

NORME
INTERNATIONALE

ISO
6579

Troisième édition
1993-09-01

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

iTeh STANDARD PREVIEW

(Member of iTeh.ai)
*Microbiology — General guidance on methods for the detection of
Salmonella*

ISO 6579:1993

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/3aaab8a8-4ec4-4b09-b0ff-1ae1a8dc9260/iso-6579-1993>



Numéro de référence
ISO 6579:1993(F)

Sommaire

	Page
1	1
2	1
3	1
4	1
5	2
6	3
7	3
8	3
9	4
10	7
11	7
12	8

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Annexes

A	9
B	10
C	17
D	18

© ISO 1993

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*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 6579:1990), 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.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/722ab8a8-4cc1-4b09-b0ff-1c1d57921000/iso-6579-1993>

Introduction

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen de produits non concernés par les Normes internationales existant actuellement, et à prendre en considération par les organismes élaborant des méthodes d'essais microbiologiques 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.

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3aaab8a8-4ec4-4b09-b0ff-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3aaab8a8-4ec4-4b09-b0ff-1ae1a8dc9260/iso-6579-1993)

[1ae1a8dc9260/iso-6579-1993](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3aaab8a8-4ec4-4b09-b0ff-1ae1a8dc9260/iso-6579-1993)

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler. Elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient alignées sur la présente Norme internationale, si bien que finalement les seules divergences restantes seront celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

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

AVERTISSEMENT — 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.

La température d'incubation retenue (35 °C ou 37 °C) doit faire l'objet d'un accord entre les parties concernées et doit être notée dans le rapport d'essai.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique*.

ISO 7218:1985, *Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques*.

3 Définitions

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

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

La recherche de *Salmonella* nécessite quatre phases successives (voir également annexe A).

NOTE 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.

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 35 °C ou 37 °C (selon accord) durant 16 h à 20 h.

4.2 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 4.1.

Incubation du bouillon de vert malachite au chlorure de magnésium à 42 °C pendant 24 h et incubation du bouillon au sélénite-cystine à 35 °C ou 37 °C (selon accord) durant 24 h et 24 h supplémentaires.

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 5.2.4.2).

Incubation à 35 °C ou 37 °C (selon accord) 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.

4.4 Confirmation

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

5 Milieux de culture, réactifs et sérum

5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218.

5.2 Milieux de culture et réactifs

NOTE 2 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.

5.2.1 Milieu de préenrichissement non sélectif: eau peptonée tamponnée.

Voir article B.1.

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

Voir article B.2.

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

Voir article B.3.

5.2.4 Milieux d'isolement sélectifs solides.

5.2.4.1 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 4.3).

5.2.4.2 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.

5.2.5 Gélose nutritive.

Voir article B.5.

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

Voir article B.6.

5.2.7 Gélose à l'urée (Christensen).

Voir article B.7.

5.2.8 Milieu pour décarboxylation de la L-lysine.

Voir article B.8.

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

Voir article B.9.

5.2.10 Réactifs pour la réaction de Voges-Proskauer (VP).

Voir article B.10.

5.2.10.1 Milieu VP.**5.2.10.2 Solution de créatine
(N-amidinosarcosine).****5.2.10.3 Solution éthanolique de naphthol-1.****5.2.10.4 Solution d'hydroxyde de potassium.****5.2.11 Réactifs pour la recherche de l'indole.**

Voir article B.11.

5.2.11.1 Milieu tryptone-tryptophane.**5.2.11.2 Réactif de Kovacs** (complexe de N, N-dicyclohexylcarbodiimide pentachlorophénol).**5.2.12 Gélose nutritive semi-solide.**

Voir article B.12.

5.2.13 Solution saline.

Voir article B.13.

5.3 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, par un organisme gouvernemental approprié).

6 Appareillage et verrerie

NOTE 3 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 en particulier, ce qui suit.

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

Voir l'ISO 7218.

6.2 Enceinte de séchage ou **étuve**, ventilée par convection réglable entre $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $55\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.3 Étuve, réglable à $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ou $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, selon la température retenue.

6.4 Bain d'eau, réglable à $42,0\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$, ou **étuve**, réglable à $42,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

6.5 Bains d'eau, réglables à $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, à $55\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et à $70\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.6 Bain d'eau, réglable à $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ou à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, selon la température retenue.

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

6.8 pH-mètre, ayant une précision de réglage de $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C .

6.9 Flacons de culture.

NOTE 4 Des bouteilles ou flacons à capsules métalliques ou en matière plastique à vis non toxiques peuvent être utilisés.

6.10 Tubes de culture, de 8 mm de diamètre et 160 mm de longueur.

6.11 Éprouvettes graduées.

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

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

7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. 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 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique,

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6579:1993
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3aaab8a8-4ec4-4b09-b0ff-1993/iso-6579-1993

il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

(Voir le schéma en annexe A.)

9.1 Prise d'essai et suspension mère

9.1.1 Voir l'ISO 6887 et la Norme internationale concernant le produit à examiner.

Pour la préparation de la suspension mère, utiliser comme diluant le milieu de préenrichissement spécifié en 5.2.1.

9.1.2 En général, pour préparer la suspension mère, ajouter une prise d'essai de 25 g dans 225 ml du milieu de préenrichissement (5.2.1), ce qui correspond au rapport prise d'essai/milieu de préenrichissement spécifié dans la présente méthode.

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).

NOTES

5 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 9.3.1) pour en enrichir 0,1 litre et 1 litre, respectivement, de milieu d'enrichissement sélectif.

6 Les produits alimentaires séchés ou en poudres 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.

9.2 Préenrichissement non sélectif

Incuber la suspension mère à 35 °C ou à 37 °C (selon accord), durant au moins 16 h et au plus 20 h.

