

---

---

**Microbiologie des aliments — Méthode  
horizontale pour la recherche des  
*Salmonella* spp.**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the  
detection of Salmonella spp.*

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 6579:2002](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3efa-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002>



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 6579:2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3efa-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3efa-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002>

© ISO 2002

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax. + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.ch](mailto:copyright@iso.ch)  
Web [www.iso.ch](http://www.iso.ch)

Imprimé en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
Introduction .....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Termes et définitions</b> .....	2
4 <b>Principe</b> .....	2
4.1 <b>Généralités</b> .....	2
4.2 <b>Préenrichissement en milieu non sélectif liquide</b> .....	2
4.3 <b>Enrichissement en milieux sélectifs liquides</b> .....	2
4.4 <b>Isolement et identification</b> .....	2
4.5 <b>Confirmation</b> .....	3
5 <b>Milieux de culture, réactifs et sérum</b> .....	3
5.1 <b>Généralités</b> .....	3
5.2 <b>Milieux de culture et réactifs</b> .....	3
5.3 <b>Sérums</b> .....	4
6 <b>Appareillage et verrerie</b> .....	4
7 <b>Échantillonnage</b> .....	5
8 <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	5
9 <b>Mode opératoire (voir le schéma en annexe A)</b> .....	5
9.1 <b>Prise d'essai et suspension mère</b> .....	5
9.2 <b>Préenrichissement non sélectif</b> .....	6
9.3 <b>Enrichissement sélectif</b> .....	6
9.4 <b>Isolement et identification</b> .....	6
9.5 <b>Confirmation</b> .....	7
10 <b>Expression des résultats</b> .....	11
11 <b>Rapport d'essai</b> .....	11
12 <b>Assurance de la qualité</b> .....	11
<b>Annexe A (normative) Schéma du mode opératoire</b> .....	12
<b>Annexe B (normative) Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs</b> .....	14
<b>Annexe C (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires</b> .....	24
<b>Bibliographie</b> .....	27

## 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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente Norme internationale peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 6579 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette quatrième édition annule et remplace la troisième édition (ISO 6579:1993), qui a fait l'objet d'une révision technique.

[ISO 6579:2002](#)

Les annexes A et B constituent des éléments normatifs de la présente Norme internationale. L'annexe C est donnée uniquement à titre d'information.

## Introduction

En raison de la diversité des produits alimentaires, il est possible que cette méthode horizontale ne soit pas applicable dans tous ses détails à certains d'entre eux. Dans ce cas, des méthodes différentes, spécifiques à ces produits, pourront être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, tous les efforts doivent être faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible.

Lors du réexamen périodique de la présente Norme internationale, il sera tenu compte de toutes les évolutions intervenues depuis sa publication et, notamment, dans quelle mesure cette méthode horizontale aura été suivie ainsi que les raisons des dérogations dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation de toutes les méthodes d'essai ne peut être réalisée de façon immédiate; de ce fait, il peut déjà exister des Normes internationales et/ou nationales pour certains groupes de produits qui ne concordent pas avec cette méthode horizontale. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec les prescriptions de la présente Norme internationale et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 6579:2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3efa-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3efa-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 6579:2002

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3efa-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002>

# Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp.

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

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode horizontale de recherche des *Salmonella*, incluant *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi.

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;
- échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de produits alimentaires.

**AVERTISSEMENT** — Cette méthode peut ne pas permettre de retrouver toutes les *Salmonella* Typhi et Paratyphi.

[ISO 6579:2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3ef4-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3ef4-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002>

## 2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

ISO 6887-1, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*

ISO 8261, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les termes et définitions suivants s'appliquent.

#### 3.1

##### **Salmonella**

micro-organismes formant des colonies typiques ou moins 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 *Salmonella* (3.1), dans une quantité déterminée de produit, lorsque l'essai est exécuté selon la présente Norme internationale

### 4 Principe

#### 4.1 Généralités

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

NOTE 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 *Enterobacteriaceæ* 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* en nombre restreint ou les *Salmonella* ayant subi une altération.

#### 4.2 Préenrichissement en milieu non sélectif liquide

Ensemencement de la prise d'essai dans de l'eau peptonée tamponnée à température ambiante, puis incubation à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

Pour certains aliments, l'utilisation d'autres modalités de préenrichissement est nécessaire. Voir 9.1.2.

