (*Y. enterocolitica* pathogènes) car la norme contient des essais obligatoires liés à la pathogénicité et permet la séparation des *Y. enterocolitica* pathogènes et non pathogènes;
- l'ensemencement direct sur gélose à la cefsulodine, à l'Irgasan^{TM1)} et à la novobiocine (CIN) a été ajouté;
- le temps d'incubation a été modifié pour le bouillon d'enrichissement à la peptone, au sorbitol et aux sels biliaires (PSB) et la gélose CIN;
- l'ensemencement et le temps d'incubation pour le bouillon d'enrichissement à l'IrgasanTM, à la ticarcilline et au chlorate de potassium (ITC) ont été modifiés et spécifiés;
- la gélose Salmonella/Shigella avec désoxycholate de sodium et chlorure de calcium (SSDC) a été remplacée par la gélose CIN et un milieu chromogène facultatif;

1) L'IrgasanTM est un exemple de produit adapté disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.

- l'ensemencement de la gélose CIN sans traitement préalable à l'hydroxyde de potassium (KOH) du bouillon d'enrichissement a été changé en un mode opératoire facultatif (parallèlement au traitement au KOH obligatoire);
- la préparation (durée de conservation) des solutions de KOH et de sulfate de fer(II) ammoniacal a été spécifiée;
- les colonies suspectes issues de la culture primaire sont ensemencées en stries (purifiées) sur gélose CIN et (facultatif) sur gélose chromogène afin de faciliter une meilleure sélection des colonies caractéristiques ayant besoin d'une confirmation. L'emploi d'un stéréomicroscope dans l'identification des colonies caractéristiques est mis en avant;
- tous les essais de confirmation biochimique, sauf l'essai de recherche de la pyrazinamidase, peuvent être remplacés par une recherche par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel du gène *ail* conformément à l'ISO/TS 18867;
- cinq essais de confirmation (indole, tréhalose, xylose, citrate, tween-estérase) sont devenus facultatifs. L'essai de recherche de la fermentation de la salicine a été ajouté en tant qu'essai facultatif (biotypage). L'essai de recherche de l'exigence en calcium à 37 °C a été remplacé par un essai sur rouge Congo et oxalate de magnésium (CR-MOX). Trois essais (oxydase, gélose de Kligler et décarboxylation de l'ornithine) ont été supprimés;
- le mode opératoire d'enrichissement par le froid de *Y. enterocolitica* a été ajouté à l'[Annexe D](#);
- les caractéristiques de performance ont été ajoutées à l'[Annexe C](#).
- les essais de performance pour l'assurance qualité des milieux de culture ont été ajoutés à l'[Annexe B](#) et l'[Annexe D](#).

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai

Introduction

Le présent document spécifie une méthode horizontale pour la recherche des *Yersinia enterocolitica* associées aux maladies chez l'homme. En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que la présente méthode horizontale ne soit pas applicable dans tous ses détails à certains d'entre eux et que, pour certains autres, il soit nécessaire d'employer d'autres méthodes. Néanmoins, il convient que tous les efforts soient faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible et il est à espérer qu'il n'y aura d'écarts par rapport à celle-ci qu'en cas d'absolue nécessité et pour des raisons techniques.

Les principales modifications énumérées en préambule et introduites dans le présent document par rapport à l'ISO 10273:2003, sont considérées comme des modifications majeures (voir l'ISO 17468).

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 de toutes les méthodes d'essai ne peut être réalisée de façon immédiate; de ce fait, il peut déjà exister des Normes internationales et/ou nationales pour certains groupes de produits, qui ne concordent pas avec la présente méthode horizontale. 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.

