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

AMENDEMENT 1: Annexe D: Recherche
des *Salmonella* spp. dans les matières
fécales des animaux et dans des
échantillons environnementaux au stade de
la production primaire

<https://standards.iteh.org/standards/5b53b11d-1000-4000-9000-000000000000>
ISO 6579:2002/Amd 1:2007

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

*AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal
faeces and in environmental samples from the primary production stage*



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/Amd 1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43de-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43de-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2007

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.org
Web www.iso.org

Publié 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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

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 du présent document 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'Amendement 1 à l'ISO 6579:2002 a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*. (standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43de-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6579:2002/Amd 1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43de-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43de-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007>

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

AMENDEMENT 1: Annexe D: Recherche des *Salmonella* spp. dans les matières fécales des animaux et dans des échantillons environnementaux au stade de la production primaire

Page 1, Article 2

Remplacer le texte d'introduction par ce qui suit et ajouter les deux références suivantes.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

[ISO 6579:2002/Amd 1:2007](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43da-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007)

ISO/TS 11133-2:2003, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

Page 27, après l'Annexe C

Ajouter ce qui suit en temps qu'Annexe D.

Annexe D (normative)

Recherche des *Salmonella* spp. dans les matières fécales animales et dans les échantillons environnementaux au stade de la production primaire

D.1 Introduction

La méthode donnée dans le texte principal de la présente Norme internationale est conçue principalement pour la recherche des *Salmonella* spp. dans les produits pour l'alimentation humaine et animale et n'est pas toujours adaptée à la recherche des *Salmonella* spp. dans d'autres matrices.

La présente annexe s'applique à la recherche des *Salmonella* spp. dans

- les matières fécales d'animaux (volailles, porcs, bovins, par exemple), et
- les échantillons environnementaux au stade de la production primaire (poussière, par exemple).

La méthode spécifiée dans la présente annexe est fondée sur l'Article 9, mais avec un milieu d'enrichissement sélectif différent. Par conséquent, chaque fois que cela est possible, référence est faite au texte de l'Article 9.

Le milieu d'enrichissement sélectif décrit dans la présente annexe [bouillon Rappaport-Vassiliadis semi-solide (MSRV) modifié] est conçu pour la recherche des Salmonelles mobiles et n'est pas adapté à la recherche des Salmonelles immobiles.

[ISO 6579:2002/Amd.1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standard/sist/a2a9615-188b-43d0-ab79-573b79810181/iso-6579-2002-amd-1-2007)

NOTE Il semble que les biovars de *Salmonella* immobile, *Salmonella* Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum biovar gallinarum et *Salmonella* Gallinarum biovar pullorum), ne survivent pas longtemps dans les échantillons environnementaux, ils sont par conséquent rarement détectés dans les échantillons de fèces ou environnementaux (poussière, par exemple) et cela quelle que soit la méthode. Il semble que le nombre des autres sérovars de *Salmonella* immobiles soit généralement faible dans les échantillons de fèces. Par exemple, dans la Référence [7], environ 1 000 échantillons de fèces de poules pondeuses et environ 900 de poulets de chair ont été analysés, moins de 1 % du nombre total d'échantillons étaient positifs en bouillon de culture sélectif et négatifs en MSRV (donc susceptibles d'être immobiles). Une étude hollandaise menée sur environ 3 200 échantillons de fèces de porcs a fourni des résultats similaires (données non publiées). D'autre part, dans l'étude de la Référence [7], au moins 40 % des échantillons positifs n'auraient pas été détectés («faux négatifs») si un bouillon de culture sélectif avait uniquement été utilisé (dans ce cas, le bouillon Rappaport-Vassiliadis) à la place d'un milieu semi-solide.

D.2 Principe

D.2.1 Généralités

La recherche des *Salmonella* dans les matières fécales animales et dans les échantillons du stade de la production primaire nécessite quatre phases, comme décrit dans l'Article 4.

D.2.2 Préenrichissement en milieu non sélectif liquide

Ensemencer l'eau peptonée tamponnée (EPT) à température ambiante avec la prise d'essai, puis incubé à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

D.2.3 Enrichissement en milieu sélectif semi-solide

Ensemencer les boîtes de gélose semi-solide de Rappaport-Vassiliadis modifié (MSRV) avec la culture obtenue en D.2.2.

Incuber la boîte de MSRV à $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Si une boîte s'avère négative après 24 h, l'incuber pendant $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ supplémentaires.

D.2.4 Isolement et identification

À partir de la culture obtenue en D.2.3, ensemercer deux milieux sélectifs solides:

- gélose au xylose à la lysine et au désoxycholate (gélose XLD);
- un autre milieu solide sélectif complémentaire de la gélose XLD (voir en 4.4).

Incuber la gélose XLD à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et l'examiner après $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Incuber le second milieu selon les instructions du fabricant.

D.2.5 Confirmation

Repiquage des colonies présumées être des *Salmonella* isolées en D.2.4 et confirmation au moyen des essais biochimiques et sérologiques appropriés.

D.3 Milieux de culture, réactifs et sérums

D.3.1 Généralités

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

Tous les milieux et réactifs nécessaires à la présente annexe sont décrits dans l'Annexe B, à l'exception du milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis modifié (milieu MSRV) qui est décrit en D.3.2. Des milieux complets déshydratés ou des diluants peuvent également être utilisés. Dans ce cas, suivre les instructions du fabricant.

