
Norme internationale



6579

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Microbiologie — Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*

Microbiology — General guidance on methods for the detection of Salmonella

Première édition — 1981-03-15

CDU 576.8.087 : 614.31

Réf. n° : ISO 6579-1981 (F)

Descripteurs : analyse microbiologique, détection, microorganisme, salmonelle, matériel d'essai, support de culture, essai.

Prix basé sur 15 pages

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 6579 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en février 1979.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

Afrique du Sud, Rép. d'	France	Pologne
Allemagne, R. F.	Hongrie	Portugal
Australie	Inde	Roumanie
Bulgarie	Indonésie	Royaume-Uni
Canada	Israël	Tchécoslovaquie
Chili	Kenya	Thaïlande
Chypre	Malaisie	Turquie
Corée, Rép. de	Mexique	USA
Égypte, Rép. arabe d'	Pays-Bas	Yougoslavie
Éthiopie	Philippines	

Le comité membre du pays suivant l'a désapprouvée pour des raisons techniques :

Nouvelle-Zélande

Sommaire

	Page
0 Introduction	1
1 Objet	1
2 Domaine d'application	1
3 Définitions	1
4 Principe	1
5 Échantillonnage	2
6 Appareillage et verrerie	2
7 Milieux de culture, réactifs et sérums	3
8 Préparation de l'échantillon pour essai	4
9 Mode opératoire	4
10 Expression des résultats	7
11 Procès-verbal d'essai	7
 Annexes	
A Schéma du mode opératoire	8
B Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs	9
C Spécifications pour le vert brillant	14
D Méthode normalisée d'isolement en stries sur boîtes de milieu gélosé	15

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6579:1981

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40448514-7ef8-4c4f-94f6-68f183813673/iso-6579-1981>

Microbiologie — Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*

0 Introduction

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen des produits non traités dans les Normes internationales existant actuellement et pour être étudiées par les organismes élaborant des méthodes d'essai microbiologiques de référence destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes. Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois qu'il sera possible, les directives données et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec ces directives. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, elles devront être appliquées¹⁾, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles qui auront été nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

PRÉCAUTIONS — Afin de sauvegarder la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de recherche des *Salmonella* ne soient réalisés que dans les laboratoires équipés à cet effet et sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit pris pour se débarrasser des éléments incubés.

1) Pour les viandes et produits à base de viande, voir ISO 3565, *Viandes et produits à base de viande — Recherche des salmonellæ (Méthode de référence)*. Pour le lait et les produits laitiers, une méthode fera l'objet de l'ISO 6785.

2) Les *Salmonella* peuvent, en effet, être présentes en petit nombre et sont souvent accompagnées d'un nombre beaucoup plus grand d'autres micro-organismes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ou à d'autres familles. En conséquence, un enrichissement sélectif est nécessaire; de plus, un préenrichissement est aussi souvent nécessaire afin de pouvoir rechercher les *Salmonella* ayant subi une altération.

1 Objet

La présente Norme internationale donne des directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*.

2 Domaine d'application

Compte tenu des remarques signalées dans l'introduction, la présente Norme internationale est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes sont applicables.

3.1 *Salmonella* : Micro-organismes formant des colonies typiques sur des milieux sélectifs solides et possédant les caractéristiques biochimiques et sérologiques décrites lorsque l'essai est exécuté selon la présente Norme internationale.

3.2 recherche des *Salmonella* : Détermination de la présence ou de l'absence de ces micro-organismes, dans une quantité déterminée de produit, lorsque l'essai est exécuté selon la présente Norme internationale.

4 Principe

En général, la recherche de *Salmonella* nécessite quatre phases successives (voir également annexe A).²⁾

4.1 Préenrichissement en milieu non sélectif liquide

Ensemencement de la prise d'essai dans l'eau peptonée tamponnée (servant également de diluant), puis incubation à la température spécifiée (voir 9.2) durant 16 à 20 h.

4.2 Enrichissement en milieux sélectifs liquides

Ensemencement d'un bouillon au tétrathionate et d'un bouillon au sélénite-cystine avec la culture obtenue en 4.1.

