

**MINISTÈRE DE LA SANTÉ  
ET DE LA PROTECTION SOCIALE**

**ARRÊTÉ INTERMINISTÉRIEL n° 196 MSPS./MINAGRA/MIC.**  
du 3 août 1993 relatif aux méthodes de prélèvement et de contrôle bactériologique des glaces et crèmes glacées.

LE MINISTRE DE LA SANTÉ ET DE LA PROTECTION SOCIALE ;  
LE MINISTRE DE L'AGRICULTURE ET DES RESSOURCES ANIMALES ;  
LE MINISTRE DE L'INDUSTRIE ET DU COMMERCE,

Vu la loi n° 63-301 du 26 juin 1963 relative à la répression des fraudes dans la vente des marchandises et des falsifications des denrées alimentaires et produits agricoles ;

Vu le décret n° 83-808 du 3 août 1983 portant application de la loi n° 63-301 du 26 juin 1963 relative à la répression des fraudes en ce qui concerne la fabrication et la commercialisation des produits laitiers ;

Vu le décret n° 91-755 du 14 novembre 1991 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret n° 91-806 du 11 décembre 1991 portant attributions des membres du Gouvernement ;

Vu l'arrêté n° 250 du 18 novembre 1988 fixant les normes à respecter pour la confection de certaines denrées alimentaires et de boissons non alcoolisées,

**ARRÊTENT :**

Article premier. — Les laboratoires officiels des ministères chargés de la Santé, des Ressources animales et du Commerce, ainsi que les laboratoires agréés pour le contrôle des laits et produits laitiers sont tenus d'employer, en application de l'article 71 du décret n° 83-808 du 3 août 1983, les méthodes décrites en annexe pour le prélèvement et le contrôle bactériologique des glaces et crèmes glacées.

Art. 2. — Les critères microbiologiques des glaces et crèmes glacées tels que fixés à l'article 3 de l'arrêté n° 250 du 18 novembre 1988 sont modifiés comme suit :

— Microorganismes aérobies à 30°C/g .....	3 à 10 <sup>5</sup>
— Coliformes à 30°C/g .....	10 <sup>2</sup>
— Coliformes fécaux à 44°C/g .....	1
— Staphylococcus aureus/g .....	10
— Salmonella dans 25 grammes .....	absence

La détermination de ces critères est effectuée conformément aux dispositions de l'annexe du présent arrêté.

Art. 3. — Le directeur général de la Santé et de la Protection sociale, le directeur général des Ressources animales et le directeur de la Répression des Fraudes et du Contrôle de la Qualité sont chargés de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au *Journal officiel* de la République de Côte d'Ivoire.

Abidjan, le 3 août 1993.

*Le ministre de la Santé  
et de la Protection sociale,*  
Professeur Alain EKRA.

*Le ministre de l'Agriculture  
et des Ressources animales,*  
M. Lambert KOUASSI KONAN.

*Le ministre de l'Industrie et du Commerce,*  
M. Ferdinand KACOU ANGORA.

**ANNEXE**

à l'arrêté interministériel n° 196 MSPS./MINAGRA/MIC. du  
3 août 1993 relatif aux méthodes de prélèvement et de contrôle  
bactériologique des glaces et crèmes glacées.

**I. — PRELEVEMENT DES GLACES ET CREMES GLACEES**

**A. — MATERIEL A UTILISER**

- Récipients neutres, stérilisables ou à usage unique ;
- Cuillères à long manche, spatules, sondes à usage unique ou stérilisables ;
- Pour le transport, les récipients contenant les échantillons doivent être placés dans une boîte isotherme équipée de façon à maintenir les produits congelés jusqu'à l'arrivée au laboratoire.

**B. — TECHNIQUES DE PRELEVEMENT**

1° Le laboratoire doit disposer pour conduire les analyses complètes d'environ 500 grammes de produit, soit cinq fois 100 grammes. Ces 100 grammes peuvent être fournis par une ou plusieurs pièces ;

2° Les prélèvements doivent être faits selon les techniques suivantes en respectant les précautions d'usage en bactériologie :

— Les glaces et crèmes glacées conditionnées en emballage individuel doivent être prélevées et transmises au laboratoire dans leur emballage d'origine en conservant le régime de congélation jusqu'au moment de l'analyse ;

— Pour les glaces et crèmes glacées servies à la cuillère ou vendues au moyen d'appareil distributeur, prélever l'échantillon dans les conditions de vente et sous la forme habituelle de présentation du produit au consommateur ;

— Pour les glaces multicouches, glaces ondulées, glaces contenant des noix, des fruits, des morceaux de chocolat, etc., l'unité d'échantillonnage doit être représentée par l'unité complète offerte à la vente ;

— Pour les glaces et crèmes glacées vendues au demi-litre ou au litre : prélever l'unité de vente ;

— Dans le cas des productions artisanales, un échantillon de 100 grammes sera prélevé.

