
**Qualité de l'eau — Recherche
de *Salmonella* spp.**

Water quality — Detection of Salmonella spp.

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

ISO 19250:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010>



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 19250:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2010

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

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
4.1 Généralités	2
4.2 Préenrichissement sur milieu non sélectif liquide	2
4.3 Enrichissement sur milieux sélectifs liquides	3
4.4 Isolement et identification	3
4.5 Confirmation	3
5 Appareillage	3
6 Échantillonnage	4
7 Milieux de culture et réactifs	4
8 Mode opératoire	5
8.1 Préparation de l'échantillon	5
8.2 Préenrichissement non sélectif	5
8.3 Enrichissement sélectif	6
8.4 Isolement	6
8.5 Confirmation	6
9 Expression des résultats	9
10 Rapport d'essai	9
Annexe A (normative) Logigramme du mode opératoire	11
Annexe B (normative) Composition et préparation des milieux de culture et réactifs	12
Annexe C (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires	19
Bibliographie	24

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'ISO 19250 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Cette édition annule et remplace l'ISO 6340:1995, qui a fait l'objet d'une révision technique.

[ISO 19250:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010>

Introduction

Les *Salmonella* sont des bactéries qui sont largement répandues à travers le monde. Elles sont, en général, considérées comme pathogènes bien que leur virulence et leur pouvoir pathogène varient énormément. Les hôtes naturels des *Salmonella* sont la population humaine, le bétail, les animaux domestiques, ainsi que les animaux sauvages, y compris les oiseaux. Êtres humains et animaux peuvent excréter des *Salmonella* tout en étant des porteurs asymptomatiques, de même qu'en cas de maladie. Par conséquent, il est impossible de les éliminer de l'environnement. Par infection des êtres humains, la transmission des *Salmonella* peut causer de graves maladies.

Dans la mesure où l'eau est un vecteur d'infection reconnu, la présence ou l'absence de *Salmonella* est contrôlée dans l'eau lorsque l'on considère qu'il existe un risque d'infection. Les *Salmonella* peuvent être présentes dans les eaux usées agricoles et domestiques, les eaux douces, y compris les eaux destinées à la consommation humaine et les eaux souterraines, ainsi que dans les eaux de mer.

La recherche de *Salmonella* dans l'eau requiert habituellement une étape de concentration. Dans la mesure où les *Salmonella* peuvent être présentes en faible nombre et avoir subi une altération dans l'environnement aqueux, leur recherche dans l'eau nécessite habituellement une étape de préenrichissement.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 19250:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19250:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618be/iso-19250-2010>

Qualité de l'eau — Recherche de *Salmonella* spp.

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel d'effectuer les essais de recherche de *Salmonella*, et plus particulièrement de *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi (*Salmonella* ser. Typhi) et *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Paratyphi (*Salmonella* ser. Paratyphi), uniquement dans des laboratoires correctement équipés, sous la direction d'un microbiologiste compétent, et de faire très attention à l'élimination de toutes les substances incubées.

Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais réalisés conformément à la présente Norme internationale soient exécutés par un personnel ayant reçu une formation adéquate.

1 Domaine d'application

La présente Norme Internationale spécifie une méthode pour la recherche de *Salmonella* spp. (présomptives ou confirmées) dans des échantillons d'eau. À des fins épidémiologiques ou au cours d'enquêtes sur des épidémies, il peut être nécessaire d'utiliser d'autres milieux.

AVERTISSEMENT — Il est possible que cette méthode ne retrouve pas toutes les *Salmonella* ser. Typhi et ser. Paratyphi.

NOTE Pour une approche semi-quantitative, la technique du nombre le plus probable (NPP) peut être mise en œuvre en utilisant des volumes appropriés de l'échantillon. Dans ces cas, le volume d'eau peptonée tamponnée est ajusté en conséquence.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont utiles 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 6579:2002, *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella spp.*

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 — Exigences générales et recommandations*

ISO 7704, *Qualité de l'eau — Évaluation des membranes filtrantes utilisées pour des analyses microbiologiques*

ISO 8199, *Qualité de l'eau — Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture*

ISO 19458, *Qualité de l'eau — Échantillonnage pour analyse microbiologique*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1
Salmonella spp. présomptives
bactéries se développant dans le milieu d'enrichissement sélectif spécifié et formant des colonies typiques ou atypiques sur les milieux sélectifs solides

3.2
Salmonella spp. confirmées
bactéries se développant dans le milieu d'enrichissement sélectif spécifié et formant des colonies typiques et suspectes sur les milieux sélectifs solides et qui présentent des caractéristiques biochimiques et sérologiques spécifiques

NOTE Les caractéristiques biochimiques et sérologiques sont déterminées par des essais spécifiés dans la présente Norme Internationale.

