

NORME
INTERNATIONALE

ISO
6579

Deuxième édition
1990-06-01

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

Microbiology — General guidance on methods for the detection of Salmonella



Numéro de référence
ISO 6579 : 1990 (F)

Sommaire

| | Page |
|--|------|
| Avant-propos | iii |
| Introduction | iv |
| 1 Domaine d'application | 1 |
| 2 Définitions | 1 |
| 3 Principe | 1 |
| 4 Milieux de culture, réactifs et sérum | 1 |
| 5 Appareillage et verrerie | 3 |
| 6 Échantillonnage | 3 |
| 7 Préparation de l'échantillon pour essai | 3 |
| 8 Mode opératoire | 3 |
| 9 Expression des résultats | 7 |
| 10 Rapport d'essai | 7 |
| 11 Assurance de la qualité | 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 |

© ISO 1990

Droits de reproduction réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

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 en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 6579 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 6579 : 1981), dont elle constitue une révision technique.

Les annexes A, B et C font partie intégrante de la présente Norme internationale. L'annexe D est donnée uniquement à titre d'information.

Introduction

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen des produits non concernés dans les Normes internationales existant actuellement et pour être prises en considération 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.

1) Pour la viande et les produits à base de viande, voir ISO 3565 : 1975, *Viandes et produits à base de viande — Recherche des Salmonellæ (Méthode de référence)*. Pour le lait et les produits laitiers, voir ISO 6785 : 1985, *Lait et produits laitiers — Recherche des Salmonella*.

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

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 Domaine d'application

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

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.

2 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

2.1 *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.

2.2 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.

3 Principe

En général, la recherche de *Salmonella* nécessite quatre phases successives (voir également annexe A).¹⁾

3.1 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 8.2) durant 16 h à 20 h.

3.2 Enrichissement en milieux sélectifs liquides

Ensemencement d'un bouillon de vert malachite au chlorure de magnésium et d'un bouillon au sélénite-cystine avec la culture obtenue en 3.1.

Incubation du bouillon de vert malachite au chlorure de magnésium à 42 °C et incubation du bouillon au sélénite-cystine à la température spécifiée (voir 8.3.2) durant 18 h à 24 h.

3.3 Isolement et identification

À partir des cultures obtenues en 3.2, 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 4.2.4.2).

Incubation à la température spécifiée (voir 8.4.5), puis examen après 24 h et, si nécessaire, après 48 h, pour contrôler si l'on est en présence de colonies présumées être des *Salmonella*, en raison de leurs caractéristiques.

3.4 Confirmation

Repiquage des colonies présumées de *Salmonella* isolées en 3.3, et confirmation au moyen des essais biochimiques et sérologiques appropriés.

4 Milieux de culture, réactifs et sérum

4.1 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.

1) 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.

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

Les mesures de pH doivent être effectuées au moyen du pH-mètre (5.8) réglé à la température de 25 °C.

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 entre 0 °C et 5 °C, pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

4.2 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.

4.2.1 Milieu de préenrichissement non sélectif : eau peptonée tamponnée.

Voir article B.1.

4.2.2 Premier milieu d'enrichissement sélectif : bouillon au vert malachite au chlorure de magnésium (milieu RV).

Voir article B.2.

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

Voir article B.3.

4.2.4 Milieux d'isolement solides sélectifs.

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

Voir article B.4.

Ce premier milieu est obligatoire sauf indications contraires (voir 3.3).

4.2.4.2 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.

4.2.5 Gélose nutritive.

Voir article B.5.

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

Voir article B.6.

4.2.7 Gélose à l'urée (Christensen).

Voir article B.7.

4.2.8 Milieu pour décarboxylation de la lysine.

Voir article B.8.

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

Voir article B.9.

4.2.10 Réactifs pour la réaction de Voges-Proskauer.

Voir article B.10.

4.2.10.1 Milieu VP.

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

4.2.10.3 Solution éthanolique de naphтол-1.

4.2.10.4 Solution d'hydroxyde de potassium.

4.2.11 Réactifs pour la recherche de l'indole.

Voir article B.11.

4.2.11.1 Milieu tryptone-tryptophane (de Ljutov).

4.2.11.2 Réactif de Kovacs.

4.2.12 Gélose nutritive semi-solide.

Voir article B.12.

4.2.13 Solution saline.

Voir article B.13.

4.3 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 efforts 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).

5 Appareillage et verrerie

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si les spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

5.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave), (autoclave autonome ou faisant partie d'un appareillage pour préparer et répartir les milieux).

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, les milieux de culture et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement le matériel en plastique), doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes :

- soit au four en le maintenant à une température de 170 °C à 175 °C pendant au moins 1 h;
- soit à l'autoclave en le maintenant à une température de 121 °C ± 1 °C pendant 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 °C ± 1 °C et à 115 °C ± 1 °C comme cela est indiqué dans l'annexe B.

