

---

---

**Microbiologie de la chaîne  
alimentaire — Méthode horizontale  
pour la recherche, le  
dénombrement et le sérotypage des  
*Salmonella* —**

**Partie 1:  
Recherche des *Salmonella* spp.  
(standards.iteh.ai)**

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the  
detection, enumeration and serotyping of Salmonella —*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0c484a-01c8-4d1f-ae5-167d9fc52e07/iso-6579-1-2017>  
**Part 1: Detection of *Salmonella* spp.**



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

ISO 6579-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6cce484a-0ac8-4d1f-ae5f-167d9fc52e07/iso-6579-1-2017>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
copyright@iso.org  
www.iso.org

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>v</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>vii</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
4.1 Généralités.....	2
4.2 Préenrichissement en milieu non sélectif liquide.....	2
4.3 Enrichissement en milieux sélectifs.....	2
4.4 Isolement sur des milieux solides sélectifs.....	3
4.5 Confirmation.....	3
<b>5</b> <b>Milieux de culture, réactifs et sérums</b> .....	<b>3</b>
<b>6</b> <b>Matériels et consommables</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>4</b>
<b>8</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>4</b>
<b>9</b> <b>Mode opératoire (voir les schémas en <a href="#">Annexe A</a>)</b> .....	<b>4</b>
9.1 Prise d'essai et suspension mère.....	4
9.2 Préenrichissement non sélectif.....	5
9.3 Enrichissement sélectif.....	5
9.3.1 Généralités.....	5
9.3.2 Mode opératoire pour les échantillons d'aliments, d'aliments pour animaux et les échantillons environnementaux au stade de la production d'aliments.....	5
9.3.3 Mode opératoire pour les échantillons au stade de la production primaire.....	6
9.4 Isolement.....	6
9.4.1 Généralités.....	6
9.4.2 Mode opératoire pour les échantillons d'aliments, d'aliments pour animaux et les échantillons environnementaux au stade de la de production d'aliments.....	6
9.4.3 Mode opératoire pour les échantillons au stade de la production primaire.....	7
9.5 Confirmation.....	7
9.5.1 Généralités.....	7
9.5.2 Choix des colonies pour la confirmation.....	8
9.5.3 Essais biochimiques.....	8
9.5.4 Essais de sérotypage.....	12
9.5.5 Interprétation des réactions biochimiques et sérologiques.....	12
9.5.6 Sérotypage.....	13
<b>10</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>13</b>
<b>11</b> <b>Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>13</b>
11.1 Études interlaboratoires.....	13
11.2 Sensibilité.....	13
11.3 Spécificité.....	13
11.4 LOD <sub>50</sub> .....	14
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>14</b>
<b>Annexe A (normative) Schémas des modes opératoires</b> .....	<b>15</b>
<b>Annexe B (normative) Milieux de culture et réactifs</b> .....	<b>18</b>
<b>Annexe C (informative) Études de validation des méthodes et caractéristiques de performance</b> .....	<b>32</b>

<b>Annexe D (normative) Recherche des sérovars Typhi et Paratyphi de <i>Salmonella enterica</i> sous-espèce <i>enterica</i></b> .....	<b>38</b>
<b>Annexe E (informative) Exemples de milieux d'isolement sélectifs</b> .....	<b>43</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>48</b>

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

[ISO 6579-1:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6cce484a-0ac8-4d1f-ae5f-167d9fc52e07/iso-6579-1-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6cce484a-0ac8-4d1f-ae5f-167d9fc52e07/iso-6579-1-2017>

## 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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html)

Le présent document a été élaborée par le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires - Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette première édition de l'ISO 6579-1 annule et remplace l'ISO 6579:2002 et l'ISO 6785:2001, qui ont fait l'objet d'une révision technique. Elle intègre également l'ISO 6579-1:2002/Amd 1:2007 et l'ISO 6579-1:2002/Cor 1:2004.

Par rapport à l'ISO 6579:2002, les principales modifications sont les suivantes.

- L'ISO 6785 a été intégrée dans le présent document;
- Les échantillons au stade de la production primaire ont été ajoutés dans le domaine d'application.
- La recherche de *Salmonella* Typhi et de *Salmonella* Paratyphi est décrite en [Annexe D](#).
- Les descriptions des préparations des suspensions mères ont été supprimées et remplacées, dans la mesure du possible, par des renvois aux parties appropriées de l'ISO 6887.
- La plage de températures pour l'incubation de milieux non sélectifs a été étendue de  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  à la plage comprise entre  $34^\circ\text{C}$  et  $38^\circ\text{C}$ , sans tolérance supplémentaire.
- En ce qui concerne l'enrichissement sélectif, la norme offre le choix entre l'utilisation du bouillon ou de la gélose semi-solide du milieu de Rappaport Vassiliadis (RVS ou MSRV) pour les échantillons d'aliments, les échantillons d'aliments pour animaux et les échantillons environnementaux prélevés dans les secteurs de la production et de la manutention des aliments.