Incubation du bouillon au tétrathionate à 43 °C et incubation du bouillon au sélénite-cystine à la température spécifiée (voir 9.3.2) durant 24 h, puis 48 h.

4.3 Isolement et identification

À partir des cultures obtenues en 4.2, ensemencement de deux milieux sélectifs solides :

- gélose au rouge de phénol et au vert brillant, à moins que la Norme internationale concernant le produit à examiner ou toute autre considération spécifique (par exemple isolement de *Salmonella* lactose positif) ne nécessite la substitution d'un autre milieu obligatoire;
- un autre milieu sélectif solide (voir 7.2.4.2).

Incubation à la température spécifiée (voir 9.4.4), puis examen après 24 h et, si nécessaire, après 48 h, pour contrôler s'il y a présence de colonies présumées être des *Salmonella* en raison de leurs caractéristiques.

4.4 Confirmation

Repiquage des colonies présumées de *Salmonella* isolées en 4.3, et confirmation au moyen des essais biochimiques et sérologiques appropriés.

5 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la Norme internationale relative au produit concerné, si elle existe.

6 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

6.1 Appareillage

6.1.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)

Le matériel en contact avec les milieux de culture, le diluant et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement celui en plastique), doit être stérilisé

- soit au four en le maintenant à une température comprise entre 170 et 175 °C durant au moins 1 h;
- soit à l'autoclave en le maintenant à une température de 121 ± 1 °C durant au moins 20 min.

Un autoclave est également nécessaire pour la stérilisation des milieux de culture et des réactifs. Il doit être réglable à

121 ± 1 °C et à 115 ± 1 °C comme cela est indiqué dans l'annexe B.

6.1.2 Enceinte de séchage, étuve ou incubateur, ventilé(e) (permettant de sécher la surface des milieux gélosés coulés en boîte), réglable à 50 ± 1 °C.

6.1.3 Incubateur, réglable à 35 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C selon la température retenue¹⁾ (permettant de maintenir les milieux ensemencés, les boîtes et les tubes dans l'un ou l'autre de ces intervalles de températures).

6.1.4 Bain d'eau, réglable à 43 ± 0,1 °C, ou **incubateur**, réglable à 42,5 ± 0,5 °C (permettant de maintenir les milieux liquides ensemencés dans l'un ou l'autre de ces intervalles de températures).

6.1.5 Bains d'eau (permettant de réchauffer ou de refroidir les solutions et les milieux de culture aux températures appropriées), réglables à 45 ± 1 °C, à 55 ± 1 °C et à 70 ± 1 °C.

6.1.6 Bain d'eau, réglable à 35 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C selon la température retenue.¹⁾

6.1.7 Anses bouclées, en platine iridié ou en nickel-chrome, d'environ 3 mm de diamètre.

6.1.8 pH-mètre (permettant de mesurer le pH des milieux et réactifs préparés), avec une précision de réglage de ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

6.1.9 Réfrigérateur (permettant de conserver les milieux et réactifs préparés), réglable à 4 ± 2 °C.

6.2 Verrerie

La verrerie doit pouvoir résister à des stérilisations répétées.

6.2.1 Flacons de culture²⁾, pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture et l'incubation des milieux liquides.

6.2.2 Tubes de culture, de 8 mm de diamètre et 160 mm de longueur, pour le milieu de décarboxylation à la lysine.

6.2.3 Éprouvettes graduées, pour la préparation des milieux complets.

6.2.4 Pipettes graduées, de 10 ml et 1 ml de capacités nominales, graduées respectivement en 0,5 ml et 0,1 ml.

6.2.5 Boîtes de Petri, comme suit :

6.2.5.1 Boîtes de grandes dimensions.

Boîte

diamètre extérieur	140 ± 2 mm
hauteur extérieure	30 ± 2 mm
épaisseur du verre	1,5 ± 0,5 mm

1) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le procès-verbal d'essai.

2) Des flacons à capsule métallique à vis peuvent être utilisés.

Le bord doit être rodé dans un plan parallèle à la base.

Le fond de la boîte doit être plat et parallèle à la base.