Si après analyse les résultats ne sont pas satisfaisants, un deuxième prélèvement de 500 grammes sera effectué.

**II. — ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DES GLACES  
ET CREMES GLACEES**

**A. — MILIEUX DE CULTURE ET DILUANT**

Utiliser pour la préparation du diluant et des milieux de culture, des composants de base deshydratés ou une préparation complète deshydratée. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être distillée ou déminéralisée et exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des microorganismes dans les conditions de l'essai. Si le diluant et les milieux de culture ne sont pas utilisés extemporanément suivre les indications du fabricant.

*1° diluants*

1.1. — Eau peptonée tamponnée :

Peptone .....	10 grammes
Chlorure de sodium .....	5 grammes
Monohydrogénophosphate de sodium .....	9 grammes
Dihydrogénophosphate de potassium .....	1,5 g.
Eau distillée .....	1 000 millilitres

## 1.2. — Tryptone sel :

Tryptone .....	1 gramme
Chlorure de sodium .....	8 grammes
Eau distillée .....	1 000 millilitres
pH = 7,0 ± 0,2	

Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition. Répartir ensuite les quantités de diluant nécessaires pour l'examen dans les fioles de capacité appropriée. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

## 2° Gélose pour dénombrement PCA

Peptone .....	5 grammes
Extrait de levure .....	2,5 g.
Glucose .....	1 gramme
Agar .....	15 grammes
Eau distillée .....	1 000 millilitres
pH = 7,0 ± 0,2	

Dissoudre dans l'eau à ébullition. Répartir le milieu à raison de 15 millilitres par tube à essai stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

## 3° Gélose blanche

Agar .....	9 à 18 grammes
Eau distillée .....	1 000 millilitres

## 4° Gélose au désoxycholate 1 pour 1 000

Peptone bactériologique .....	10 grammes
Chlorure de sodium .....	5 grammes
Phosphate dipotassique .....	2 grammes
Citrate ferrique .....	1 gramme
Citrate de sodium .....	1 gramme
Lactose .....	10 grammes
Désoxycholate de sodium .....	1 gramme
Rouge neutre .....	0,03 g.
Agar .....	13 grammes
Eau distillée .....	1 000 millilitres
pH = 7,3 ± 0,2	

Mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Faire chauffer lentement en agitant fréquemment. Puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Ne pas autoclaver.

## 5° Gélose lactosée, biliée, cristal violet et rouge neutre (VRBL)

Peptone bactériologique .....	7 grammes
Extrait de levure .....	3 grammes
Chlorure de sodium .....	5 grammes
Sels biliaires .....	1,5 g.
Lactose .....	10 grammes
Rouge neutre .....	0,03 g.
Cristal violet .....	0,002 g.
Agar .....	11 grammes
Eau .....	1 000 millilitres
pH = 7,4 ± 0,2	

Mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène.

Faire chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Ce milieu peut être utilisé dès sa préparation ou être stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes.

## 6° Bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB)

## 6.1. — Milieu simple concentration :

Peptone bactériologique .....	10 grammes
Bile de bœuf .....	20 grammes
Lactose .....	10 grammes
Vert brillant .....	0,0133 g.
Eau .....	1 000 millilitres
pH = 7,2 ± 0,2	

## 6.2. — Milieu double concentration :

Peptone bactériologique .....	20 grammes
Bile de bœuf .....	40 grammes
Lactose .....	20 grammes
Vert brillant .....	0,0266 g.
Eau .....	1 000 millilitres
pH = 7,2 ± 0,2	

Bien mélanger et répartir dans les tubes contenant une cloche de Durham.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

## 7° Gélose Baird Parker

Peptone .....	10 grammes
Extrait de viande de bœuf .....	4 grammes
Extrait de levure .....	2 grammes
Pyruvate de sodium .....	10 grammes
Chlorure de lithium .....	5 grammes
Glycocolle .....	12 grammes
Agar .....	14 grammes
Eau distillée .....	1 000 millilitres
pH = 7,2 ± 0,2	

Mettre 57 grammes de poudre dans un litre d'eau froide.