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche de *Yersinia enterocolitica* pathogènes

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de recherche de *Yersinia enterocolitica* pathogènes ne soient réalisés que dans des laboratoires équipés à cet effet et sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit pris pour se débarrasser de tout le matériel incubé. Il convient que l'utilisateur du présent document maîtrise les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui peuvent être liés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées de sécurité, de protection de la santé et de garantir la conformité vis-à-vis des réglementations nationales en vigueur.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode horizontale pour la recherche des *Y. enterocolitica* associées aux maladies chez l'homme. Ce document est applicable

- aux produits destinés à l'alimentation humaine et animale, et
- aux échantillons d'environnement pour la production et la distribution des aliments.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application 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 11133:2014, *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

***Yersinia enterocolitica* pathogènes**

bactéries psychrotrophes formant des colonies caractéristiques sur des milieux solides sélectifs, possédant des propriétés biochimiques et moléculaires répondant aux critères de pathogénicité décrits lorsque des essais de confirmation sont réalisés conformément au présent document

3.2

recherche de *Yersinia enterocolitica* pathogènes

détermination de la présence ou de l'absence des *Yersinia enterocolitica* pathogènes (3.1) dans une masse ou un volume donné(e) de produit ou une surface spécifiée, lorsque les essais sont réalisés conformément au présent document

4 Abréviations

Pour les besoins du présent document, les abréviations suivantes s'appliquent.

CEB	Bouillon d'enrichissement par le froid
CIN	Cefsulodine, Irgasan™ et Novobiocine
CR-MOX	Rouge Congo et oxalate de magnésium
ITC	Irgasan™, Ticarcilline et Chlorate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
MRB	Milieu Rappaport modifié
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PSB	Peptone, sorbitol et sels biliaires
TSB	Bouillon tryptique soja
WDCM	World Data Centre for Microorganisms

5 Principe

5.1 Généralités

La recherche de *Y. enterocolitica* pathogènes nécessite quatre étapes successives (voir l'[Annexe A](#) pour le schéma du mode opératoire et la confirmation). Outre le mode opératoire général, par exemple pour les investigations réalisées lors d'une épidémie, un mode opératoire facultatif d'enrichissement par le froid (voir l'[Annexe D](#)) peut être employé.

5.2 Ensemencement direct à partir du milieu liquide d'enrichissement

L'échantillon est homogénéisé dans un milieu liquide d'enrichissement (bouillon PSB), puis une quantité spécifiée est ensemencée sur deux à quatre boîtes de gélose CIN.^[15] Les boîtes ensemencées sont incubées à 30 °C pendant 24 h.

NOTE Des boîtes supplémentaires, telles qu'une gélose chromogène pour la recherche de *Y. enterocolitica* pathogènes, peuvent également être utilisées^{[9][13][18]}.

5.3 Enrichissement dans le milieu liquide d'enrichissement et le milieu liquide sélectif d'enrichissement

Une quantité spécifiée de milieu d'enrichissement PSB ensemencé (5.2) est transférée dans un milieu liquide sélectif d'enrichissement constitué d'un bouillon ITC.^[17] Le bouillon ITC et la suspension mère de PSB sont incubés à 25 °C pendant 44 h.

5.4 Isolement après enrichissement et identification

À partir des enrichissements obtenus en 5.3, un isolement sur gélose CIN est effectué en transférant tout d'abord une quantité spécifiée de milieu d'enrichissement (5.3, voir l'Article 10 pour le mode opératoire) dans une solution de KOH à 0,5 % et, après mélange pendant une durée spécifiée (traitement au KOH ou traitement alcalin), en ensemençant une boîte de CIN. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30 °C pendant 24 h. Les colonies typiques de *Y. enterocolitica* pathogènes sont identifiées (voir 10.5) et la morphologie de la colonie est vérifiée en tant que *Y. enterocolitica* présumée pathogène par mises en culture successives sur des boîtes sélectives (voir 10.5).

NOTE Des boîtes supplémentaires, telles qu'une gélose chromogène pour la recherche de *Y. enterocolitica* pathogènes, peuvent également être utilisées[9][13][18].