Couvercle, muni d'un rebord

diamètre extérieur	150 ± 2 mm
hauteur extérieure	15 ± 2 mm
épaisseur du verre	1,5 ± 0,5 mm

6.2.5.2 Boîtes de petites dimensions.

Boîte

diamètre intérieur	90 ± 2 mm
hauteur extérieure, minimum	18 mm

Le bord doit être rodé dans un plan parallèle à la base.

Le fond de la boîte doit être plat et parallèle à la base.

Couvercle, muni d'un rebord

diamètre extérieur, maximum	102 mm
-----------------------------	--------

NOTE — Des boîtes de Petri en plastique peuvent également être utilisées, même si leurs dimensions sont légèrement différentes de celles des boîtes en verre décrites en 6.2.5.1 et 6.2.5.2.

7 Milieux de culture, réactifs et sérums

7.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture et des réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Les mesurages de pH doivent être effectués au moyen du pH-mètre (6.1.8).

Si les milieux de culture préparés et les réactifs préparés ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité à environ 4 °C, pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

7.2 Milieux de culture et réactifs

NOTE — En raison du nombre important de milieux de culture et de réactifs, il a été jugé préférable, pour la clarté du texte, de donner leur composition et leur préparation dans l'annexe B.

7.2.1 Milieu de préenrichissement non sélectif : eau peptonée tamponnée.

Voir chapitre B.1.

7.2.2 Premier milieu d'enrichissement sélectif : bouillon au tétrathionate (Muller-Kauffmann).

Voir chapitre B.2.

7.2.3 Deuxième milieu d'enrichissement sélectif : bouillon au sélénite-cystine.

Voir chapitre B.3.

7.2.4 Milieux d'isolement solides sélectifs.

7.2.4.1 Premier milieu : gélose au rouge de phénol et au vert brillant (Edel et Kampelmacher).

Voir chapitre B.4.

Ce premier milieu est obligatoire sauf indications contraires (voir 4.3).

7.2.4.2 Deuxième milieu.

Le choix du deuxième milieu est laissé à l'initiative du laboratoire d'essais, sauf s'il existe une Norme internationale spécifique concernant le produit à examiner et spécifiant la composition de ce deuxième milieu.

7.2.5 Gélose nutritive.

Voir chapitre B.5.

7.2.6 Gélose au citrate de fer et aux trois sucres (gélose TSI).

Voir chapitre B.6.

7.2.7 Gélose à l'urée (Christensen).

Voir chapitre B.7.

7.2.8 Milieu de décarboxylation à la lysine.

Voir chapitre B.8.

7.2.9 Réactif pour la recherche de la β -galactosidase (ou disques de papier tout préparés, utilisés selon les instructions du fabricant).

Voir chapitre B.9.

7.2.10 Réactifs pour la réaction de Voges-Proskauer.

Voir chapitre B.10.

7.2.10.1 Milieu VP.

7.2.10.2 Solution de créatine (*N*-amidinosarcosine).

7.2.10.3 Solution éthanolique de naphthol-1.

7.2.10.4 Solution d'hydroxyde de potassium.

7.2.11 Réactifs pour la recherche de l'indole.

Voir chapitre B.11.

7.2.11.1 Milieu tryptone-tryptophane (de Ljutov).

7.2.11.2 Réactif de Kovacs.

7.2.12 Gélose nutritive semi-solide.

Voir chapitre B.12.

7.2.13 Solution saline.

Voir chapitre B.13.

7.3 Sérums

On peut trouver dans le commerce plusieurs types de sérums agglutinants contenant des anticorps contre un ou plusieurs facteurs antigéniques O, c'est-à-dire des anti-sérums contenant un ou plusieurs groupes «O» (dénommés anti-sérums «O» monovalents ou polyvalents), des anti-sérums Vi et des anti-sérums contenant des anticorps contre un ou plusieurs facteurs «H» (dénommés anti-sérums «H» monovalents ou polyvalents).

Tous les renforts devront être faits afin de s'assurer que les anti-sérums utilisés conviennent pour la recherche de tous les sérotypes de *Salmonella*. Dans ce but, on pourra se servir d'anti-sérums préparés par un fournisseur dont la compétence est reconnue (par exemple un organisme gouvernemental approprié).