En cas de grandes quantités, il convient de chauffer l'eau peptonée tamponnée à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  avant l'ensemencement avec la prise d'essai.

#### 4.3 Enrichissement en milieux sélectifs liquides

Ensemencement du bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS) et d'un bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (MKTTn) avec la culture obtenue en 4.2.

Incubation du bouillon RVS à  $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  et du bouillon MKTTn à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ .

#### 4.4 Isolement et identification

À partir des cultures obtenues en 4.3, ensemencement de deux milieux sélectifs solides:

- gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD);
- un autre milieu sélectif solide approprié, laissé au choix du laboratoire, complémentaire du milieu gélose XLD, permettant la recherche de *Salmonella* lactose positive, incluant *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi.



Incubation du milieu gélose XLD à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  puis examen après  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ . Incubation du second milieu sélectif selon les recommandations du fabricant.

NOTE Pour information, la gélose au vert brillant (BGA: brilliant green agar), la gélose au sulfite de bismuth, etc., pourraient être utilisées comme second milieu d'isolement.

#### 4.5 Confirmation

Repiquage des colonies présumées de *Salmonella* isolées en 4.4, 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 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 B.1.

ITEH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

##### 5.2.2 Premier milieu d'enrichissement sélectif: bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS)

Voir B.2.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3ef4-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002>

##### 5.2.3 Deuxième milieu d'enrichissement sélectif: bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (bouillon MKTTn)

Voir B.3.

#### 5.2.4 Milieux d'isolement sélectifs solides

##### 5.2.4.1 Premier milieu: gélose au xylose lysine désoxycholate (gélose XLD)

Voir B.4.

##### 5.2.4.2 Deuxième milieu

Le choix du deuxième milieu est laissé à l'initiative du laboratoire d'essais. Il convient de suivre scrupuleusement les instructions du fabricant quant à sa préparation.

##### 5.2.5 Gélose nutritive

Voir B.5.

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

Voir B.6.

**5.2.7 Gélose à l'urée (Christensen)**

Voir B.7.

**5.2.8 Milieu pour décarboxylation de la L-lysine**

Voir B.8.

**5.2.9 Réactif pour la recherche de la  $\beta$ -galactosidase** (ou disques de papier tout préparés utilisés selon les instructions du fabricant)

Voir B.9.

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

Voir B.10.

**5.2.11 Réactifs pour la recherche de l'indole**

Voir B.11.

**5.2.12 Gélose nutritive semi-solide**

Voir B.12.

**5.2.13 Solution saline physiologique (standards.iteh.ai)**

Voir B.13.

iTeh STANDARD PREVIEW

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3ef4-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002>

**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 antisérums contenant un ou plusieurs groupes «O» (dénommés antisérums «O» monovalents ou polyvalents), des antisérums Vi et des antisérums contenant des anticorps contre un ou plusieurs facteurs «H» (dénommés antisérums «H» monovalents ou polyvalents).

Il convient de faire tous les efforts afin de s'assurer que les antisérums utilisés conviennent pour la recherche de tous les sérotypes de *Salmonella*. Dans ce but, on pourra se servir d'antisérums préparés par un fournisseur dont la compétence est reconnue (par exemple, par un organisme gouvernemental approprié).

**6 Appareillage et verrerie**

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 (voir l'ISO 7218) 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 °C et 55 °C.**

**6.3 Étuve, réglable à 37 °C ± 1 °C.**

**6.4 Bain d'eau, réglable à 41,5 °C ± 1 °C, ou étuve, réglable à 41,5 °C ± 1 °C.**

**6.5 Bains d'eau**, réglables de 44 °C à 47 °C.

**6.6 Bain d'eau**, réglable à 37 °C ± 1 °C.

Il est recommandé d'utiliser des bains d'eau (6.4, 6.5 et 6.6) contenant un agent antibactérien, la dose infectante de *Salmonella* étant faible.

**6.7 Anses bouclées**, d'environ 3 mm de diamètre ou 10 µl, ou **pipettes stériles**.

**6.8 pH-mètre**, ayant une précision de réglage de ± 0,1 unité de pH de 20 °C à 25 °C.

**6.9 Tubes à essai**, ou **flacons**, de capacité appropriée.

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

**6.10 Pipettes graduées** ou **pipettes automatiques**, de 10 ml et 1 ml de capacités nominales, graduées respectivement en divisions de 0,5 ml et 0,1 ml.