Attendre 5 minutes, puis mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène.

Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

Repartir à raison de 100 millilitres par flacon.

Au moment de l'emploi ajouter à 100 millilitres de milieu fondu et refroidi à 45°C — 50°C, 5 millilitres de jaune d'œuf au tellurite de potassium et 2,5 ml de sulfaméthazine à 0,2 %.

Mélanger soigneusement après chaque addition. Couler 15 à 20 millilitres de milieu complet dans des boîtes de Petri stériles et laisser se solidifier.

Les boîtes peuvent être conservées, avant séchage vingt-quatre heures au maximum entre 0 et + 5°C.

Au moment de l'emploi, sécher les boîtes, de préférence couvercle enlevé et surface de la gélose tournée vers le bas dans une étuve ou un incubateur réglé à 50 ± 1°C pendant 30 minutes.

8° Bouillon cerveau-cœur

Protéose peptone .....	10 grammes
Infusion de cerveau de veau .....	12,5 g.
Infusion de cœur de bœuf .....	5 grammes
Chlorure de sodium .....	5 grammes
Phosphate disodique .....	2,5 g.
Glucose .....	2 grammes

pH = 7,4 ± 0,2

Bien mélanger avant répartition.

Stériliser à l'autoclave 121°C pendant 15 minutes.

9° Plasma de lapin lyophilisé

— Réhydrater le plasma conformément aux indications du fabricant.

10° Bouillon de Muller Kauffmann

— Milieu d'enrichissement au tétrathionate et au vert brillant :

Peptone de soja .....	2,3 g.
Hydrolyat tryptique de caséine .....	7 grammes
Chlorure de sodium .....	25 grammes
Carbonate de sodium .....	25 grammes
Thiosulfate de sodium .....	40,7 g.
Bile de bœuf .....	4,75 g.
Eau distillée .....	1 000 millilitres

pH = 7,3 ± 0,2

Mettre 82 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée. Porter à ébullition.

Ramener à 45°C et ajouter 19 millilitres d'une solution iodo-iodurée et 9,5 ml d'une solution de vert brillant à 0,1 %.

— Solution iodo-ioduré :

Iode .....	20 grammes
Iodure de potassium .....	25 grammes
Eau distillée .....	100 millilitres

— Solution de vert brillant :

Vert brillant .....	0,5 g.
Eau distillée .....	100 millilitres

Bien mélanger et répartir en tubes ou flacons de 20 millilitres stériles.

11° Bouillon au selenite cystine

— Milieu de base :

Tryptone .....	5,0 g.
Lactose .....	4,0 g.
Hydrogénophosphate disodique .....	10,0 g.
Dodécahydraté ( $\text{Na}_2 = \text{HPO}_4 = 12\text{H}_2 = \text{O}$ ) .....	
Hydrogénoselenite de sodium .....	4,0 g.
Eau .....	1 000 millilitres

Dissoudre les trois premiers composants de base dans l'eau, en portant et maintenant à ébullition pendant 5 minutes.

Après refroidissement, ajouter l'hydrogénoselenite de sodium.

Si nécessaire, ajuster le pH à 7,0.

— Solution de L. Cystine :

L. Cystine .....	0,1 g.
Solution d'hydroxyde de sodium .....	15 millilitres
C (NaOH) = 1 mol/l. « Solution 1 N »	

Compléter à 100 millilitres dans une fiole stérile avec de l'eau stérile. Ne pas stériliser.

— Milieu complet :

Milieu de base .....	1 000 millilitres
Solution de L cystine .....	10 millilitres

Refroidir le milieu de base et ajouter stérilement la solution de L. Cystine.

Si nécessaire, ajouter le pH à 7,0

Repartir stérilement le milieu par quantités nécessaires par l'examen dans des flacons stériles de capacité adéquate.

Utiliser le milieu le jour de sa préparation.

12° Bouillon rappaport-vassiliadis au vert malachite et au chlorure de magnesium

— Solution A :

Tryptone .....	5,0 g.
Chlorure de sodium .....	8,0 g.
Dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2 = \text{PO}_4$ ) .....	1,6 g.
Eau .....	1 000 millilitres

Dissoudre les composants dans l'eau en chauffant à 70°C. La solution doit être préparée le jour même de la préparation du milieu rappaport-vassiliadis.