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Se reporter à la Norme internationale concernant le produit à examiner. S'il n'y a pas de Norme internationale disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai et suspension mère

Se reporter à la Norme internationale concernant le produit à examiner.

Pour la préparation de la suspension mère, utiliser comme diluant le milieu de préenrichissement spécifié en 7.2.1.

En général, pour préparer la suspension mère, ajouter une prise d'essai de 25 g dans 225 ml du milieu de préenrichissement (7.2.1), ce qui correspond au rapport prise d'essai/milieu de préenrichissement spécifié dans la présente méthode.¹⁾

Si la prise d'essai prescrite n'est pas de 25 g, utiliser la quantité nécessaire de milieu de préenrichissement pour obtenir approximativement une dilution au 1/10 (masse à volume).

9.2 Préenrichissement non sélectif

Incuber la suspension mère à la température spécifiée, soit 35 °C ou 37 °C²⁾, durant au moins 16 h et au plus 20 h.

9.3 Enrichissement sélectif

9.3.1 Transférer 10 ml de la culture obtenue en 9.2 dans un flacon contenant 100 ml du milieu au tétrathionate (7.2.2), et 10 ml de la culture obtenue en 9.2 dans un flacon contenant 100 ml du milieu au sélénite-cystine (7.2.3)¹⁾.

9.3.2 Incuber les deux milieux ensemencés (9.3.1) de la façon suivante :

- a) le milieu au tétrathionate à 43 °C;
- b) le milieu au sélénite-cystine à la température spécifiée, soit 35 °C ou 37 °C.²⁾

9.4 Isolement et identification

9.4.1 Après 18 à 24 h d'incubation (voir 9.3.2), ensemencer, avec une anse (6.1.7) à partir de la culture dans le milieu au tétrathionate, la surface d'une grande boîte de Petri du premier milieu d'isolement sélectif (en général la gélose au rouge de phénol et au vert brillant, voir 7.2.4.1), de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

1) Afin de réduire la somme de travail d'examen, lorsqu'on doit examiner plus d'une prise d'essai de 25 g provenant d'un lot déterminé de produit alimentaire, et lorsqu'on dispose de preuves indiquant qu'un mélange (réunissant les prises d'essai) ne modifie pas les résultats en ce qui concerne ce produit en particulier, les prises d'essai peuvent être mélangées. Par exemple, si l'on doit examiner 10 prises d'essai de 25 g, combiner ces 10 unités afin d'obtenir un échantillon composite de 250 g et ajouter 2,25 litres de bouillon de préenrichissement, ou bien encore réunir les 10 portions des bouillons de préenrichissement provenant des 10 prises d'essai séparées (voir 9.3.1) pour en enrichir 1 litre de milieu d'enrichissement sélectif.

2) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le procès-verbal d'essai.

Pour le bouillon au sélénite-cystine, il peut être intéressant, dans certains cas, d'élever à 43 °C la température d'incubation. Cette modification devra être indiquée dans le procès-verbal d'essai.

À défaut de grandes boîtes, utiliser deux petites boîtes, l'une après l'autre, en se servant de la même anse (voir la note).

Opérer de même avec le deuxième milieu d'isolement sélectif (7.2.4.2) en se servant d'une nouvelle anse, et de boîtes de Petri de dimensions appropriées.

NOTE — La méthode suivante d'isolement en stries est recommandée lorsqu'on emploie la gélose au rouge de phénol et au vert brillant. Utiliser une anse (6.1.7) pour deux boîtes. Prélever une gouttelette à la surface du liquide. Ensemencer les deux boîtes selon les deux diagrammes de l'annexe D. Utiliser la totalité de la boîte; les stries doivent être espacées d'environ 0,5 cm. (Ne pas flamber et ne pas recharger l'anse ni après avoir tracé la première strie, ni au moment de passer à la seconde boîte.) Lorsqu'on utilise seulement une boîte de grandes dimensions, appliquer la méthode d'isolement en stries indiquée pour la première boîte.