3.3
recherche de Salmonella
mise en évidence de la présence ou de l'absence de **Salmonella** (3.4)

3.4
Salmonella spp.
Salmonella
micro-organismes formant des colonies typiques ou atypiques sur des milieux sélectifs solides et présentant des caractéristiques biochimiques et sérologiques spécifiques

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

4 Principe

ISO 19250:2010
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e9ecbb4-c0f8-47b6-9387-23202db618bc/iso-19250-2010>

4.1 Généralités

La recherche de *Salmonella* nécessite quatre phases successives (voir également l'Annexe A).

Un préenrichissement est souvent nécessaire pour permettre la recherche de *Salmonella* en nombre relativement faible ou de *Salmonella* ayant subi une altération. Certaines *Salmonella* et celles ayant subi un dommage sublétalement peuvent nécessiter une période d'incubation supplémentaire (4.3). Par ailleurs, des *Salmonella* peuvent être présentes en petit nombre et sont souvent accompagnées d'autres membres de la famille des Enterobacteriaceae ou d'autres familles, en nombre largement plus important. Un enrichissement sélectif est donc nécessaire.

4.2 Préenrichissement sur milieu non sélectif liquide

L'eau peptonée tamponnée (B.1) estensemencée à température ambiante avec un volume connu de l'échantillon ou de ses dilutions, puis incubée à (36 ± 2) °C pendant (18 ± 2) h. Des volumes plus importants peuvent être concentrés par filtration sur membrane, après quoi la membrane filtrante est transférée dans l'eau peptonée tamponnée.

NOTE Pour les eaux usées, il a été démontré que des périodes d'incubation plus courtes ou des ensemencements directs de l'échantillon dans le milieu sélectif (4.3) donnent de meilleurs résultats.

Pour une approche semi-quantitative, la technique du NPP peut être mise en œuvre en utilisant des volumes appropriés de l'échantillon. Dans ces cas, ajuster les volumes d'eau peptonée tamponnée en conséquence.

4.3 Enrichissement sur milieux sélectifs liquides

Un milieu Rappaport-Vassiliadis au soja (bouillon RVS) et un bouillon Muller-Kauffmann tétrathionate-novobiocine (MKTTn) sont ensemencés avec la culture obtenue en 4.2.

Le bouillon RVS est incubé à $(41,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$ pendant (24 ± 3) h et le bouillon MKTTn à $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ pendant (24 ± 3) h.

Pour détecter les *Salmonella* spp. à croissance lente, incuber le bouillon d'enrichissement pendant (24 ± 3) h supplémentaires pour une période d'incubation totale de (48 ± 4) h à $(41,5 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

NOTE Les *Salmonella* Typhi et les *Salmonella* Paratyphi A ne sont généralement pas importantes pour le contrôle de routine de la qualité de l'eau, mais peuvent être pertinentes pour des enquêtes épidémiologiques. Le bouillon MKTTn est utilisé pour enrichissement avec une incubation à $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ pendant une période maximale de (24 ± 3) h et récupère la plupart des souches de *Salmonella*, y compris certaines souches de *Salmonella* Paratyphi, mais il n'est pas considéré comme apte à récupérer les souches de *Salmonella* Paratyphi C. Le bouillon MKTTn n'est pas utilisé lorsque la présence de *Salmonella* Typhi est suspectée après l'utilisation d'un bouillon sélénite cystine.

4.4 Isolement et identification

À partir des cultures obtenues en 4.3, deux milieux sélectifs solides sont ensemencés:

- a) gélose lysine xylose désoxycholate (gélose XLD);
- b) tout autre milieu sélectif solide en complément de la gélose XLD et, s'il y a lieu, approprié à l'isolement de souches de *Salmonella* lactose positives, de *Salmonella* Typhi et de *Salmonella* Paratyphi — le laboratoire peut choisir le milieu à utiliser.

Incuber la gélose XLD à $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ et examiner après (24 ± 3) h afin de détecter la présence de colonies considérées comme *Salmonella* présomptives. Incuber le deuxième milieu de gélose sélectif conformément aux recommandations du fabricant.

NOTE À titre informatif, il est possible d'utiliser de la gélose au vert brillant (BGA), de la gélose au sulfite de bismuth, etc., comme deuxième milieu d'isolement.

4.5 Confirmation

Repiquer les colonies de *Salmonella* présomptives, puis isoler comme décrit en 4.4 et confirmer leur identité en effectuant des essais biochimiques (8.5.3) et sérologiques (8.5.4) appropriés.