5.5 Confirmation

Sur les colonies identifiées comme *Y. enterocolitica* pathogènes présumées (5.2 et 5.4), la confirmation de *Y. enterocolitica* pathogènes est réalisée par des essais appropriés de confirmation biochimique et/ou moléculaire (voir 10.6 et Figure A.2).

6 Milieux de culture et réactifs

Voir l'ISO 7218 pour les pratiques courantes de laboratoire.

Voir l'ISO 11133 et l'Annexe B pour les essais de performance des milieux de culture.

La composition des milieux de culture et des réactifs et leur préparation sont décrites dans l'Annexe B. Il est également possible d'utiliser des milieux complets déshydratés, des diluants ou des milieux prêts à l'emploi. Dans ce cas, suivre les instructions du fabricant.

7 Matériel et consommables

Le matériel jetable est une alternative acceptable à la verrerie réutilisable, à condition que ses spécifications soient adaptées à l'usage prévu. Utiliser le matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218) et en particulier ce qui suit.

7.1 Appareil pour la stérilisation par chaleur sèche (four) ou par chaleur humide (autoclave).

Voir l'ISO 7218.

7.2 Étuves, conformément à l'ISO 7218, capables de fonctionner à 4 °C ± 2 °C, 25 °C ± 1 °C, 30 °C ± 1 °C et 37 °C ± 1 °C.

7.3 Poches d'homogénéisateur, tubes à essai, flacons et/ou fioles stériles, de capacité appropriée.

7.4 Boîtes de Petri, de 90 mm de diamètre environ et de grandes dimensions (facultatif) (environ 140 mm de diamètre).

7.5 Pipettes. Pipettes graduées ou pipettes automatiques, avec une grande ouverture et de capacités nominales de 1 ml et 10 ml, respectivement par divisions de 0,1 ml et 0,5 ml et pipettes Pasteur.

7.6 Anses et étaleurs. Anses stériles, d'environ 6 mm de diamètre (10 µl de volume), et aiguille ou fil d'ensemencement. Étaleurs à usage unique en L ou en T. Cotons-tiges (protocole facultatif dans l'Annexe D).

7.7 Stéréomicroscope, équipé d'un éclairage à fond noir ou de transillumination oblique (angle de 45°).

7.8 Homogénéisateur péristaltique.

8 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Se reporter à la Norme internationale spécifique traitant du produit concerné. S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique pour l'échantillonnage du produit concerné, il convient que les parties concernées s'accordent 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 13307 pour le stade de production primaire;
- l'ISO 17604 pour les carcasses;
- l'ISO 18593 pour les échantillons d'environnement.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon qui soit représentatif et il convient que cet échantillon n'ait été ni endommagé ni modifié lors du transport ou du stockage.

9 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique au produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il convient que les parties concernées s'accordent sur ce sujet.

10 Mode opératoire (voir [Annexe A](#))

10.1 Prise d'essai et suspension mère

10.1.1 Voir le document pertinent de l'ISO 6887 (toutes les parties) ou toute autre Norme internationale spécifique au produit à examiner.

10.1.2 En règle générale, pour la préparation de la suspension mère, utiliser comme diluant le milieu de pré-enrichissement spécifié au [B.2](#) (bouillon PSB). Avant de l'utiliser, préchauffer le bouillon PSB à température ambiante.

En général, une quantité donnée de prise d'essai (masse ou volume) est ajoutée à une quantité donnée de PSB (masse ou volume) afin d'obtenir une dilution 1/10. Pour cet essai, une prise d'essai de 25 g est mélangée avec 225 ml de PSB.

Homogénéiser la suspension, de préférence à l'aide d'un homogénéisateur péristaltique ([7.8](#)) pendant 1 min.