9.4.2 À partir de la culture dans le milieu au sélénite-cystine, répéter les opérations décrites en 9.4.1 avec les deux milieux d'isolement sélectifs.

9.4.3 Retourner les boîtes (9.4.1 et 9.4.2), les placer dans un incubateur (6.1.3) réglé à la température spécifiée, soit 35 °C ou 37 °C.¹⁾

9.4.4 Après une durée totale d'incubation de 48 h (voir 9.3.2), répéter les opérations décrites de 9.4.1 à 9.4.3 inclus, à partir des deux milieux d'enrichissement ensemencés.

9.4.5 Après 20 h à 24 h d'incubation, examiner les boîtes (9.4.3 et 9.4.4), afin de rechercher la présence de colonies typiques de *Salmonella*. Les colonies typiques de *Salmonella* cultivées sur gélose au vert brillant et au rouge de phénol provoquent un virage du milieu du rose au rouge.

9.4.6 Si le développement est faible ou s'il n'y a pas de colonies typiques de *Salmonella*, incubé à nouveau les boîtes à 35 °C ou à 37 °C¹⁾ durant 18 à 24 h.

Réexaminer les boîtes afin de rechercher la présence de colonies typiques de *Salmonella*.

NOTE — Toute colonie typique ou suspecte doit être soumise à une confirmation (9.5); en effet, la reconnaissance de colonies de *Salmonella* est en grande partie une question d'expérience, et leur aspect peut quelquefois varier non seulement d'une espèce à une autre, mais également d'un lot de milieu de culture à un autre. À cet égard, l'agglutination, à ce stade, des colonies avec un sérum anti-*Salmonella* polyvalent peut faciliter la reconnaissance de colonies suspectes.

9.5 Confirmations

9.5.1 Choix des colonies pour les confirmations

Pour les confirmations, prélever, à partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs (voir 9.4.5 et 9.4.6), cinq colonies considérées comme typiques ou suspectes.

S'il se trouve une boîte avec moins de cinq colonies typiques ou suspectes, retenir toutes les colonies typiques ou suspectes.

Ensemencer les colonies sélectionnées sur la surface de boîtes de gélose nutritive (7.2.5), préalablement séchées, de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

Incuber les boîtes ainsi ensemencées à 35 °C ou à 37 °C¹⁾ durant 18 à 24 h.

Utiliser des cultures pures pour les confirmations biochimique et sérologique.

9.5.2 Confirmation biochimique

À l'aide d'un fil à ensemencement, ensemencer les milieux indiqués en 9.5.2.1 à 9.5.2.6 avec chacune des cultures obtenues à partir des colonies retenues en 9.5.1.

9.5.2.1 Gélose TSI (7.2.6)

Ensemencer la pente du milieu par des stries et le culot par piqûre.

Incuber à 35 °C ou à 37 °C¹⁾ durant 24 h.

Interpréter les phénomènes se produisant, de la façon suivante :

Culot

jaune	: glucose positif (fermentation du glucose)
rouge ou inchangé	: glucose négatif (pas de fermentation du glucose)
noir	: formation de sulfure d'hydrogène
bulles ou fissures	: formation de gaz à partir du glucose

Pente de la gélose

jaune	: lactose et/ou saccharose positifs (utilisation du lactose et/ou du saccharose)
rouge ou inchangée	: lactose et saccharose négatifs (pas d'utilisation du lactose ni du saccharose)

Les cultures typiques de *Salmonella* correspondent à une pente alcaline (rouge) avec formation de gaz et un culot acide (jaune), avec (dans environ 90 % des cas) formation de sulfure d'hydrogène (noircissement de la gélose).

Lorsqu'on isole une *Salmonella* lactose positif (voir 4.3), la pente de la gélose TSI est jaune. En conséquence, une confirmation préliminaire de cultures de *Salmonella* ne doit pas être basée uniquement sur les résultats obtenus à partir de la gélose TSI (voir 9.5.3).

1) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le procès-verbal d'essai.

9.5.2.2 Gélose à l'urée (7.2.7)

Ensemencer par des stries la pente de la gélose.

