

METHODE CSD

METHODE DE DETECTION DES CRONOBACTERS

1 DOMAINE D'UTILISATION

La méthode CSD permet la détection rapide de *Cronobacter* spp. dans les produits de l'alimentation humaine (notamment les poudres de lait et ingrédients infantiles) et les produits d'environnement de production.

A l'issue d'une phase d'enrichissement avec du *Salmonella* Enrichissement + supplément CSD, un repiquage est réalisé sur une gélose CCI. Les colonies caractéristiques feront l'objet de confirmations.

La méthode CSD est certifiée NF VALIDATION, pour la recherche de *Cronobacter* spp., selon le protocole de validation NF EN ISO 16140-2 de 2016, pour les catégories suivantes :

- Poudres de lait infantiles, avec et sans probiotiques, ingrédients pour des prises d'essais de 0 à 50 g, avec une dilution au 1/10ème
- Poudres de lait infantiles, avec et sans probiotiques, ingrédients pour des prises d'essais de 50 à 375 g, avec une dilution au 1/4
- Echantillons de l'environnement de production



BKR 23/12 – 12/20
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE
POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification <http://nf-validation.afnor.org/>

Se référer au certificat disponible sur le site NF VALIDATION pour la date de fin de validité de la méthode. La méthode de référence utilisée pour la validation est la norme NF EN ISO 22964 : 2017

La gélose CCI est conforme à la formulation décrite dans la norme NF EN ISO 22964 : 2017.

Le **supplément CSD** permet l'**enrichissement commun** des **Salmonelles** et des **Cronobacter** dans les poudres de lait infantiles avec et sans probiotiques, ainsi que les ingrédients et les produits de l'environnement.

Pour la détection de *Salmonella* spp, se référer à la méthode IRIS *Salmonella*®, BKR 23/07-10/11, certifiée NF VALIDATION.

2 PRINCIPES

L'étape de dilution au 1/4 ou au 1/10ème du produit à analyser est réalisée conformément aux recommandations des normes NF EN ISO 6887, avec ajout systématique du supplément sélectif CSD. Suite à cet ajout, le bouillon d'enrichissement devient vert.

Le bouillon **d'enrichissement** est incubé à 41,5°C.

L'étape de détection est mise en œuvre par repiquage du bouillon sur **CCI Agar**.

L'éventuelle étape de confirmation peut être réalisée par les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées ou alternatives certifiées NF VALIDATION.

La non-détection de *Cronobacter* peut être déclarée dès 37 heures d'analyses pour les pesées allant jusqu'à 50 g et dès 39 heures pour les pesées allant jusqu'à 375 g.

3 FORMULES-TYPES

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Salmonella Enrichissement

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone	10,00 g
- Chlorure de sodium	5,00 g
- Tampon phosphates	5,06 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

Note : La formule de *Salmonella* Enrichissement est conforme à celle de l'eau peptonée tamponnée.

Salmonella Enrichissement + Tween® 80

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone	10,00 g
- Chlorure de sodium	5,00 g
- Tampon phosphates	5,06 g
- Tween® 80	10,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

Salmonella Enrichissement doublement tamponnée

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone	10,00 g
- Chlorure de sodium	5,00 g
- Tampon phosphates	10,12 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

Gélose CCI (Chromogenic Cronobacter Isolation Agar)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	7,0 g
- Extrait autolytique de levure	3,0 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Désoxycholate de sodium	0,25 g
- Citrate de fer ammoniacal	1,0 g
- Sodium thiosulfate	1,0 g
- 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl, α-D-glucopyranoside.....	0,15 g
- Agar agar bactériologique	14,2 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,3 ± 0,2.

4 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté *Salmonella* Enrichissement :

- Mettre en solution 20,0 g de milieu déshydraté (BK194) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement, jusqu'à dissolution complète.
- Répartir selon l'usage prévu en tubes ou flacons de façon à pouvoir réaliser la suspension mère au 1/10^{ème} ou au 1/4.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.

✓ **Reconstitution:**
20,0 g/L

✓ **Stérilisation:**
15 min à 121°C

Préparation du milieu déshydraté *Salmonella* Enrichissement doublement tamponné :

- Mettre en solution 25,1 g de milieu déshydraté (BK225) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement, jusqu'à dissolution complète.
- Répartir selon l'usage prévu en tubes ou flacons de façon à pouvoir réaliser la suspension mère au 1/10^{ème} ou au 1/4.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.

✓ **Reconstitution:**
25,1 g/L

✓ **Stérilisation:**
15 min à 121°C

Préparation du bouillon *Salmonella* Enrichissement à partir du bouillon 9x Concentré :

- Mélanger stérilement 1 volume du bouillon *Salmonella* Enrichissement 9x Concentré (BM233) à 8 volumes d'eau distillée ou déminéralisée stérile.