Le présent document est validé pour des prises d'essai allant jusqu'à 25 g ou ml. Une prise d'essai plus petite peut être utilisée sans qu'il soit nécessaire de procéder à une validation/vérification supplémentaire, à condition de maintenir le même rapport entre le bouillon d'enrichissement et la prise d'essai. Une prise d'essai plus grande que celle initialement validée peut être utilisée à condition qu'une étude de validation/vérification ait montré l'absence d'effets négatifs sur la recherche des *Y. enterocolitica* pathogènes.

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

10.1.3 Préparer la suspension d'enrichissement sélectif ITC en transférant 10 ml de suspension PSB (10.1.2) dans 90 ml de bouillon ITC (B.3) et mélanger.

10.2 Ensemencement direct sur gélose sélective

En utilisant la suspension mère de PSB obtenue (10.1.2), diviser un volume total de 1 ml sur deux à quatre boîtes de gélose CIN (B.6) et l'étaler sur les boîtes avec un étaleur (7.6).

Inverser les boîtes de CIN et les placer dans l'étuve (7.2) réglée à 30°C pendant 24 h ± 2 h.

NOTE 1 Le séchage des boîtes de gélose CIN (par exemple dans une armoire à flux laminaire) avant ensemencement pendant une demi-heure peut être exigé pour une absorption complète de l'inoculum dans la gélose.

NOTE 2 Le nombre de boîtes de gélose CIN à utiliser dépend du niveau attendu de microflore annexe des échantillons.

10.3 Enrichissement

Incuber la suspension mère dans le PSB (10.1.2) et le bouillon d'enrichissement sélectif ITC (10.1.3) à 25 °C (7.2) pendant 44 h ± 4 h (sans agitation).

10.4 Isolement et incubation des boîtes

10.4.1 Isolement à partir du PSB et de l'ITC par traitement au KOH sur gélose CIN

À l'aide d'une pipette stérile (7.5), transférer 0,5 ml du milieu d'enrichissement PSB (10.3) dans 4,5 ml de solution de KOH (B.5) (préparée la veille de son utilisation), puis mélanger.^[7] Au bout de 20 s ± 5 s après l'addition du milieu d'enrichissement PSB à la solution de KOH, ensemer en stries, à l'aide d'une anse (7.6), la surface d'une boîte de gélose CIN (B.6) afin d'obtenir des colonies bien séparées. Répéter le mode opératoire pour le milieu d'enrichissement ITC (10.3).

NOTE 1 Pour garantir les performances de la méthode, il est essentiel de préparer le KOH la veille de son utilisation. Se reporter aux Annexes B et C.

Inverser les boîtes de CIN et les placer dans l'étuve (7.2) réglée à 30°C pendant 24 h ± 2 h.

NOTE 2 En outre, il peut être intéressant d'ensemencer [à l'aide d'une anse (7.6)] les boîtes de gélose CIN avec des milieux PSB et ITC non traités (sans traitement au KOH).

NOTE 3 Pendant le traitement au KOH, le milieu d'enrichissement est dilué selon le rapport 1/10. De plus, ce traitement peut réduire le nombre d'*Y. enterocolitica* pathogènes dans la solution. Dans certains cas, il peut donc être intéressant d'ensemencer une boîte de CIN supplémentaire avec 0,1 ml d'inoculum.

10.4.2 Isolement à partir du PSB et de l'ITC par traitement au KOH sur gélose chromogène (facultatif)

Répéter le mode opératoire décrit en 10.4.1 et ensemer, après traitement au KOH, à l'aide d'une anse (7.6), la surface d'une boîte de gélose chromogène^{[9][13][18]} afin d'obtenir des colonies bien séparées.

Incuber les boîtes chromogènes conformément aux instructions du fabricant.

10.5 Identification des colonies caractéristiques

Après 24 h ± 2 h d'incubation, examiner les boîtes de CIN afin de rechercher la présence de colonies caractéristiques de *Y. enterocolitica*. Il convient d'effectuer cet examen à l'aide d'un stéréomicroscope (7.7) équipé d'un éclairage à fond noir ou de transillumination oblique (angle de 45°).