**6.11 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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32941500-3ef4-43c1-a1b8-57730b20497b/iso-6579-2002>

## 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, 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 Généralités

Voir l'ISO 6887-1 et la Norme internationale concernant le produit à examiner. Pour le lait et les produits laitiers, voir l'ISO 8261.

Pour la préparation de la suspension mère, utiliser dans le cas général comme diluant le milieu de préenrichissement spécifié en 5.2.1 et 4.2 (eau peptonée tamponnée).

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

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 alimentaire en particulier, les prises

d'essai peuvent être mélangées. Par exemple, si l'on doit examiner 10 prises d'essai de 25 g, il est possible de combiner ces 10 unités afin d'obtenir une prise d'essai composite de 250 g et ajouter 2,25 l de bouillon de préenrichissement; ou bien encore réunir les portions de 0,1 ml (dans 10 ml de bouillon RVS) et de 1 ml (dans 10 ml de bouillon MKTTn) des bouillons de préenrichissement provenant des 10 prises d'essai séparées (voir 9.3.1) pour en enrichir 100 ml des milieux d'enrichissement sélectif.

### 9.1.2 Préparations spécifiques de la suspension mère pour certains aliments

NOTE Les préparations spécifiques suivantes ne concernent que les *Salmonella*. Les préparations spécifiques applicables à tous micro-organismes sont décrites dans l'ISO 6887-2, l'ISO 6887-3, l'ISO 6887-4 et l'ISO 8261.

#### 9.1.2.1 Cacao et produits contenant du cacao (par exemple, plus de 20 %)

Ajouter à l'eau peptonée tamponnée (5.2.1) de préférence 50 g/l de caséine (éviter l'emploi de caséine acide), ou bien 100 g/l de lait écrémé en poudre, et ajouter, après environ 2 h d'incubation, 0,018 g/l de vert brillant, s'il est probable que le produit soit fortement contaminé par des flores Gram positif.

#### 9.1.2.2 Aliments acides et acidifiants

S'assurer que la valeur du pH ne descende pas au-dessous de 4,5 pendant le préenrichissement.

NOTE Le pH d'aliments acides et acidifiants est plus stable quand de l'eau peptonée tamponnée à double titre est utilisée.

## 9.2 Préenrichissement non sélectif

Incuber la suspension mère (9.1) à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

## 9.3 Enrichissement sélectif

ISO 6579:2002

9.3.1 Transférer 0,1 ml de la culture obtenue en 9.2 dans un tube contenant 10 ml de bouillon RVS (5.2.2); transférer 1 ml de la culture obtenue en 9.2 dans un tube contenant 10 ml de bouillon MKTTn (5.2.3).

9.3.2 Incuber le bouillon RVSensemencé (9.3.1) à  $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  et le bouillon MKTTn à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ . Il convient de s'assurer que la température maximale d'incubation ( $42,5\text{ °C}$ ) ne soit dépassée à aucun moment.

## 9.4 Isolement et identification

9.4.1 À partir de la culture obtenue dans le bouillon RVS (9.3.2), après  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  d'incubation, ensemercer avec une anse (6.7) la surface d'une grande boîte de Petri (6.11) contenant le premier milieu d'isolement sélectif (gélose XLD, 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.

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.

9.4.2 À partir de la culture obtenue dans le bouillon MKTTn (9.3.2), après  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  d'incubation, répéter les opérations décrites en 9.4.1 avec les deux milieux d'isolement sélectifs.

9.4.3 Dans le cas du premier milieu d'isolement (5.2.4.1), retourner les boîtes (9.4.1 et 9.4.2), les placer dans une étuve (6.3) réglée à  $37\text{ °C}$ . Pour le second milieu d'isolement (5.2.4.2), suivre les recommandations du fabricant.

9.4.4 Après  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  d'incubation, examiner les boîtes (9.4.3) afin de rechercher la présence de colonies typiques de *Salmonella*, ainsi que les colonies atypiques susceptibles d'être des *Salmonella* (voir note). Marquer leur position sur le dessous de la boîte.