
GELOSE PALCAM

DETECTION DES *LISTERIA*

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose PALCAM est un milieu sélectif utilisé pour la différenciation et l'isolement de *Listeria monocytogenes* et des autres *Listeria* dans les produits alimentaires tels que le lait et les fromages, ainsi que dans les autres denrées alimentaires même fortement contaminées.

Le milieu peut être utilisé comme second milieu au choix dans le cadre de la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* en microbiologie des aliments (NF EN ISO 11290-1).

La gélose PALCAM peut également être utilisée comme test de confirmation de *Listeria* spp dans la méthode COMPASS *Listeria*.

2 HISTORIQUE

Le milieu a été formulé par van Netten *et al.* en 1989, dans la perspective de pallier l'insuffisance de sélectivité des milieux antérieurement utilisés pour la recherche et le dénombrement des *Listeria*. Les études ont été fondées sur les travaux de Rodriguez (1984) qui le premier a utilisé l'esculine et les sels ferriques afin de visualiser *Listeria monocytogenes* par son caractère esculinase-positif. Cependant, beaucoup des milieux sélectifs pour *Listeria* qui contenaient de l'esculine laissaient également cultiver quelques souches de streptocoques du groupe D, si bien que l'utilisation d'esculine s'est révélée être d'un intérêt limité. S'appuyant sur les travaux de Rocourt (1987), van Netten a complété le milieu en utilisant du D-mannitol afin de différencier les entérocoques (mannitol-positif) des *Listeria* (mannitol-négatif). En se basant sur ces deux principes et employant la méthode écométrique d'évaluation, les auteurs ont démontré que l'action conjuguée de la ceftazidime et du chlorure de lithium était plus efficace que celle réalisée par l'emploi de 2-phényléthanol sur le plan de la sélectivité. La gélose PALCAM représente un bon compromis entre le milieu ALPAMY (van Netten *et al.*, 1988 b) et le milieu Oxford (Curtis *et al.*, 1989). Les auteurs ont montré que parmi les 13 milieux sélectifs testés, la gélose PALCAM donnait des résultats satisfaisants en produisant des colonies bien typiques de *Listeria*, tout en inhibant la presque totalité des bactéries contaminantes.

3 PRINCIPES

Les peptones et l'extrait de levure favorisent une excellente croissance des *Listeria*.

Le glucose et l'amidon représentent les sources énergétiques de la croissance bactérienne.

Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique.

Les *Listeria* hydrolysent l'esculine en glucose et en esculetine. L'esculetine produite forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.

La microflore secondaire est inhibée par l'association entre le chlorure de lithium, la ceftazidime, la polymyxine et l'acriflavine (colorant antiseptique).

La fermentation du mannitol par les germes contaminants qui pourraient cultiver est mise en évidence par le virage au jaune du rouge de phénol, permettant ainsi d'orienter le diagnostic.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.
Pour 1 litre de milieu complet :

- Peptones	23,00 g
- Extrait autolytique de levure	3,00 g
- Glucose	0,50 g
- Amidon.	1,00 g
- D-mannitol.....	10,00 g
- Esculine.	0,80 g
- Citrate ferrique ammoniacal.	0,50 g
- Chlorure de sodium	5,00 g
- Chlorure de lithium.....	15,00 g
- Polymyxine B sulfate	10,0 mg
- Ceftriaxone.....	20,0 mg
- Acriflavine.....	5,0 mg
- Rouge de phénol	0,08 g
- Agar agar bactériologique	10,00 g

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

Pour 68,9 g de base déshydratée BK145

- Peptones.	23,00 g
- Extrait autolytique de levure	3,00 g
- Glucose	0,50 g
- Amidon	1,00 g
- D-mannitol	10,00 g
- Esculine	0,80 g
- Citrate ferrique ammoniacal	0,50 g
- Chlorure de sodium	5,00 g
- Chlorure de lithium	15,00 g
- Rouge de phénol	0,08 g
- Agar agar bactériologique	10,00 g

Pour un flacon de supplément BS004 Qsp 500 mL

- Polymyxine B (sulfate)	5,0 mg
- Ceftriaxone	10,0 mg
- Acriflavine	2,5 mg

Pour un flacon de supplément BS049 Qsp 2,5 L

- Polymyxine B (sulfate)	25,0 mg
- Ceftriaxone	50,0 mg
- Acriflavine	12,5 mg

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 68,9 g de milieu de base déshydraté (BK145) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en flacons, à raison de 100 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

- Réhydrater le supplément avec :
 - 5 mL d'eau stérile pour le supplément Qsp 500 mL (BS004)
 - 25 mL d'eau stérile pour le supplément Qsp 2.5 L (BS049)
- Agiter ou vortexer le flacon de supplément de façon à assurer une complète dissolution, tout en évitant la formation de mousse.

- Ajouter stérilement 1 mL de supplément par volume de 100 mL de base.
- Homogénéiser parfaitement.
- Couler en boîtes de Petri stériles.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes, couvercle entrouvert.