NOTE Le milieu MSRV tel qu'il est décrit dans la Référence [8] se compose de 20 mg/l de novobiocine. Cependant, d'un point de vue scientifique, une teneur en novobiocine de 10 mg/l est préférable. Les études menées au laboratoire communautaire de référence-*Salmonella* ont montré qu'un nombre plus important d'échantillons de fèces de porcs étaient positifs en utilisant un milieu MSRV ne contenant que 10 mg/l de novobiocine, qu'en utilisant un milieu MSRV contenant 20 mg/l (voir Référence [9]). De plus, dans les essais sur les matières fécales de différents animaux (porcs, volailles, bovins) et sur la poussière naturellement contaminée, les zones de migration en milieu MSRV contenant 10 mg/l de novobiocine étaient plus importantes que celles en milieu MSRV en contenant 20 mg/l (Référence [9]). L'influence de la novobiocine sur la mobilité bactérienne a été précédemment décrite dans la Référence [10].

Pour la préparation des milieux gélosés sélectifs (voir en B.4, la gélose XLD), des boîtes de Petri de dimensions standards (90 mm ou 100 mm) peuvent être utilisées, à la place des boîtes de Petri de grandes dimensions (140 mm).

D.3.2 Milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis modifié (MSRV)

D.3.2.1 Milieu de base

D.3.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux	4,6	g
Hydrolysate acide de caséine	4,6	g
Chlorure de sodium (NaCl)	7,3	g
Phosphate monopotassique (KH ₂ PO ₄)	1,5	g
Chlorure de magnésium anhydre (MgCl ₂)	10,9	g
Oxalate de vert de malachite	0,04	g
Agar-agar	2,7	g
Eau	1 000	ml

D.3.2.1.2 Préparation

Mettre en suspension les ingrédients dans l'eau.

Porter à ébullition en mélangeant. **Ne pas autoclaver.**

Ne pas maintenir le milieu à des températures élevées plus longtemps que nécessaire.

Laisser refroidir le milieu à une température de 47 °C à 50 °C.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43de-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007>

D.3.2.2 Solution de novobiocine

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43de-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007>

D.3.2.2.1 Composition

Sel monodosique de novobiocine	0,05	g
Eau	10	ml

D.3.2.2.2 Préparation

Dissoudre le sel monodosique de novobiocine dans l'eau.

Stériliser par filtration à l'aide d'un filtre de 0,22 µm.

La solution ainsi obtenue peut être conservée à 5 °C ± 3 °C pendant 4 semaines ou à -20 °C en petites quantités (par exemple 2 ml) pendant une année.

D.3.2.3 Milieu complet

D.3.2.3.1 Composition

Milieu de base (D.3.2.1)	1 000	ml
Solution de novobiocine (D.3.2.2)	2	ml

D.3.2.3.2 Préparation

Ajouter aseptiquement 2 ml de solution de novobiocine (D.3.2.2) à 1 000 ml de milieu de base (D.3.2.1) à une température de 47 °C à 50 °C. Mélanger soigneusement.

Le pH final doit être égal à 5,2 (de 5,1 à 5,4) de 20 °C à 25 °C.

Verser un volume de 15 ml à 20 ml dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre.

Laisser le milieu se solidifier avant tout déplacement et manipuler avec soin.

Conserver les boîtes **surface de la gélose vers le haut** pendant une durée maximale de 2 semaines à 5 °C ± 3 °C et dans l'obscurité.

Ne pas retourner les boîtes, la gélose semi-solide étant trop molle pour le permettre.

Les boîtes dont la gélose semi-solide s'est liquéfiée ou morcelée ne doivent pas être utilisées.

Immédiatement avant utilisation et uniquement si nécessaire, sécher soigneusement la surface des boîtes de gélose, par exemple en les plaçant, **surface de la gélose vers le haut**, dans une hotte à flux d'air laminaire. Veiller à ne pas dessécher le milieu.

D.4 Appareillage et verrerie

Utiliser l'appareillage de l'Article 6 et ce qui suit.

D.4.1 Anses stériles, de 1 µl

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

D.5 Échantillonnage

[ISO 6579:2002/Amd 1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43de-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a2a86b15-b88b-43de-ab79-5b53b70810d8/iso-6579-2002-amd-1-2007>

Voir Article 7.

D.6 Préparation des échantillons pour essai

Voir Article 8.

Généralement, la prise d'essai est ajoutée à l'eau peptonée tamponnée de manière à obtenir une dilution au 1/10 (par exemple une quantité de 25 g d'échantillon est ajoutée à 225 ml d'eau peptonée tamponnée). Néanmoins, pour certains types échantillons, il peut être nécessaire d'utiliser un rapport de dilution différent.

D.7 Mode opératoire

D.7.1 Préenrichissement non sélectif

Préchauffer l'eau peptonée tamponnée à température ambiante.

Bien mélanger les échantillons à l'aide du moyen le plus adapté au type d'échantillon.

Peser l'échantillon et y ajouter la quantité requise d'eau peptonée tamponnée (voir en D.6). Incuber les récipients à 37 °C ± 1 °C pendant 18 h ± 2 h.