

BOUILLON FRASER-DEMI

ENRICHISSEMENT SELECTIF PRIMAIRE POUR *LISTERIA*

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon de Fraser-demi est utilisé pour l'enrichissement sélectif et différentiel (bouillon d'enrichissement primaire) de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp dans les produits alimentaires, selon la norme NF EN ISO 11290-1. Le milieu est également utilisé dans les méthodes alternatives rapides de détection et de dénombrement des *Listeria monocytogenes* ou *Listeria* spp.

2 HISTORIQUE

Le milieu, étudié par Fraser *et al.* en 1988, est une modification de la formulation de Donnelly et Baigent. La composition de base, identique à celle du bouillon UVM, a été modifiée par adjonction de chlorure de lithium comme agent sélectif et de citrate ferrique ammoniacal afin de visualiser les cultures qui, hydrolysant l'esculine, se manifestent par l'apparition d'un noircissement dans le milieu.

3 PRINCIPES

La seule différence de concentration en acide nalidixique et en acriflavine des bouillons de Fraser-demi et de Fraser ainsi que les deux étapes d'enrichissement, permettent une récupération très satisfaisante de *Listeria monocytogenes*. Le bouillon de Fraser-demi permet de réaliser l'étape d'enrichissement primaire, l'étape d'enrichissement secondaire s'effectuant avec le bouillon de Fraser.

La polypeptone, l'extrait de levure et l'extrait de viande apportent les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des *Listeria*. La forte teneur en chlorure de sodium permet d'accroître la sélectivité du milieu. Les phosphates agissent comme substances tampons pour le maintien du pH. L'esculine est hydrolysée par les *Listeria* en glucose et en esculetine. Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques qui, apportés extemporanément par le citrate de fer, favorisent également la croissance des *Listeria*. Le chlorure de lithium inhibe la plupart des entérocoques susceptibles d'hydrolyser l'esculine. L'acide nalidixique bloque la réplication de l'ADN des microorganismes sensibles à cet antibactérien. L'acriflavine supprime la croissance de la microflore secondaire à Gram positif.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu de Fraser-demi complet:

- Digestat enzymatique de tissus animaux	5,00 g
- Digestat enzymatique de caséine	5,00 g
- Extrait autolytique de levure	5,00 g
- Extrait de viande	5,00 g
- Chlorure de sodium	20,00 g
- Phosphate disodique anhydre*	9,60 g
- Phosphate monopotassique	1,35 g
- Esculine	1,00 g
- Chlorure de lithium.....	3,00 g
- Acide nalidixique	10,0 mg
- Acriflavine chlorhydrate.....	12,5 mg
- Citrate de fer III ammoniacal.....	0,50 g

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

Pour 1 litre de Fraser-demi +Tween® 80, ajout à la formule de Fraser-demi complet :

- Tween® 80.....	10,0 g
------------------	--------

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

Pour 55 g de base déshydratée BK133

- Digestat enzymatique de tissus animaux.....	5,0 g
- Digestat enzymatique de caséine.....	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,00 g
- Extrait de viande.....	5,00 g
- Chlorure de sodium.....	20,00 g
- Phosphate disodique anhydre*.....	9,60 g
- Phosphate monopotassique.....	1,35 g
- Esculine.....	1,00 g
- Chlorure de lithium.....	3,00 g

Pour un flacon de supplément BS030

- Acide nalidixique.....	5,00 mg
- Acriflavine (chlorhydrate).....	6,25 mg
- Citrate de fer (III) ammoniacal.....	0,25 g

Pour un flacon de supplément BS032

- Acide nalidixique.....	22,5 mg
- Acriflavine (chlorhydrate).....	28,125 mg
- Citrate de fer (III) ammoniacal.....	1,125 g

Pour 55 g de base déshydratée BK173

- Digestat enzymatique de tissus animaux.....	5,0 g
- Digestat enzymatique de caséine.....	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,00 g
- Extrait de viande.....	5,00 g
- Chlorure de sodium.....	20,00 g
- Phosphate disodique anhydre*.....	9,60 g
- Phosphate monopotassique.....	1,35 g
- Esculine.....	1,00 g
- Chlorure de lithium.....	3,00 g
- Acide nalidixique.....	10,0 mg
- Acriflavine chlorhydrate.....	12,5 mg

Pour un flacon de supplément liquide BS059
(90 mL)

- Citrate de fer (III) ammoniacal.....	4,50 g
--	--------

Pour un tube de supplément liquide BS062
(10 mL)

- Citrate de fer (III) ammoniacal.....	0,5 g
--	-------

* NOTE : Equivalent à 12 g d'hydrogénophosphate disodique dihydraté.

5 PREPARATION

- Mettre en solution 55,0 g de milieu déshydraté de Fraser (BK133, BK173 ou BK215) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en flacons, à raison de 225 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.

✓ **Reconstitution :**
55,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

NOTE

Stériliser à 110°C pendant 15 min pour BK215.

Utilisation du milieu de base BK133

- Reconstituer le supplément lyophilisé sélectif pour Fraser-demi qsp 500 mL (BS030) avec 5 mL d'une solution 1:1 éthanol / eau distillée stérile ou le supplément Qsp 2,25 L (BS032) avec 20 mL de la même solution.
- Agiter le flacon plusieurs fois de façon à assurer une complète dissolution, tout en évitant la formation de mousse.
- Ajouter 2,25 mL de supplément reconstitué BS030 ou 2 mL de supplément reconstitué BS032 dans chaque flacon de 225 mL de bouillon.
- Homogénéiser parfaitement.