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218), et en particulier, ce qui suit.

5.1 Généralités. Sauf pour la verrerie à usage unique qui est livrée stérile, stériliser la verrerie comme spécifié dans l'ISO 8199. L'appareillage à usage unique est une solution acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, s'il répond à des spécifications appropriées.

5.2 Autoclave, pouvant être maintenu à $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ et à $(115 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

5.3 Bain d'eau ou incubateur, pouvant être maintenu à $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

5.4 Bain d'eau ou incubateur, pouvant être maintenu à $(41,5 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

5.5 Bains d'eau, pouvant fonctionner à $(70 \pm 1) ^\circ\text{C}$ et de $50 ^\circ\text{C}$ à $55 ^\circ\text{C}$.

5.6 Appareil de filtration sur membrane, comme spécifié dans l'ISO 8199.

5.7 Membranes filtrantes stériles, avec un diamètre de pore nominal de 0,45 µm.

La qualité des membranes filtrantes peut varier en fonction de la marque et parfois même du lot. Il est donc recommandé de vérifier régulièrement la qualité de ces membranes, comme spécifié dans l'ISO 7704.

5.8 pH-mètre, avec une exactitude d'étalonnage de $\pm 0,1$ unité pH entre 20 °C et 25 °C.

5.9 Pincés stériles.

5.10 Anses stériles, diamètre d'environ 3 mm (volume de 10 µl) et aiguille ou fil d'ensemencement.

6 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Il convient que les échantillons soient prélevés conformément à l'ISO 19458.

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

7 Milieux de culture et réactifs

NOTE Pour connaître les lignes directrices relatives à l'assurance qualité et aux essais de performance, voir l'ISO/TS 11133-1^[2] et l'ISO/TS 11133-2^[3].

7.1 Substances de base. Dans un souci d'uniformité des résultats, utiliser soit des milieux complets déshydratés, soit des composants de qualité uniforme et des réactifs de qualité analytique reconnue, pour la préparation du milieu.

Des réactifs d'autres qualités peuvent être utilisés à condition qu'il ait été démontré qu'il donnent les mêmes résultats.

7.2 Eau, ISO 3696^[1], qualité 3.

7.3 Milieux de culture, préparés conformément à l'Annexe B.

7.3.1 Eau peptonée tamponnée, milieu de préenrichissement non sélectif (EPT, B.1).

7.3.2 Bouillon Rappaport-Vassiliadis au soja (bouillon RVS, B.2), milieu d'enrichissement sélectif.

7.3.3 Gélose lysine xylose désoxycholate (gélose XLD, B.3).

7.3.4 Deuxième milieu d'isolement sélectif solide, dont le choix est laissé à la discrétion du laboratoire d'essai. Suivre scrupuleusement les instructions du fabricant concernant la préparation pour utilisation.

7.3.5 Gélose nutritive (B.4), ou autre gélose non sélective appropriée.

7.3.6 Gélose ferrique aux trois sucres (gélose TSI, B.5).

De la gélose ferrique aux deux sucres peut être utilisée en variante.

7.3.7 Gélose à l'urée, Christensen (B.6).

7.3.8 Milieu de décarboxylation de la L-lysine (B.7).

7.3.9 Bouillon sélénite cystine (B.8).

7.3.10 Bouillon Muller-Kauffmann tétrathionate-novobiocine (MKTTn, B.9).

7.3.11 Adjuvant de filtration (B.10).

8 Mode opératoire

Voir la Figure A.1.

8.1 Préparation de l'échantillon

Pour la préparation de l'échantillon, la filtration et l'ensemencement sur les milieux d'isolement, suivre les instructions comme spécifié dans l'ISO 8199 et l'ISO 6887-1. Il est préférable de commencer l'examen immédiatement après avoir prélevé les échantillons. Si les échantillons sont conservés à température ambiante, commencer l'examen dans les 12 h suivant l'échantillonnage. Dans des cas exceptionnels, il est permis de conserver les échantillons à (5 ± 3) °C pendant une durée maximale de 24 h avant l'examen.

Le volume de l'échantillon à analyser dépend du type d'eau. Les volumes habituels pour l'eau de baignade et l'eau potable se situent entre 1 000 ml et 5 000 ml. Pour les eaux de surface polluées et les eaux usées, l'analyse se fait généralement sur des volumes inférieurs.

Si des dilutions de l'échantillon sont nécessaires (par exemple pour des échantillons d'eaux usées), préparer ces dilutions comme spécifié dans l'ISO 8199.