Préparation du milieu déshydraté CCI Agar :

- Mettre en suspension 31,6 g de milieu déshydraté (BK200) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante.
- Répartir en flacons et autoclaver 15 minutes à 121°C.
- Refroidir à 44-47°C et couler en boîtes de Petri.
- Laisser refroidir sur une surface plane.

✓ **Reconstitution:**
31,6 g/L

✓ **Stérilisation:**
15 min à 121°C

5 MODE D'EMPLOI

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
Se référer à la norme NF EN ISO 7218.

Protocole certifié NF VALIDATION pour les prises d'essai allant jusqu'à 50 g (poudres de lait infantiles, avec et sans probiotiques ; ingrédients) et les produits de l'environnement de production :

- Introduire aseptiquement (x) g de produit à analyser dans 9 (x) mL de *Salmonella* Enrichissement.
- Introduire le supplément CSD à raison de 0,1 mL de supplément liquide BS095 par gramme d'échantillon (soit 2,5 mL pour 25 g).
- Homogénéiser ou stomacher si besoin.
- Incuber le bouillon à 41,5 ± 1,0 °C pendant **16 à 22 heures**.
- Isoler 10 µL de l'enrichissement obtenu sur la gélose CCI Agar.
- Incuber à 41,5 ± 1 °C pendant 24 heures ± 3 heures.

✓ **Enrichissement :**
Au 1/10^{ème},
16-22 h à 41,5 °C

✓ **Détection :**
Isolement 10 µL,
24 h à 41,5 °C

Notes :

Il est également possible de suivre les exemples de la norme NF EN ISO 18593 (Cf. paragraphe 9.2).
Pour les prélèvements de surface après nettoyage, pouvant présenter des résidus de désinfectants, il est recommandé d'utiliser des écouvillons, éponges, chiffonnettes déjà imbibés de solution neutralisante ou d'utiliser un diluant contenant 10% de neutralisants universels et 90% de *Salmonella* Enrichissement, avant d'ajouter les suppléments CSD.

Protocole certifié NF VALIDATION pour les prises d'essai allant de 50 g à 375 g (poudres de lait infantiles, avec et sans probiotiques ; ingrédients) :

- Introduire aseptiquement (x) g de produit à analyser dans 3 (x) mL de *Salmonella* Enrichissement préchauffé.
- Introduire le supplément CSD (BS095) à raison de 0,1 mL par gramme d'échantillon (soit 37,5 mL pour 375 g).
- Homogénéiser ou stomacher si besoin.
- Incuber le bouillon à 41,5 ± 1,0 °C pendant **18 à 24 heures**.
- Isoler 10 µL de l'enrichissement obtenu sur la gélose CCI Agar.
- Incuber à 41,5 ± 1 °C pendant 24 heures ± 3 heures.

✓ **Enrichissement :**
Au 1/4,
18-24 h à 41,5 °C

✓ **Détection :**
Isolement 10 µL,
24 h à 41,5 °C

Notes concernant les protocoles certifiés NF VALIDATION

- La méthode est certifiée uniquement avec la gélose CCI proposée par Solabia sous différents conditionnements.
- Un comprimé CSD Qsp 10 g (BS09908) peut être ajouté au *Salmonella* Enrichissement pour les prises d'essais de 10 g.
- Un comprimé CSD Qsp 25 g (BS10008) peut être ajouté au *Salmonella* Enrichissement pour les prises d'essais de 25 g.
- Plusieurs comprimés peuvent être ajoutés au bouillon en adéquation avec la prise d'essai (3 comprimés BS10008 pour une prise d'essai de 75 g par exemple)
- Se référer aux différentes parties de la norme NF EN ISO 6887 :
 - Utiliser le *Salmonella* Enrichissement avec Tween pour la suspension mère et l'enrichissement des matrices à plus de 20 % de matières grasses
 - Utiliser le *Salmonella* Enrichissement doublement tamponné ou le *Salmonella* Enrichissement pour les matrices acides et acidifiantes, ou les laits avec probiotiques
 - Ajouter 0,1 g/L d' α amylase pour les céréales infantiles
- Le bouillon d'enrichissement, après incubation, peut être conservé jusqu'à 3 jours à 2-8°C avant repiquage sur CCI Agar.
- La gélose CCI, après incubation, peut être conservée jusqu'à 48 heures à 2-8°C avant lecture et confirmations éventuelles.

6 LECTURES

L'aspect des colonies sur la gélose CCI est le suivant :

Microorganismes	Caractéristiques des colonies
<i>Cronobacter</i> spp.	Colonies bleues à bleu-vert, de 1 à 3 mm
<i>Escherichia coli</i>	Colonies blanches, blanches à centre verdâtre
<i>Salmonella</i> spp, <i>Proteus</i>	Colonies à centre noir
Bactéries à Gram positif	Croissance inhibée

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

7 CONFIRMATIONS

Tous les résultats présumés positifs doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

Méthodes normalisées ou validées ISO 16140-6

La formulation de la gélose CCI étant conforme à la formule décrite dans la norme ISO 22964, les méthodes suivantes peuvent être utilisées :

- Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), en repartant d'une colonie bleue à bleu-vert isolée sur CCI Agar.
- Mise en œuvre de méthodes certifiées selon l'ISO 16140-6 en repartant des colonies caractéristiques isolées sur CCI

Méthodes certifiées NF VALIDATION

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les résultats positifs doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- Option 1 : Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), en repartant d'une colonie bleue à bleu-vert isolée sur CCI Agar.
- Option 2 : Mise en œuvre d'une galerie biochimique à partir d'une colonie isolée.