— Solution B :

Sextahydrate de chlorure de magnesium .....	400,0 g.
---	----------

( $\text{mg Cl}_2 = 6\text{H}_2 \text{O}$ )

Eau .....	1 000 millilitres
-----------	-------------------

Dissoudre le chlorure de magnesium dans l'eau.

La solution peut être conservée dans un flacon de verre brun, à la température ambiante.

— Solution C :

Oxalate de vert de malachite .....	0,4 g.
Eau .....	1 000 millilitres

Dissoudre l'oxalate de vert malachite dans l'eau.

La solution peut être conservée dans un flacon de verre brun à température ambiante.

— Milieu complet :

Solution A .....	1 000 millilitres
Solution B .....	100 millilitres
Solution C .....	10 millilitres

Ajouter à 1 000 millilitres de solution A ; 100 millilitres de solution B et 10 millilitres de solutions C.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 5,2.

Repartir des tubes à essai par quantités de 20 millilitres.

Stériliser à 115°C pendant 15 minutes.

Conserver le milieu ainsi préparé au réfrigérateur.

13° Gélose au vert brillant et au rouge de phénol (Edel et kampelmacher).

Extrait de viande de bœuf déshydraté .....	4 grammes
Peptone pancréatique de caséine .....	10 grammes
Extrait de levure .....	3 grammes
Monohydrogène-phosphate de sodium .....	0,8 g.

Dihydrogène phosphate de sodium .....	0,6 g.
Lactose .....	10 grammes
Saccharose .....	10 grammes
Rouge de phénol .....	0,09 g.
Vert brillant .....	0,005 g.
Agar-agar .....	12 à 18 grammes
Eau .....	1 000 millilitres

Dissoudre le milieu complet déshydraté ou les composants de base déshydraté dans l'eau en portant à ébullition.

Ajuster si nécessaire le pH à 7,0.

Répartir le milieu dans des tubes ou flacons appropriés.

Stériliser 15 minutes à  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Répartir le milieu complet dans des boîtes de Pétri et laisser se solidifier.

Juste avant l'emploi, sécher soigneusement les boîtes de milieu séché (de préférence après avoir retiré les couvercles et retourné les boîtes) dans une étuve réglée à  $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durant 30 minutes jusqu'à séchage de la surface de la gélose.

#### 14° Gélose nutritive

Peptone pancréatique de caséine .....	5,0 g.
Extrait de viande .....	3,0 g.
Agar-agar .....	12,0 g.
Eau .....	1 000 grammes

Dissoudre dans l'eau les composants déshydratés ou le milieu complet déshydraté en portant à ébullition. Ajouter le pH de telle sorte qu'il soit de  $7,0 \pm 0,1$  après stérilisation.

Répartir le milieu dans des tubes à raison de 5 millilitres environ par tube.

Stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à  $121^{\circ}\text{C}$ .

Mettre 52 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée.

Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète en agitant fréquemment (mesurer la quantité d'eau à employer après ébullition et refroidissement).

Ne pas autoclaver

Couler en boîte de Pétri.

#### 15° Gélose TSI au citrate de fer et au trois sucres

Extrait de viande .....	3 grammes
Extrait de levure .....	3 grammes
Peptone .....	20 grammes
Chlorure de sodium .....	5 grammes
Lactose .....	10 grammes
Saccharose .....	10 grammes
Glucose .....	1 gramme
Citrate de fer (III) .....	0,3 g.
Thiosulfate de sodium .....	0,3 g.
Rouge de phénol .....	0,024 g.
Agar-Agar .....	12 à 18 grammes
Eau .....	1 000 millilitres

Dissoudre les composants déshydratés ou le milieu de base complet déshydraté dans l'eau en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,4.

Répartir le milieu dans des tubes à essai par quantité de 10 millilitres.

Stériliser pendant 10 minutes à  $121^{\circ}\text{C}$ .

Laisser reposer en position inclinée de façon à obtenir un culot de 2,5 cm de profondeur.

#### 16° Gélose Kligler — Hajna (milieu lactose—glucose $H_2=S$ )

Pastone .....	15 grammes
Extrait de viande de bœuf .....	3 grammes
Extrait de levure .....	3 grammes
Peptone pepsique de viande .....	5 grammes
Chlorure de sodium .....	5 grammes
Sulfate ferreux .....	0,2 g.
Thiosulfate de sodium .....	0,3 g.
Lactose .....	10 grammes
Glucose .....	1 gramme
Rouge de phénol .....	0,024 g.
Agar .....	11 grammes
Eau distillée .....	1 000 millilitres

pH =  $7,5 \pm 0,2$

Mettre 53,5 g. de poudre dans un litre d'eau distillée.

Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

Bien mélanger et répartir.

Stériliser à l'autoclave à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes.

Refroidir en position inclinée.

#### B. — MODE OPERATOIRE

##### 1° Prise d'essai, solution mère, dilutions

L'échantillon prélevé aseptiquement est placé au bain marie à  $45^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la décongélation.

Après avoir mélangé soigneusement l'échantillon fondu, introduire aseptiquement 25 grammes du produit dans un flacon de dilution approprié contenant des billes de verre stérilisées.

Ajouter 225 millilitres du diluant 1.1 ou 1.2 afin de réaliser une suspension au 1/10 (la solution mère). Boucher le flacon et agiter.

Préparer ensuite les dilutions décimales. Transvaser un millilitre de la solution mère dans un tube contenant 9 millilitres de diluant stéril, mélanger en utilisant un agitateur de tube approprié pour obtenir la dilution 10.2.

Répéter l'opération à partir de la dilution 10.2.

Procéder de manière identique pour les dilutions suivantes :

Chaque nouvelle dilution est effectuée avec une pipette d'un millilitre stérile distincte.

##### 2° Dénombrement des germes aérobies mésophiles

— Ensemencement :

Prendre deux boîtes de Pétri stériles. Transférer dans chacune d'elle, à l'aide d'une pipette stérile, un millilitre de suspension mère. Recommencer les mêmes opérations à partir des autres dilutions.

Couler dans chaque boîte de Pétri 15 millilitres de la gélose pour dénombrement (2) préalablement fondue et refroidie à  $45^{\circ}\text{C} \pm 0,50^{\circ}\text{C}$ .

Le temps qui s'écoule entre le moment où l'on prépare les dilutions et celui où l'on coule la gélose dans les boîtes, ne doit pas excéder 15 minutes.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser solidifier en posant les boîtes de Pétri sur une surface fraîche et horizontale.

Couler à la surface du milieuensemencé 4 millilitres de la gélose blanche (3) préalablement fondue et ramenée à 45°C. Laisser solidifier.

— Incubation :

Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer à l'étuve à 30°C ± 1°C pendant 72 + 3 heures.

— Dénombrement :

Procéder alors au comptage des colonies. Ne retenir pour le dénombrement que les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.

### 3° Dénombrement des coliformes

a) Dénombrement de coliformes en milieu solide :

— Ensemencement :

Prendre deux boîtes de Pétri stériles. Transférer dans chacune d'elle, à l'aide d'une pipette stérile, un millilitre de la suspension mère.

Recommencer les mêmes opérations à partir des autres dilutions.

Couler dans chaque boîte de Pétri environ 12 millilitres de gélose VRBL (5) préalablement fondue et ramenée à 45°C ± 0,50°C.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser solidifier les boîtes de Pétri sur une surface fraîche et horizontale. Préparer également une boîte témoin avec 12 millilitres de milieu pour contrôle de stérilité.

Après solidification complète, couler, à la surface du milieuensemencé environ 4 millilitres de gélose VRBL (5) 45°C ± 0,50°C. Laisser solidifier comme décrit ci-dessus.

— Incubation :

Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer à l'étuve à 30°C ± 1°C pendant 24 heures ± 2 heures.

— Dénombrement :

Procéder au comptage des colonies caractéristiques des coliformes (colonies rouge-foncé ayant 0,5 mm de diamètre ou plus).

Retenir pour le dénombrement les boîtes entre 15 et 150 colonies.

b) Dénombrement des coliformes en milieu liquide :

(Méthode avec calcul du nombre le plus probable NPP).

— Ensemencement :

Prendre trois tubes contenant 10 millilitres de milieu double concentration de BLVB. (6.2). Transférer dans chacun de ces tubes, avec une pipette stérile, 10 millilitres de la suspension mère.

Prendre ensuite trois tubes de milieu sélectif simple concentration (6.1). Transférer dans chacun de ces tubes, avec une pipette, un millilitre de la suspension mère.

Répéter les mêmes opérations par les dilutions suivantes :

— Incubation :

Faire incuber les tubes de bouillon double concentration à 30°C ± 1°C pendant 24 heures ± 2 heures.