5.2 Enceinte de séchage ou étuve ventilée par convection (permettant de sécher la surface des milieux gélosés coulés en boîte), réglable à 50 °C ± 1 °C.

5.3 Étuve, réglable à 35 °C ± 1 °C ou à 37 °C ± 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).

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

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

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

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

5.8 pH-mètre ayant une précision de réglage de ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

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

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

5.11 Éprouvettes graduées, pour la préparation des milieux complets.

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

5.13 Boîtes de Petri, de petites dimensions (90 mm à 100 mm) et/ou de grandes dimensions (140 mm).

6 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de Norme internationale spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Voir la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de Norme internationale spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Mode opératoire

8.1 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 4.2.1.

En général, pour préparer la suspension mère, ajouter une prise d'essai de 25 g dans 225 ml du milieu de préenrichissement (4.2.1), ce qui correspond au rapport prise d'essai/milieu de préenrichissement spécifié dans la présente méthode.³⁾

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).

NOTE — Les produits alimentaires séchés, en poudre, peuvent nécessiter une opération de réhydratation spéciale pour améliorer la mise en évidence des *Salmonella*. À cet effet, deux techniques peuvent être utilisées, celle par immersion et celle par agitation. Consulter la Norme internationale relative au produit examiné. En l'absence d'une telle norme, il est recommandé que les parties concernées parviennent à un accord à ce sujet.

8.2 Préenrichissement non sélectif

Incuber la suspension mère à la température spécifiée, soit 35 °C ou 37 °C¹⁾, durant au moins 16 h et au plus 20 h.

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

2) Des bouteilles ou flacons à capsules métalliques à vis non toxiques peuvent être utilisés.

3) 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 portions de 0,1 ml (milieu RV) et de 10 ml (milieu au sélénite-cystine) des bouillons de préenrichissement provenant des 10 prises d'essais séparées (voir 8.3.1) pour en enrichir 0,1 litre et 1 litre, respectivement, de milieu d'enrichissement sélectif.

8.3 Enrichissement sélectif

8.3.1 Transférer 0,1 ml de la culture obtenue en 8.2 dans un tube contenant 10 ml du milieu RV (4.2.2), et 10 ml de la culture obtenue en 8.2 dans un flacon contenant 100 ml du milieu au sélénite-cystine (4.2.3)¹⁾.

8.3.2 Incuber les deux milieuxensemencés (8.3.1) de la façon suivante :

- a) le milieu RV à 42 °C;
- b) le milieu au sélénite-cystine à la température spécifiée, soit 35 °C ou 37 °C²⁾.

8.4 Isolement et identification

8.4.1 Après 18 h à 24 h d'incubation (voir 8.3.2), ensemencer, avec une anse (5.7) à partir de la culture dans le milieu RV, 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 4.2.4.1), de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

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 (4.2.4.2) 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 (5.7) 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 devraient 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 en annexe D.

8.4.2 À partir de la culture dans le milieu au sélénite-cystine, répéter les opérations décrites en 8.4.1 avec les deux milieux d'isolement sélectifs.

8.4.3 Retourner les boîtes (8.4.1 et 8.4.2), les placer dans une étuve (5.3) réglée à la température spécifiée, soit 35 °C ou 37 °C.²⁾

8.4.4 Après une durée totale d'incubation de 48 h (voir 8.3.2), répéter les opérations décrites de 8.4.1 à 8.4.3 inclus, à partir des deux milieux d'enrichissementensemencés.

8.4.5 Après 20 h à 24 h d'incubation, examiner les boîtes (8.4.3 et 8.4.4), 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.

8.4.6 Si le développement est faible ou s'il n'y a pas de colonies typiques de *Salmonella*, incuber à nouveau les boîtes à 35 °C ou à 37 °C²⁾ durant 18 h à 24 h.

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

NOTE — Il convient de soumettre toute colonie typique ou suspecte à une confirmation (8.5); 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.

8.5 Confirmations

8.5.1 Choix des colonies pour les confirmations

Pour les confirmations, prélever, à partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs (voir 8.4.5 et 8.4.6), 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 (4.2.5), préalablement séchées, de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

Incuber les boîtes ainsiensemencées à 35 °C ou à 37 °C²⁾ durant 18 h à 24 h.

Utiliser des cultures pures pour les confirmations biochimique et sérologique.

8.5.2 Confirmation biochimique

À l'aide d'un fil à ensemencement, ensemencer les milieux indiqués en 8.5.2.1 à 8.5.2.6 avec chacune des cultures obtenues à partir des colonies retenues en 8.5.1.

8.5.2.1 Gélose TSI (4.2.6)

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

Incuber à 35 °C ou à 37 °C²⁾ 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 |

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 portions de 0,1 ml (milieu RV) et de 10 ml (milieu au sélénite-cystine) des bouillons de préenrichissement provenant des 10 prises d'essais séparées (voir 8.3.1) pour en enrichir 0,1 litre et 1 litre, respectivement, de milieu d'enrichissement sélectif.