Sur la gélose CIN, les *Y. enterocolitica* pathogènes se présentent sous la forme de petites colonies (environ 1 mm ou moins) circulaires, lisses, au bord entier. Les colonies ont un petit centre à bord net rouge foncé («œil de bœuf»). Le pourtour est translucide ou transparent et, observé avec transillumination oblique, non iridescent et finement granulaire.

NOTE 1 L'éclairage à fond noir ou la transillumination oblique aide à distinguer les colonies caractéristiques de *Yersinia enterocolitica* de colonies très similaires d'autres espèces de *Yersinia*^[12] et de certaines espèces non *Yersinia*.

NOTE 2 En cas de croissance dense de la flore annexe sur les boîtes de CIN, la taille des colonies de *Y. enterocolitica* pathogènes peut être plus petite et le centre rouge typique peut être peu clair ou absent.

10.6 Confirmation

10.6.1 Généralités

L'emploi de souches de contrôle d'espèces de *Yersinia* est exigé en particulier pour aider à faire la distinction entre *Y. enterocolitica* pathogènes et les autres espèces de *Yersinia* sur gélose CIN. Des souches appropriées de contrôle positif et négatif doivent être utilisées pour chacun des essais de confirmation. Des exemples de souches de contrôle adaptées sont fournis dans les chapitres relatifs à ces essais. Une représentation schématique de la confirmation est donnée à la [Figure A.2](#).

10.6.2 Sélection des colonies en vue de la confirmation

Pour les essais de confirmation, sélectionner dans chaque boîte de chaque milieu sélectif (voir [10.3](#)) cinq colonies considérées comme typiques des *Y. enterocolitica* pathogènes si elles sont disponibles (voir [10.5](#)).

Ensemencer en stries les colonies sélectionnées sur la surface des boîtes de gélose CIN ([B.6](#)) de manière à permettre le développement de colonies bien séparées. Ensemencer en stries également les souches de contrôle de *Y. enterocolitica* de biosérototype 4/O:3, 2/O:9 et de biotype 1A et d'autres espèces de *Yersinia* afin de comparer la morphologie des colonies.

En outre, il est intéressant d'ensemencer en stries des colonies typiques pour confirmation et des souches de contrôle appropriées sur gélose chromogène, parallèlement à la préparation des boîtes de gélose CIN. Pour identifier les colonies caractéristiques sur gélose chromogène, suivre les instructions du fabricant concernant l'évaluation de la morphologie typique des colonies.

EXEMPLE Des souches de contrôle adaptées de *Y. enterocolitica* sont WDCM 00216 (biosérototype 4/O:3), WDCM 00215 (biosérototype 2/O:9) et WDCM 00160 (biosérototype 1B/O:8).

Inverser les boîtes ensemencées et les placer dans l'étuve ([7.2](#)) réglée à 30 °C pendant 24 h ± 2 h.

Examiner les boîtes incubées afin de rechercher les colonies caractéristiques (voir [10.5](#)) et d'évaluer la pureté de la culture. Il convient de réaliser cet examen à l'aide d'un stéréomicroscope ([7.7](#)). Comparer la morphologie des colonies suspectées à celles des colonies de souches de contrôle afin de mieux distinguer les colonies typiques des colonies atypiques. Jeter les boîtes ayant des colonies atypiques. Si des cultures mixtes avec colonies typiques sont présentes, repiquer des colonies typiques sur des boîtes de gélose CIN ([B.6](#)) et incubé comme ci-dessus.

Continuer avec une culture pure représentant les colonies typiques mères de la boîte primaire. Conserver les autres cultures pures typiques (jusqu'à cinq, si elles sont disponibles) pour confirmation si la première culture n'apporte aucune confirmation. Ensemencer en stries les colonies sélectionnées sur la surface d'une gélose non sélective (par exemple une gélose nutritive ([B.7](#)), une gélose au sang ou une gélose tryptone-soja) de manière à permettre le développement de colonies bien séparées.