8.2 Préenrichissement non sélectif

8.2.1 Préenrichissement non sélectif pour des volumes inférieurs à 10 ml

Ensemencer 50 ml d'EPT (B.1) à température ambiante avec l'échantillon ou ses dilutions et incubé à (36 ± 2) °C pendant (18 ± 2) h.

8.2.2 Préenrichissement non sélectif pour des volumes supérieurs à 10 ml

Filtrer un volume d'eau approprié pour l'eau examinée.

Immerger la membrane filtrante dans 50 ml d'EPT (B.1).

Il est également possible d'ajouter l'échantillon au même volume d'EPT de concentration double.

Il faut toutefois noter que cette procédure n'est pas adaptée aux eaux minérales à forte teneur en sel, ni aux eaux de mer.

Incuber les cultures à (36 ± 2) °C pendant (18 ± 2) h.

8.2.3 Recommandation pour les eaux turbides ou polluées

Pour les eaux turbides ou polluées, un adjuvant de filtration stérile (B.10) peut être ajouté et l'échantillon être filtré à travers un tampon absorbant stérile agissant comme support au lieu d'utiliser la membrane.

Dans ce cas, filtrer une aliquote de l'adjuvant de filtration, généralement 15 ml, pour former une première couche sur le tampon absorbant. Mélanger une deuxième aliquote, généralement 15 ml, avec le volume de l'échantillon et filtrer. Pour les eaux turbides ou sales, des aliquotes supplémentaires peuvent être filtrées. Une fois la filtration terminée, enlever l'entonnoir et transférer avec précaution le tampon absorbant et l'adjuvant de filtration dans l'EPT (B.1). Si nécessaire, conserver un petit volume d'EPT pour rincer l'entonnoir de manière à obtenir un volume final d'EPT de 100 ml. Incuber en vue de détecter une présence ou absence ou procéder à une répartition selon une série de NPP pour obtenir un résultat semi-quantitatif.

8.3 Enrichissement sélectif

Laisser le (les) bouillon(s) d'enrichissement s'équilibrer à température ambiante s'il(s) étai(en)t conservé(s) à une température inférieure. Transférer 0,1 ml de la culture obtenue en 8.2 dans un tube contenant 10 ml de bouillon RVS (B.2). Lorsqu'un bouillon MKTTn (B.9) est également utilisé, transférer 1 ml de la culture obtenue en 8.2 dans un tube contenant 10 ml de bouillon MKTTn.

Incuber le bouillon RVS ensemencé à $(41,5 \pm 1,0)$ °C pendant (24 ± 3) h et, si nécessaire (voir 4.3), pendant (48 ± 4) h. Il convient de s'assurer que la température d'incubation maximale tolérée ($42,5$ °C) n'est pas dépassée. Incuber le bouillon MKTTn ensemencé à (36 ± 2) °C pendant (24 ± 3) h.

NOTE Pour le bouillon RVS, la concentration en chlorure de magnésium et la température d'incubation ont été optimisées afin d'assurer un bon rendement sans perte de sélectivité conformément à la Référence [5].

8.4 Isolement

8.4.1 Généralités

Laisser les boîtes de gélose XLD et le deuxième milieu d'isolement sélectif (voir l'ISO 6579:2002, 5.2.4.2) s'équilibrer à température ambiante s'ils étaient conservés à une température inférieure. Si nécessaire, sécher la surface des boîtes avant utilisation.

8.4.2 Isolement à partir du bouillon RVS

À l'aide de la culture obtenue dans le bouillon RVS, ensemencer la surface des milieux d'enrichissement suivants après incubation pendant (24 ± 3) h et, si nécessaire (voir 4.3), pendant (48 ± 4) h, à l'aide d'une anse stérile (5.10), de manière à obtenir des colonies bien isolées:

- a) gélose XLD (B.3);
- b) un milieu sélectif supplémentaire (7.3.4).

Retourner les boîtes de manière que la partie inférieure se retrouve en position supérieure et les placer dans l'incubateur (5.3) à une température de (36 ± 2) °C pendant (24 ± 3) h pour la gélose XLD. Les instructions du fabricant doivent être suivies pour le deuxième milieu d'isolement sélectif.

8.4.3 Isolement à partir du bouillon MKTTn

Après incubation à (36 ± 2) °C pendant (24 ± 3) h à l'aide de la culture obtenue, répéter le mode opératoire spécifié en 8.4.2 avec les deux milieux d'isolement sélectifs.

8.5 Confirmation

8.5.1 Généralités

S'ils sont identifiés comme étant fiables, des kits d'identification disponibles dans le commerce peuvent être utilisés pour l'examen biochimique des *Salmonella*. Utiliser ces kits conformément aux instructions du fabricant.