Incuber à 35 °C ou à 37 °C¹⁾ durant 24 h et examiner de temps en temps.

En cas de réaction positive, la décomposition de l'urée produit un dégagement d'ammoniac, faisant virer le rouge de phénol au rose, puis au rouge foncé. La réaction est souvent visible au bout de 2 à 4 h.

9.5.2.3 Milieu de décarboxylation à la lysine (7.2.8)

Ensemencer le milieu juste au-dessous de la surface du liquide.

Incuber à 35 °C ou à 37 °C¹⁾ durant 24 h.

Une couleur violette après incubation indique une réaction positive.

Une couleur jaune indique une réaction négative.

9.5.2.4 Réactif pour la recherche de la β -galactosidase (7.2.9)

Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube contenant 0,25 ml de la solution saline (7.2.13).

Ajouter 1 goutte de toluène et agiter le tube.

Mettre le tube au bain d'eau réglé à 35 °C ou à 37 °C¹⁾ et l'y laisser séjourner quelques minutes.

Ajouter 0,25 ml du réactif pour la recherche de la β -galactosidase et mélanger.

Replacer le tube au bain d'eau réglé à 35 °C ou à 37 °C¹⁾, l'y laisser séjourner 24 h en l'examinant de temps en temps.

Une couleur jaune indique une réaction positive. La réaction est souvent visible au bout de 20 min.

9.5.2.5 Milieu pour la réaction de Voges-Proskauer (7.2.10)

Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube stérile contenant 0,2 ml du milieu VP (7.2.10.1).

Incuber à 35 °C ou à 37 °C¹⁾ durant 24 h.

Après incubation, ajouter 2 gouttes de la solution de créatine (7.2.10.2), 3 gouttes de la solution éthanolique de naphthol-1 (7.2.10.3) et, ensuite, 2 gouttes de la solution d'hydroxyde de potassium (7.2.10.4), en agitant après avoir ajouté chaque réactif.

La formation d'une coloration rose à rouge brillant dans un délai de 15 min indique une réaction positive.

9.5.2.6 Milieu pour la recherche de l'indole (7.2.11)

Ensemencer un tube contenant 5 ml du milieu tryptone-tryptophane (7.2.11.1) avec la colonie suspecte.

Incuber à 35 °C ou à 37 °C¹⁾ durant 24 h.

Après incubation, ajouter 1 ml du réactif de Kovacs (7.2.11.2).

La formation d'un anneau rouge indique une réaction positive.

Un anneau jaune-brun indique une réaction négative.

9.5.2.7 Interprétation des essais biochimiques

Les *Salmonella* donnent en général les réactions suivantes²⁾ :

	Réaction positive ou négative	Pourcentage d'ensemencements de <i>Salmonella</i> présentant la réaction ³⁾
Glucose, TSI (formation d'acide) (9.5.2.1)	+	100
Glucose, TSI (formation de gaz) (9.5.2.1)	+	91,9 ⁴⁾
Lactose, TSI (9.5.2.1)	-	99,2 ⁵⁾
Saccharose, TSI (9.5.2.1)	-	99,5
Sulfure d'hydrogène, TSI (9.5.2.1)	+	91,6
Décomposition de l'urée (9.5.2.2)	-	100
Décarboxylation à la lysine (9.5.2.3)	+	94,6
Réaction à la β -galactosidase (9.5.2.4)	-	98,5 ⁵⁾
Réaction de Voges-Proskauer (9.5.2.5)	-	100
Recherche de l'indole (9.5.2.6)	-	98,9

1) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le procès-verbal d'essai.

2) W. H. Ewing and M. M. Ball. The biochemical reactions of members of the genus *Salmonella* (1966). National Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, USA.

3) Ces pourcentages indiquent seulement que toutes les souches de *Salmonella* ne donnent pas les réactions par + ou -. Ces pourcentages peuvent varier d'un pays à un autre et d'un produit à un autre.

4) La *Salmonella typhi* est anaérogène.

