
CHROMOGENIC CRONOBACTER ISOLEMENT AGAR

DETECTION DE *CRONOBACTER*

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le milieu Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar est utilisé pour la recherche de *Cronobacter* spp. dans les produits et ingrédients destinés à la consommation humaine et animale, ainsi que les échantillons de l'environnement de production.

La gélose CCI est utilisée notamment pour la recherche de *Cronobacter sakazakii* dans les poudres de lait, les produits déshydratés et leurs matières premières, pour l'alimentation infantile.

La formule-type de la gélose répond à la composition du milieu Chromogenic *Cronobacter* Isolation Agar, définie dans la norme NF EN ISO 22964.

2 HISTORIQUE

Cronobacter sakazakii (anciennement *Enterobacter sakazakii*) est un bacille à Gram négatif, mobile, non sporulé, anaérobie facultatif, qui forme des colonies pigmentées en jaune après 48-72 h d'incubation sur gélose non sélective. Pathogène opportuniste, il est notamment à l'origine de méningites et d'entérites, particulièrement chez les nouveau-nés et les jeunes enfants, à la fréquence relativement faible de 1 pour 100000, mais avec un taux de mortalité élevé compris entre 20 et 50%. Bien que des souches aient été isolées dans différents produits alimentaires, seuls les produits destinés à l'alimentation infantile ont été impliqués dans des épisodes infectieux.

Des études ont montré que 100% des *Cronobacter sakazakii* étaient positifs pour l' α -glucosidase alors que 100% des autres espèces d'*Enterobacter* étaient négatives pour cette enzyme. Sur la base de ces observations, le substrat chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucoopyranoside (X- α -glucoside) a été proposé pour différencier cette souche des autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*.

3 PRINCIPES

La Tryptone stimule la croissance des *Cronobacter*.

L'extrait de levure est une source du complexe vitaminique B.

Le chlorure de sodium maintient la pression osmotique.

Le désoxycholate de sodium permet d'inhiber la croissance de la flore gram positif.

L'enzyme α -glucosidase hydrolyse le X- α -glucoside et libère l'aglycone 5 bromo-4-chloro-indolol. En présence d'oxygène, cet aglycone est dimérisé et forme le pigment bromo-chloro-indigo.

L'association du citrate de fer et du thiosulfate de sodium permet de différencier les entérobactéries H₂S positives des *Cronobacter*.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	7,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	3,00 g
- Chlorure de sodium.....	5,00 g
- Désoxycholate de sodium.....	0,25 g
- Citrate de fer ammoniacal.....	1,00 g
- Sodium thiosulfate.....	1,00 g
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl, α -D-glucopyranoside	0,15 g
- Agar agar bactériologique.....	14,2 g

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

5 MODE D'EMPLOI

Protocole de détection de *Cronobacter* selon la norme ISO 22964 :

- Introduire aseptiquement 10 g ou 10 mL de produit à analyser dans 90 mL d'eau peptonée tamponnée.
- Homogénéiser ou stomacher si besoin.
- Incuber le bouillon à 36 \pm 2 °C pendant **18 \pm 2 heures**.
- Repiquer 0,1 mL du pré-enrichissement dans 10 mL de bouillon de screening pour *Cronobacter* (BM155).
- Incuber à 41,5 \pm 1,0 °C pendant 24 \pm 2 heures.
- A la surface de la gélose chromogène pour *Cronobacter* (BM154) ramené préalablement à température ambiante, ensemercer en stries 10 μ L du milieu d'enrichissement.
- Incuber à 41,5 \pm 1,0 °C pendant 24 \pm 2 heures.

✓ **Pré-enrichissement :**
Au 1/10^{ème},
18 h à 36 °C

✓ **Enrichissement :**
0,1 mL
24 h à 41,5 °C

✓ **Détection :**
10 μ L en surface,
24 h à 41,5 °C

Notes :

Pour des prises d'essais plus importantes, préchauffer l'eau peptonée tamponnée à 36 \pm 2 °C.

Le regroupement des prises d'essais peut compromettre la récupération de souches de *Cronobacter* stressées, en présence d'une microflore importante. L'utilisateur doit alors démontrer la conformité de son mode opératoire.

6 LECTURE

L'aspect des colonies 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

Procéder aux tests de confirmation décrits dans la norme.

7 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	-

8 CONSERVATION

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

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

9 PRESENTATION

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 90 mm) :

Coffret de 20 boîtes BM15408

10 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Muytjens, H.L., van der ROS, van de Repe, J., and van Druten, H.A.. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha-glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *Journal of Clinical Microbiology*, 20 : 684-686.

Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L., and Ferguson, J.. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 10 : 398-401.

Iversen, C., Drugan, P., and Forsythe, S.. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 96 : 133-139.

Lehner, A., and Stephan, R.. 2004. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection*, 67(12) : 2850-2857.

Guillaume-Gentil, O., Sannard, V., Kandhai, M.C., Marugg, J.D., and Joosten, H.. 2005. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *Journal of Food Protection*, 68(1) : 64-69.

Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., and Beuchat, L.R.. 2005. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104 : 1-34.

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

11 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 : CCI AGAR_FR_V4.

Date création : 03-2016

Date de révision : 12-2018

Motif de révision : Mise à jour Mode d'emploi