✓ **Reconstitution :**
68,9 g/L

✓ **Stérilisation:**
15 min à 121°C

✓ **Réhydratation supplément**
5 mL eau stérile (BS004)
25 mL eau stérile (BS049)

✓ **Ajout base :**
1 mL / 100 mL

6 MODE D'EMPLOI

- Effectuer un isolement sur les boîtes ainsi préparées ou le milieu pré-coulé (BM020) au moyen d'une anse bouclée, à partir d'un bouillon d'enrichissement sélectif.
- Incuber à 30, 35 ou 37 ± 1 °C.
- Examiner les boîtes après 24 h et, si nécessaire, après 48 h, pour détecter la présence de colonies caractéristiques présumées être des *L. monocytogenes*.

✓ **Ensemencement**
1 anse

✓ **Incubation**
24 à 48 h à 30, 35 ou 37°C

7 LECTURE

Après 24 ou 48 heures d'incubation, les *Listeria* forment des colonies vert-olive à centre concave typique, entourées d'un halo noir. Lorsque les colonies sont confluentes, le milieu de culture prend une couleur brun noir.

La gélose PALCAM est très sélective, cependant il est parfois possible d'observer des cultures de staphylocoques ou d'entérocoques. Ces microorganismes contaminants fermentent le mannitol en produisant des colonies jaunes (avec une auréole jaune), se différenciant ainsi aisément des colonies de *Listeria*.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu de base déshydraté : poudre de couleur crème à rosée, fluide et homogène.

Aspect du lyophilisat : jaune, donnant après reconstitution une solution jaune, limpide.

Milieu préparé (complet) : gélose rouge.

Réponse culturale typique après 48 heures d'incubation à 37 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)
<i>Listeria monocytogenes</i>	WDCM 00021	$P_R \geq 50\%$, colonies caractéristiques
<i>Listeria monocytogenes</i>	WDCM 00109	$P_R \geq 50\%$, colonies caractéristiques
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée, score 0
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Inhibée, score 0

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

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

Suppléments sélectifs pour gélose PALCAM : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

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

Milieu complet préparé en boîtes, avec supplément (*) : 30 jours à 2-8 °C.

Supplément réhydraté (*) : 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

Milieu de base déshydraté :

Flacon de 500 g BK145HA

Supplément sélectif pour gélose PALCAM :

10 flacons qsp 500 mL BS00408

8 flacons qsp 2,5 L BS04908

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

20 boîtes BM02008

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- van Netten, P., van de Ven, A., Perales, I., and Mossel D.A.A. 1988. A selective and diagnostic medium for use in the enumeration of *Listeria* spp. in foods. *Int. Jour. of Food Microb.*, 6: 187-198.
- van Netten, P., Perales, I., and Mossel, D.A.A. 1988. An improved selective and diagnostic medium for isolation and counting of *Listeria* spp. in heavily contaminated foods. *Letters in Applied Microbiology*, 7: 17-21.
- van Netten, P., Perales, I., van de Moosdijk., Curtis G.D.W., and Mossel D.A.A. 1989. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 8: 299-316.
- Bind, J.L. 1991. Mise en évidence et dénombrement des *Listeria* à partir de produits laitiers. *Lait*, 71: 99-105.
- Journal Officiel du 7 Avril 1992. Contrôle microbiologique des produits végétaux ou d'origine végétale, 5144. (arrêté du 13 mars 1992).
- 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 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.

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 : GELOSE PALCAM_FR_V12.
Date création : 06-2003
Date de révision : 07-2022
Motif de révision : Modification d'une souche dans le paragraphe contrôle qualité.

Gélose PALCAM

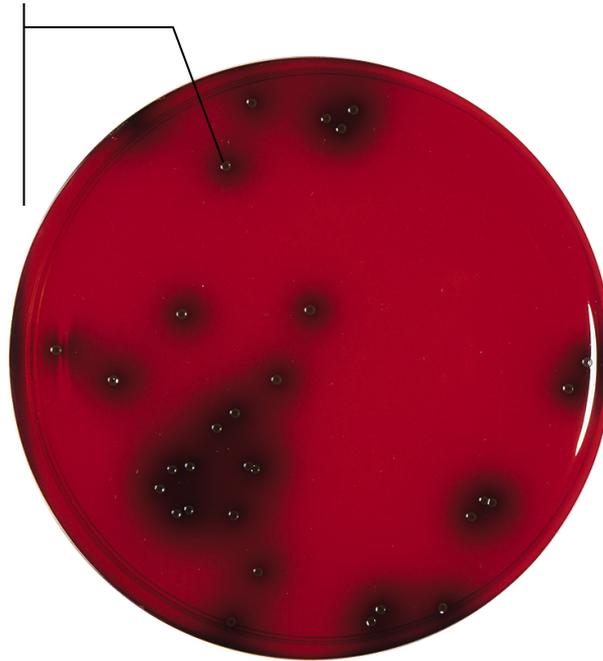
Détection des *Listeria*.

Lecture :

Croissance obtenue par ensemencement en surface après 48 heures d'incubation à 37 °C.

***Listeria monocytogenes* et
autres *Listeria* spp.**

Colonie caractéristique :
De couleur vert-olive avec un
centre concave typique,
entourée d'un halo noir



Croissance obtenue par ensemencement par piqûre après 24 heures d'incubation à 37 °C.

***Listeria monocytogenes* et
autres *Listeria* spp.**

Présence d'un halo noir