5) Les *Salmonella* du sous-genre III (Arizona) donnent des réactions lactose positives ou négatives mais sont toujours β -galactosidase positives. Les *Salmonella* du sous-genre II donnent une réaction lactose négative, mais peuvent donner une réaction β -galactosidase positive. Pour l'étude des souches, il peut être utile d'effectuer des essais biochimiques complémentaires.

9.5.3 Confirmation sérologique

La recherche de la présence des antigènes «O», «Vi», ou «H» des *Salmonella* est effectuée par une agglutination sur lame avec les sérums appropriés, à partir de colonies pures (9.5.1), et après élimination des souches auto-agglutinables.

9.5.3.1 Élimination des souches auto-agglutinables

Déposer, sur une lame de verre parfaitement propre, une goutte de la solution saline (7.2.13).

Disperser, dans cette goutte, une fraction de la colonie à tester, de manière à obtenir une suspension homogène et trouble.

Faire osciller la lame durant 30 à 60 s.

Observer le résultat sur fond noir, de préférence à l'aide d'une loupe.

Si les bactéries se sont rassemblées en masses plus ou moins distinctes, la souche est considérée comme auto-agglutinable et ne doit pas être soumise aux essais suivants, la mise en évidence des antigènes étant rendue impossible.

9.5.3.2 Mise en évidence des antigènes «O»

À partir d'une colonie pure reconnue non auto-agglutinable, opérer comme en 9.5.3.1, mais en utilisant une goutte de l'anti-sérum «O» (7.3) au lieu de la solution saline.

S'il y a agglutination, la réaction est considérée comme positive.

Utiliser les sérums poly- et monovalents l'un après l'autre.

9.5.3.3 Mise en évidence des antigènes «Vi»

Opérer comme en 9.5.3.1, mais en utilisant une goutte de l'anti-sérum Vi (7.3) au lieu de la solution saline.

S'il y a agglutination, la réaction est considérée comme positive.

9.5.3.4 Mise en évidence des antigènes «H»

Ensemencer la gélose nutritive semi-solide (7.2.12) avec une colonie pure non auto-agglutinable.

Incuber à 35 °C ou à 37 °C¹⁾ durant 18 à 24 h.

Utiliser cette culture pour l'examen des antigènes «H» en opérant comme en 9.5.3.1, mais en utilisant une goutte de l'anti-sérum «H» (7.3) au lieu de la solution saline.

S'il y a agglutination, la réaction est considérée comme positive.

9.5.4 Interprétation des réactions biochimiques et sérologiques

Le tableau donne l'interprétation des essais de confirmations (9.5.2 et 9.5.3), effectués sur les colonies retenues (9.5.1).

Tableau

Réactions biochimiques	Auto-agglutination	Réactions sérologiques	Interprétation
Typiques	Non	Antigène «O», «Vi» ou «H» positive	Souches considérées comme étant des <i>Salmonella</i>
Typiques	Non	Toutes les réactions négatives	Peuvent être des <i>Salmonella</i>
Typiques	Oui	Non effectuées (voir 9.5.3.1)	
Pas de réactions typiques	Non	Antigène «O», «Vi» ou «H» positive	Ne sont pas considérées comme étant des <i>Salmonella</i>
Pas de réactions typiques	Non	Toutes les réactions négatives	

9.5.5 Confirmation définitive

Les souches considérées comme étant des *Salmonella* ou comme pouvant être des *Salmonella* (voir le tableau) doivent être envoyées à un centre agréé pour l'identification des *Salmonella* en vue d'une détermination définitive du sérotype.

Cet envoi doit être accompagné de toutes les informations disponibles concernant la ou les souches.

10 Expression des résultats

Selon les résultats de l'interprétation, indiquer la présence ou l'absence de *Salmonella* dans une prise d'essai de x g de produit.

11 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Préciser notamment la température d'incubation retenue, soit 35 °C ou 37 °C, et, pour le bouillon au sélénite-cystine, si la température a été portée à 43 °C.

Le procès-verbal d'essai doit également mentionner si un résultat positif a été obtenu seulement en utilisant un milieu d'isolement (7.2.4) non décrit dans la présente Norme internationale.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

1) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le procès-verbal d'essai.