Utilisation du milieu de base BK173

- Ajouter stérilement dans chaque flacon de 225 mL de bouillon 2,25 mL d'une solution stérile de citrate ferrique ammoniacal à 5 % (BS059 ou BS062).
- Homogénéiser parfaitement.

6 MODE D'EMPLOI

- A partir des flacons ainsi préparés ou des milieux complets prêts-à-l'emploi en flacons ou en poches (BM016, BM133, BM134, BM212), introduire aseptiquement 25 g de produit à analyser.
- Homogénéiser parfaitement.
- Incuber à 30 ± 1 °C pendant 24 à 26 heures.

✓ **Ensemencement :**
25 g dans 225 mL

✓ **Incubation :**
24 à 26 h à 30 °C

NOTE

Le bouillon Fraser-demi peut être aussi utilisé comme diluant dans le cadre du dénombrement de *Listeria monocytogenes* (NF VALIDATION, BKR 23/05-12/07).

7 LECTURE

Les tubes, présentant ou ne présentant pas de noircissement, doivent obligatoirement être repiqués sur les milieux d'enrichissement secondaire ou d'isolement sélectifs. Une durée minimale de 24 heures est nécessaire pour permettre la visualisation de la coloration noire.

Repiquer 0,1 mL de chaque tube dans un bouillon de Fraser pour les méthodes normalisées.

Repiquer sur COMPASS Listeria Agar pour la détection rapide de *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp (NF VALIDATION, BKR 23/02-11/02).

NOTE :

Pour d'autres applications, utiliser le référentiel en vigueur.

8 CONTROLE QUALITE

Milieux déshydratés : poudre jaunâtre, fluide et homogène.

Suppléments lyophilisés sélectifs : lyophilisats bruns, donnant après reconstitution une solution brune, pouvant présenter un précipité.

Supplément Citrate de fer 5% : liquide brun, pouvant présenter un précipité.

Milieux préparés (complet) : solution brunâtre à reflets bleutés, pouvant présenter un léger précipité.

Réponse culturale après 24 heures d'incubation à 30 °C, puis subcultures sur COMPASS® Listeria Agar (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	WDCM 00021	> 10 colonies caractéristiques
+ <i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	
+ <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	WDCM 00109	> 10 colonies caractéristiques
+ <i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	
+ <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	< 100 colonies Inhibée
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	

9 CONSERVATION

Milieux de base déshydratés : 2-30 °C.

Suppléments sélectifs pour bouillon de Fraser-demi : 2-8 °C.

Solution stérile de citrate ferrique ammoniacal à 5 % : 2-25 °C.

Milieux complets prêts-à-l'emploi en flacons ou en poches : à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

NOTE:

Les milieux complets prêt-à-l'emploi en flacons ou en poches peuvent se conserver 2 mois entre 15 et 25 °C, à l'abri de la lumière, sans impact sur les performances microbiologiques.

Milieu de base préparé en flacons BK133 (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Milieu de base préparé en flacons BK173 (*) : 180 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Milieu complet préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Suppléments lyophilisés réhydratés (*) : 30 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

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

10 PRESENTATION

Milieux déshydratés de Fraser base II :

Flacon de 500 g.....BK133HA
Seau de 5 kg.....BK133GC

Suppléments sélectifs pour bouillon de Fraser-demi :

Coffret de 10 flacons qsp 500 mLBS03008
Coffret de 8 flacons qsp 2,25 LBS03208

Milieux déshydratés de Fraser-demi base (sans citrate de fer III ammoniacal) :

Flacon de 500 g.....BK173HA
Seau de 5 kg.....BK173GC

Solutions stériles de citrate ferrique ammoniacal à 5 % :

Coffret de 10 flacons de 90 mLBS05908
Sachet de 7 tubes de 10 mLBS06208

Milieux déshydratés Fraser-demi complet :

Flacon de 500 g.....BK215HA
Seau de 5 kg.....BK215GC

Milieu prêt-à-l'emploi Fraser-demi en flacons :

Pack de 10 flacons de 225 mLBM01608

Milieux prêts-à-l'emploi Fraser-demi en poches souples :

Carton de 3 poches souples de 3 L.....BM13308
Carton de 2 poches souples de 5 L.....BM13408
Caisse de 40 poches de 5 L.....BM18808

Milieu prêt-à-l'emploi Fraser-demi + Tween® 80 (10 g/L) en poches souples :

Carton de 3 poches souples de 3 L.....BM21208

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Donnelly, C.W., and Baigent, G.J.. 1986. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. Applied and Environmental Microbiology, **52** : 689-695.

Fraser, J.A., and Sperber, W.H.. 1988. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. Journal of Food Protection, **51** : 762-765.

NF EN ISO 11133. Juillet 2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture (Tirage 2 (2016-01-01)).

NF EN ISO 11133-A1. Mars 2018. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture - Amendement 1.

NF EN ISO 11133-A2. Mai 2020. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture - Amendement 2.

NF EN ISO 11290-1. Juillet 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp. - Partie 1 : méthode de recherche.

NF EN ISO 11290-2. Juillet 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp. - Partie 1 : méthode de dénombrement.

NF EN ISO 6887-1. Juin 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.

NF EN ISO 6887-4. Juin 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 4 : règles spécifiques pour la préparation de produits variés.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : FRASER DEMI_v19(fr)
Date création : 04-2003
Date de révision : 11-2023
Motif de révision : Ajout des nouvelles référence, modification de la bibliographie