Inverser les boîtes ensemencées et les placer dans l'étuve réglée à 30 °C ([7.2](#)) pendant 18 h à 24 h ou jusqu'à ce que la croissance soit satisfaisante.

Pour les essais de confirmation biochimique et de pathogénicité, utiliser uniquement des cultures pures.

NOTE 1 Il n'est pas nécessaire de procéder à la confirmation de toutes les étapes successives d'enrichissement si les *Y. enterocolitica* pathogènes de l'étape précédente ont été confirmées.

NOTE 2 Pour des raisons épidémiologiques ou pour les investigations réalisées lors d'une épidémie, la confirmation de colonies supplémentaires, par exemple cinq colonies typiques ou suspectes issues de chaque combinaison milieu d'enrichissement sélectif/milieu d'isolement, peut être bénéfique.

10.6.3 Détermination des espèces de *Yersinia* pathogènes

10.6.3.1 Recherche de l'uréase

Ensemencer en stries les bactéries sur la pente de la gélose (B.10). Ne pas visser hermétiquement les capuchons des tubes de manière à laisser l'air entrer et à assurer des conditions d'aérobie.

Incuber à 30 °C (7.2) pendant 24 h ± 2 h.

Une couleur rose violacé ou rouge rosé indique une réaction positive pour l'uréase.

EXEMPLE Une souche de contrôle positif adaptée est WDCM 00216 (*Y. enterocolitica*, biosérotype 4/O:3) ou WDCM 00160 (*Y. enterocolitica*, biosérotype 1B/O:8).

Une couleur jaune orangé indique une réaction négative pour l'uréase.

Conserver pour future confirmation toutes les colonies positives pour l'uréase ayant une morphologie de colonie typique.

NOTE 1 Les souches de *Y. enterocolitica* pathogènes ensemencées sur certains types de gélose à l'urée disponibles dans le commerce ont parfois besoin de plus de temps (jusqu'à 7 jours) pour le développement d'une réaction positive.

NOTE 2 Les souches pathogènes négatives pour l'uréase de *Y. enterocolitica* existent, mais elles sont extrêmement rares (0,01 %).

10.6.3.2 Hydrolyse de l'esculine

Ensemencer en stries des bactéries sur la pente de la gélose (B.12).

Incuber à 30 °C (7.2) pendant 24 h ± 2 h.

Une auréole noire autour des colonies indique une réaction positive.

EXEMPLE Une souche de contrôle négatif adaptée est WDCM 00216 (*Y. enterocolitica*, biosérotype 4/O:3) ou WDCM 000160 (*Y. enterocolitica*, biosérotype 1B/O:8) et une souche de contrôle positif est toute souche de *Y. enterocolitica* représentant le biotype 1A ou *Y. intermedia* WDCM 00217.

NOTE Cet essai de recherche de l'hydrolyse de l'esculine est équivalent à l'essai de recherche de la fermentation de la salicine dans la détermination de la pathogénicité.

10.6.3.3 Recherche du plasmide de virulence (pYV) par un essai sur gélose CR-MOX

La fixation du rouge Congo et la formation de colonies en tête d'épingle à 37 °C sont des caractéristiques typiques des *Y. enterocolitica* pathogènes. Le plasmide de virulence (pYV) détermine les caractères liés à la pathogénicité de *Yersinia*, et beaucoup d'entre eux, y compris la croissance dépendant du calcium, ne s'activent qu'à 37 °C.

Le plasmide de virulence (pYV) peut être perdu spontanément au laboratoire durant le stockage, la culture de longue durée et les passages répétés. Par conséquent, l'essai de recherche du plasmide de virulence (essai CR-MOX) doit être effectué à un stade précoce de la confirmation.