Faire incuber les tubes de bouillon simple concentration à 30°C ± 1°C, pendant 48 heures ± 2 heures.

— Repiquage :

A partir de chaque tube de bouillon double concentration incubé positif présentant un dégagement gazeux dans les cloches de Durham ensemencer à l'aide d'une anse bouclée, un tube de milieu sélectif simple concentration. Incuber à 30°C ± 1°C pendant 48 ± 2 heures.

— Dénombrement :

Pour chaque dilution, compter les tubes positifs, et calculer le nombre le plus probable à l'aide de tables de référence.

### 4° Dénombrement des coliformes fécaux

a) Dénombrement des coliformes fécaux en milieu solide :

Procéder selon les mêmes modalités que pour les coliformes mais en portant les boîtes de Pétri ensemencées à 44°C ± 0,50°C pendant 24 heures à 48 heures.

b) Dénombrement en milieu liquide :

(Méthode avec calcul du nombre le plus probable NPP).

Repiquer à l'aide d'une anse bouclée, les tubes de bouillon lactosé bilité au vert brillant trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes.

Les tubes ensemencés sont incubés à 44°C ± 0,50°C pendant 24 heures à 48 heures.

Compter les tubes positifs et calculer le nombre le plus probable à l'aide de tables de référence.

### 5° Recherche et dénombrement de staphylococcus aureus.

— Ensemencement :

Prendre deux boîtes de Pétri stériles contenant le milieu Baird Parker (7) et transférer avec une pipette stérile, 0,1 ml de la suspension mère à la surface de chaque boîte. Etaler l'inoculum à l'aide d'un étaleur de verre stérile.

Répéter l'opération avec les dilutions suivantes si nécessaire.

Laisser sécher les boîtes avec leur couvercle environ 15 minutes à la température ambiante.

— Incuber :

Retourner les boîtes ainsi préparées et les faire incuber durant 24 heures puis 48 heures dans l'étuve réglée à 37°C ± 1°C.

— Dénombrement :

Dénombrer les colonies typiques noires, brillantes, de diamètre compris entre 0,5 et 2 millimètres présentant un liseré blanc opaque entouré d'une auréole d'éclaircissement du milieu. Tenir compte pour le dénombrement des boîtes renfermant jusqu'à 150 colonies. Dénombrer séparément les colonies atypiques.

Choisir sur chaque boîte en vue de la confirmation 5 colonies typiques et / ou atypiques.

— Confirmation (recherche de la coagulase) :

A l'aide d'un fil stérile prélever une partie de chaque colonie sélectionnée et l'ensemencer dans un tube du bouillon cerveau-cœur (8).

Faire incuber à 37°C pendant 20 à 24 heures.

Dans des tubes stériles à hémolyse, ajouter aseptiquement 0,5 ml du bouillon cerveau-cœur (8) ensemencé à 1,5 ml du plasma de lapin (9) (ou suivre les indications du fabricant). Agiter et incuber à l'étuve à 37°C.

Vérifier la coagulation du plasma au terme d'une période de 24 heures. Considérer que la réaction est coagulase positive quand le coagulum occupe plus des trois quarts du volume initialement occupé par le liquide.

Calculer le nombre de staphylococcus aureus à l'aide du pourcentage des tubes positifs.

#### 6° Recherche des salmonella SP

La technique de recherche des salmonella doit être faite en trois phases :

##### a) Préenrichissement :

Prendre aseptiquement 25 grammes d'échantillon et ajouter 225 millilitres d'eau tamponnée stérile (1.1). Incuber pendant 16 à 20 heures à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

##### b) Enrichissement :

A partir du milieu de préenrichissement :

— Porter 2 millilitres dans deux tubes contenant 20 millilitres chacun de bouillon Muller Kauffmann au tetrathionate et au vert brillant (10) ou 0,2 ml dans deux tubes contenant chacun 20 millilitres de milieu rappaport vassidialis (12).

Porter également 2 millilitres dans deux tubes contenant 20 millilitres chacun de bouillon au selenite-cystine (11).

— Faire incuber à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  un tube de bouillon au selenite-cystine et un tube contenant le bouillon Muller Kauffmann ou rappaport-vassidialis ;

— Faire incuber à  $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  un tube de bouillon selenite-cystine et un tube contenant le bouillon Muller Kauffmann ou rappaport-vassidialis.