9.3 Enrichissement sélectif

9.3.1 Transférer 0,1 ml de la culture obtenue en 9.2 dans un tube contenant 10 ml du milieu RV (5.2.2), et 10 ml de la culture obtenue en 9.2 dans un flacon contenant 100 ml du milieu au sélénite-cystine (5.2.3).

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

- le milieu RV à 42 °C, pendant 24 h;
- le milieu au sélénite-cystine à 35 °C ou à 37 °C (selon accord) pendant 24 h et 24 h supplémentaires.

NOTE 7 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.

9.4 Isolement et identification

9.4.1 À partir de la culture obtenue dans le milieu RV après 24 h d'incubation, ensemencer avec une anse (6.7) la surface d'une grande boîte de Petri (6.13) du premier milieu d'isolement sélectif (en général la gélose au rouge de phénol et au vert brillant, voir 5.2.4.1), 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 note 8).

Opérer de même avec le deuxième milieu d'isolement sélectif (5.2.4.2) en se servant d'une nouvelle anse, et de boîtes de Petri de dimensions appropriées.

NOTE 8 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 (6.7) 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.

9.4.2 À partir de la culture obtenue dans le milieu au sélénite-cystine après 24 h d'incubation, 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 une étuve (6.3) réglée à 35 °C ou à 37 °C (selon accord).

9.4.4 Après une durée totale d'incubation du milieu sélénite-cystine de 48 h (voir 9.3.2), répéter les opérations décrites en 9.4.2 et 9.4.3.

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*, incuber à nouveau les boîtes à 35 °C ou à 37 °C (selon accord), durant 18 h à 24 h.

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

NOTE 9 Il convient de soumettre toute colonie typique ou suspecte 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.

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

ISO 6579:1993
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3aaab8a8-4ec4-4b09-b0ff-1ae1a8dc9260/iso-6579-1993>

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 (5.2.5), préalablement séchées, de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

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

Utiliser des cultures pures pour les confirmations biochimiques et sérologiques.

9.5.2 Confirmations biochimiques

À l'aide d'un fil àensemencement,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 (5.2.6)

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

Incuber à 35 °C ou à 37 °C (selon accord) 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 inchangé:	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).

9.5.2.2 Gélose à l'urée (5.2.7)

Ensemencer en stries la pente de la gélose.

Incuber à 35 °C ou à 37 °C (selon accord) 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.

9.5.2.3 Milieu de décarboxylation à la L-lysine (5.2.8)

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

Incuber à 35 °C ou à 37 °C (selon accord) durant 24 h.

Une couleur violette après incubation indique une réaction positive.

Une couleur jaune indique une réaction négative.

9.5.2.4 Recherche de la β-galactosidase (5.2.9)

Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube contenant 0,25 ml de la solution saline (5.2.13).

Ajouter 1 goutte de toluène et agiter le tube.

Placer le tube dans le bain d'eau (6.6) réglé à 35 °C ou à 37 °C (selon accord) 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 dans le bain d'eau réglé à 35 °C ou à 37 °C (selon accord), 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 (5.2.9), suivre les instructions du fabricant.

9.5.2.5 Milieu pour la réaction de Voges-Proskauer (VP) (5.2.10)

Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube stérile contenant 0,2 ml du milieu VP (5.2.10.1).

Incuber à 35 °C ou à 37 °C (selon accord) durant 24 h.

Après incubation, ajouter deux gouttes de la solution de créatine (5.2.10.2), trois gouttes de la solution éthanolique de naphthol-1 (5.2.10.3) et, ensuite, deux gouttes de la solution d'hydroxyde de potassium (5.2.10.4), 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 (5.2.11)

Ensemencer un tube contenant 5 ml du milieu tryptone-tryptophane (5.2.11.1) avec la colonie suspecte.

Incuber à 35 °C ou à 37 °C (selon accord) durant 24 h.

Après incubation, ajouter 1 ml du réactif de Kovacs (5.2.11.2).

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 indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1

Essai ¹⁾	Réaction positive ou négative	Pourcentage d'ensemencements de <i>Salmonella</i> présentant la réaction ²⁾
Glucose, TSI (formation d'acide) (9.5.2.1)	+	100
Glucose, TSI (formation de gaz) (9.5.2.1)	+	91,9 ³⁾
Lactose, TSI (9.5.2.1)	-	99,2 ⁴⁾
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)	-	99
Décarboxylation à la lysine (9.5.2.3)	+	94,6 ⁵⁾
Réaction à la β-galactosidase (9.5.2.4)	-	98,5 ⁴⁾
Réaction de Voges-Proskauer (9.5.2.5)	-	100
Recherche de l'indole (9.5.2.6)	-	98,9

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

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

3) La *Salmonella typhi* est anaérogène.

4) 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 donnent une réaction β-galactosidase positive. Pour l'étude des souches, il peut être utile d'effectuer des essais biochimiques complémentaires.

5) *S. paratyphi* A est négatif.

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, 1 goutte de la solution saline (5.2.13).

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.

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» (5.3) 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 (5.3) 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 (5.2.12) avec une colonie pure non auto-agglutinable.

Incuber à 35 °C ou à 37 °C (selon accord) durant 18 h 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'antisérum «H» (5.3) 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 2 donne l'interprétation des essais de confirmation (9.5.2 et 9.5.3), effectués sur les colonies retenues (9.5.1).

Tableau 2

Réactions biochimiques	Auto-agglutination	Réactions sérologiques	Interprétation
Typiques	Non	Antigène «O», «Vi» ou «H» positives	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» positives	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 2) 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 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