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

3) Pour le bouillon au sélénite-cystine, il peut être intéressant, dans certains cas, d'élever à 42 °C la température d'incubation. Cette modification devra être indiquée dans le rapport d'essai.

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 3.3), 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 8.5.3).

8.5.2.2 Gélose à l'urée (4.2.7)

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 h à 4 h.

8.5.2.3 Milieu de décarboxylation à la lysine (4.2.8)

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.

8.5.2.4 Réactif pour la recherche de la β -galactosidase (4.2.9)

Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube contenant 0,25 ml de la solution saline (4.2.13).

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. Dans le cas d'utilisation de disques en papier tout préparés (4.2.9), suivre les instructions du fabricant.

8.5.2.5 Milieu pour la réaction de Voges-Proskauer (4.2.10)

Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube stérile contenant 0,2 ml du milieu VP (4.2.10.1).

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

Après incubation, ajouter 2 gouttes de la solution de créatine (4.2.10.2), 3 gouttes de la solution éthanolique de naphтол-1 (4.2.10.3) et, ensuite, 2 gouttes de la solution d'hydroxyde de potassium (4.2.10.4), 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.

8.5.2.6 Milieu pour la recherche de l'indole (4.2.11)

Ensemencer un tube contenant 5 ml du milieu tryptone-tryptophane (4.2.11.1) avec la colonie suspecte.

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

Après incubation, ajouter 1 ml du réactif de Kovacs (4.2.11.2).

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

Un anneau jaune-brun indique une réaction négative.

8.5.2.7 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) (8.5.2.1) | + | 100 |
| Glucose, TSI (formation de gaz) (8.5.2.1) | + | 91,9 ⁴⁾ |
| Lactose, TSI (8.5.2.1) | - | 99,2 ⁵⁾ |

1) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le rapport 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.

| | Réaction positive ou négative | Pourcentage d'ensemencements de <i>Salmonella</i> présentant la réaction ¹⁾ |
|--|-------------------------------|--|
| Saccharose, TSI (8.5.2.1) | - | 99,5 |
| Sulfure d'hydrogène, TSI (8.5.2.1) | + | 91,6 |
| Décomposition de l'urée (8.5.2.2) | - | 100 |
| Décarboxylation à la lysine (8.5.2.3) | + | 94,6 |
| Réaction à la β -galactosidase (8.5.2.4) | - | 98,5 ²⁾ |
| Réaction de Voges-Proskauer (8.5.2.5) | - | 100 |
| Recherche de l'indole (8.5.2.6) | - | 98,9 |

8.5.3 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 (8.5.1), et après élimination des souches auto-agglutinables.

8.5.3.1 Élimination des souches auto-agglutinables

Déposer, sur une lame de verre parfaitement propre, 1 goutte de la solution saline (4.2.13).

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 s 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.

8.5.3.2 Mise en évidence des antigènes «O»

À partir d'une colonie pure reconnue non auto-agglutinable, opérer comme en 8.5.3.1, mais en utilisant une goutte de l'anti-sérum «O» (4.3) 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.

8.5.3.3 Mise en évidence des antigènes «Vi»

Opérer comme en 8.5.3.1, mais en utilisant une goutte de l'anti-sérum Vi (4.3) au lieu de la solution saline.

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

8.5.3.4 Mise en évidence des antigènes «H»

Ensemencer la gélose nutritive semi-solide (4.2.12) avec une colonie pure non auto-agglutinable.

Incuber à 35 °C ou à 37 °C³⁾ durant 18 h à 24 h.

Utiliser cette culture pour l'examen des antigènes «H» en opérant comme en 8.5.3.1, mais en utilisant une goutte de l'anti-sérum «H» (4.3) au lieu de la solution saline.

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

8.5.4 Interprétation des réactions biochimiques et sérologiques

Le tableau 1 donne l'interprétation des essais de confirmations (8.5.2 et 8.5.3), effectués sur les colonies retenues (8.5.1).

Tableau 1

| 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 8.5.3.1) | |
| 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 | |

NOTE — Les galeries d'identification, actuellement disponibles dans le commerce et permettant d'identifier les *Salmonella*, peuvent être utilisées.

1) 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.

2) 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.

3) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le rapport d'essai.

8.5.5 Confirmation définitive

Les souches considérées comme étant des *Salmonella* ou comme pouvant être des *Salmonella* (voir le tableau 1) 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.

9 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.

10 Rapport d'essai

Le rapport 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 42 °C.

Le rapport d'essai doit également mentionner si un résultat positif a été obtenu seulement en utilisant un milieu d'isolement (4.2.4) non décrit dans la présente Norme internationale.

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

11 Assurance de la qualité

Afin de vérifier l'aptitude à rechercher les *Salmonella* par les méthodes et avec les milieux décrits dans la présente Norme internationale, les échantillons de référence devront être introduits dans des flacons de contrôle du milieu de préenrichissement (voir 7.2.1). Procéder avec les flacons de contrôle comme pour les cultures d'essai.