- Option 3 : Utilisation de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION, de principe différent. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes. Les deux méthodes validées (l'une utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronc commun.

NOTE :

En cas de résultats discordants (positifs par la méthode alternative, non confirmés par l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu. Il est possible, par exemple, de procéder à des tests biochimiques ou encore d'utiliser des sondes nucléiques tels que décrit dans la norme NF EN ISO 7218.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu préparé : Gélose ambrée, transparente

Réponse culturale après 24 heures d'incubation à 41,5 °C (NF EN ISO 22964) :

Microorganismes		Croissance	Caractéristiques
<i>Cronobacter sakazakii</i>	WDCM 00214	Bonne, score 2	Colonies bleu-vert
<i>Cronobacter muytjensii</i>	WDCM 00213	Bonne, score 2	Colonies bleu-vert
<i>Enterobacter cloacae</i>	WDCM 00083	Bonne, score 1-2	Colonies blanches
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	Inhibée, score 0	-

9 CONSERVATION

Salmonella Enrichissement, Salmonella enrichissement doublement tamponné :

Milieux déshydratés : 2-30 °C.

Milieux prêts-à-l'emploi en flacons ou en poches : 2-25 °C.

Salmonella Enrichissement avec Tween® :

Milieux prêts-à-l'emploi en flacons ou en poches : 2-25 °C.

Salmonella Enrichissement 9X Concentré :

Milieu en poches : 15-30 °C.

Suppléments et comprimés CSD : 2-8 °C.

Milieu CCI :

Milieu déshydraté : 2-30 °C

Milieu précoulé en boîtes de Petri : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Salmonella Enrichissement avec ou sans Tween®, Salmonella Enrichissement doublement tamponné préparés en flacons ou en tubes (*) : 180 jours à 2-25 °C.

Milieu CCI préparé en boîtes (*) : 1 mois à 2-8°C

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Salmonella Enrichissement :

Flacon de 500 g.....	BK194HA
Seau de 5 kg.....	BK194GC
10 flacons de 225 mL.....	BM13608
3 poches souples de 3 litres.....	BM13708
2 poches souples de 5 litres.....	BM14408
40 poches souples de 5 litres	BM23708

Salmonella Enrichissement + Tween® 80 (10 g/L):

Carton de 3 poches souples de 3 L	BM16308
Carton de 2 poches souples de 5 L	BM19808
Pack de 10 flacons de 225 mL	BM22808

Salmonella Enrichissement doublement tamponnée:

Flacon de 500 g	BK225HA
Seau de 5 kg	BK225GC
Carton de 2 poches souples de 5 L	BM20008
Pack de 10 flacons de 225 mL	BM20108

Salmonella Enrichissement 9X Concentré :

Carton de 4 poches souples de 2,5 L	BM23308
---	---------

Salmonella Enrichissement doublement tamponnée avec Tween:

Carton de 2 poches souples de 5 L	BM22008
---	---------

Gélose CCI:

Flacon de 500 g	BK200HA
Coffret de 20 boîtes (90 mm)	BM15408
Coffret de 120 boîtes (90 mm)	BM22608

Supplément CSD:

10 flacons de 100 mL	BS09508
120 Comprimés Qsp 10 g	BS09908
120 Comprimés Qsp 25 g	BS10008

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

NF EN ISO 16140-2. Septembre 2016. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence - Microbiologie des aliments

ISO 16140-6 : 2019. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 6 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) pour la confirmation microbiologique et le typage.

NF EN ISO 6887. Microbiologie de la chaîne alimentaire. Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique. Parties 1 à 6.

NF EN ISO 7218. Juillet 2024. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Exigences générales et recommandations pour les examens microbiologiques.

NF EN ISO 18593. Juillet 2018. Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons.

NF EN ISO 22964. Juin 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire. Méthode horizontale pour la recherche de *Cronobacter* spp.

12 AUTRES INFORMATIONS

Code document :	METHODE CSD_v5(fr)
Date création :	04-2020
Date modification :	09-2024
Objet des modifications :	Reconduction, ajout et suppression de références

CHROMOGENIC CRONOBACTER ISOLEMENT AGAR (CCI Agar)

Détection des *Cronobacter*

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 41,5 °C.

***Cronobacter* spp.**

Couleur caractéristique
bleue à bleu-vert