##### c) Isolement :

Après 24 heures d'incubation, effectuer, à partir des milieux d'enrichissement, des isolements à la surface de gélose au vert brillant rouge de phénol (13) et à la surface d'un deuxième milieu sélectif au choix.

Faire incuber les boîtes de Pétri à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures 2 heures. Si le développement est insuffisant, poursuivre l'incubation.

Les colonies typiques de salmonella cultivée sur gélose au vert brillant et au rouge de phénol sont roses bordées de rouge vif.

S'il y a présence de colonies caractéristiques ou suspectes repiquer 5 colonies sur gélose nutritive (14) et les soumettre ensuite aux essais biochimiques classiques.

Utiliser de préférence les géloses TSI (15) ou Kliger (16).

### MINISTRE DE L'EQUIPEMENT DES TRANSPORTS ET DU TOURISME

ARRETE n° 120 METT. du 21 septembre 1993. — Sont nommés directeurs départementaux du ministère de l'Equipelement, des Transports et du Tourisme.:

#### 01. — DIRECTION REGIONALE D'ABIDJAN

##### 01-1. — Direction départementale d'Abidjan-Edilité

M. Gohoun Ouogou, mle 96 972-R, ingénieur des Travaux publics de 1<sup>re</sup> classe 3<sup>e</sup> échelon.

##### 01-2. — Direction départementale d'Abidjan-Yopougon

M. Kongo Beugré, mle 108 396-X, ingénieur des Travaux publics de 1<sup>re</sup> classe 2<sup>e</sup> échelon.

##### 01-3. — Direction départementale de Sesan

M. Coulibaly Fatogoma, mle 161 502-T, ingénieur des Techniques de 2<sup>e</sup> classe 4<sup>e</sup> échelon.

##### 01-4. — Direction départementale d'Aboisso

M. Agui Toussaint Hubert, mle 128 471-S, ingénieur des Travaux publics de 2<sup>e</sup> classe 4<sup>e</sup> échelon.

##### 01-5. — Direction départementale d'Adzopé

M. Goulé-bi-Zah, mle 128 476-X, ingénieur des Travaux publics de 2<sup>e</sup> classe 4<sup>e</sup> échelon.

##### 01-6. — Direction départementale d'Agboville

M. Kouassi Bodi Théodore, mle 103 416-K, ingénieur des Travaux publics de 1<sup>re</sup> classe 3<sup>e</sup> échelon.

##### 01-7. — Direction départementale de Divo

M. Djo Yapo, mle 110 342-A, ingénieur des Travaux publics de 1<sup>re</sup> classe 2<sup>e</sup> échelon.

##### 01-8. — Direction départementale de Tiassalé

M. Gogo Dibo Frédéric, mle 90 159-G, ingénieur des Travaux publics de classe principale 3<sup>e</sup> échelon.

#### 02. — DIRECTION REGIONALE DE DALOA

##### 02-1. — Direction départementale de Daloa

M. Essoh Lath Barnabé, mle 130 427-Q, ingénieur des Travaux publics de 1<sup>re</sup> classe 3<sup>e</sup> échelon.

##### 02-2. — Direction départementale de Gagnoa

M. N'Guessan Yao, mle 110 367-B, ingénieur des Travaux publics de 1<sup>re</sup> classe 1<sup>er</sup> échelon.

##### 02-3. — Direction départementale de Bouaflé

M. Konan Kouakou Adrien, mle 103 415-J, ingénieur des Travaux publics de 1<sup>re</sup> classe 3<sup>e</sup> échelon.

#### 03. — DIRECTION REGIONALE DE KORHOGO

##### 03-1. — Direction départementale de Korhogo

M. Nindjin Malan Joseph, mle 154 833, ingénieur des Travaux publics de 1<sup>re</sup> classe 3<sup>e</sup> échelon.

##### 03-2. — Direction Départementale de Ferké.

M. Coulibaly Innocent B. mle 59 488-F, ingénieur des Techniques de classe principale 1<sup>er</sup> échelon.

##### 03-3. — Direction départementale de Boundiali

M. Aka Ettiégné Eugène, mle 133 141-V, ingénieur des Travaux publics de 2<sup>e</sup> classe 4<sup>e</sup> échelon.

##### 03-4. — Direction départementale de Tengreia

M. Aounan N'Dri Gustave, mle 137 842, ingénieur des Techniques de 2<sup>e</sup> classe 4<sup>e</sup> échelon.