## ISO 6579-1:2017(F)

- L'ensemencement du milieu d'isolement est devenu moins prescriptif; l'objectif est d'obtenir des colonies bien isolées après l'incubation.
- Pour la confirmation, il est acceptable d'effectuer les essais uniquement sur une colonie caractéristique (au lieu d'une colonie caractéristique de chaque combinaison de milieux). Si les essais de cet isolat sont négatifs pour *Salmonella*, quatre autres isolats caractéristiques issus des différentes combinaisons de milieux doivent être soumis à essai.
- Il est permis d'effectuer la confirmation biochimique directement sur une colonie caractéristique bien isolée, sur le milieu d'isolement sélectif. Le contrôle de la pureté sur le milieu gélosé non sélectif peut être effectué en parallèle.
- Deux essais de confirmation sont devenus facultatifs (essai de la  $\beta$ -galactosidase et réaction de l'indole) et un essai de confirmation a été supprimé (réaction de Voges-Proskauer).
- Le présent document décrit la confirmation sérologique (au niveau du sérotype). Pour les lignes directrices relatives au sérotypage (au niveau du sérovar), se référer à l'ISO/TR 6579-3.
- Le [Tableau 1](#) a été amélioré.
- Des essais de performance pour l'assurance de la qualité des milieux de culture ont été ajoutés à l'[Annexe B](#).
- Les caractéristiques de performance du milieu MSR/V ont été ajoutées à l'[Annexe C](#).

Une liste de toutes les parties de la série ISO 6579 peut être consultée sur le site web de l'ISO.

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

[ISO 6579-1:2017](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6cce484a-0ac8-4d1f-ae5f-167d9fc52e07/iso-6579-1-2017>

## Introduction

Le présent document décrit une méthode horizontale de recherche des *Salmonella* spp. dans les produits alimentaires (y compris le lait et les produits laitiers, initialement décrits dans l'ISO 6785), les aliments pour animaux, les matières fécales des animaux et des échantillons environnementaux au stade de la production primaire (ces deux derniers types d'échantillon étaient initialement décrits dans l'ISO 6579-1:2002/Amd 1:2007).

Les principales modifications énumérées dans l'avant-propos, introduites dans le présent document par rapport à l'ISO 6579:2002, sont considérées comme étant mineures (voir ISO 17468)[37].

Un mode opératoire pour le dénombrement des *Salmonella* spp. est décrit dans l'ISO/TS 6579-2.[3]

Des lignes directrices pour le sérotypage des *Salmonella* spp. sont décrites dans l'ISO/TR 6579-3.[24]

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

[ISO 6579-1:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6cce484a-0ac8-4d1f-ae5f-167d9fc52e07/iso-6579-1-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6cce484a-0ac8-4d1f-ae5f-167d9fc52e07/iso-6579-1-2017>

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

ISO 6579-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6cce484a-0ac8-4d1f-ae5-167d9fc52e07/iso-6579-1-2017>



# Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* —

## Partie 1: Recherche des *Salmonella* spp.

**AVERTISSEMENT** — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de détection des *Salmonella* ne soient réalisés que dans des laboratoires équipés à cet effet, sous le contrôle d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit pris lors de l'élimination de tous les éléments incubés. Il convient que les personnes qui utilisent le présent document soient familières avec les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'établir les pratiques de sécurité et de santé appropriées et d'assurer la conformité aux réglementations nationales.

### 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode horizontale de recherche des *Salmonella*. Il s'applique aux:

- produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale.
- échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de denrées alimentaires.
- échantillons au stade de la production primaire, tels que des matières fécales, de la poussière ou des prélèvements de surface.

Cette méthode horizontale vise à rechercher la plupart des sérovars de *Salmonella*. Des étapes de culture supplémentaires peuvent être nécessaires pour la recherche de certains sérovars spécifiques. Pour *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi, le mode opératoire est décrit en [Annexe D](#).

Le milieu d'enrichissement sélectif MSRV, gélose de Rappaport-Vassiliadis semi-solide modifiée, est conçu pour la recherche des *Salmonella* mobiles et n'est pas adapté à la détection des *Salmonella* immobiles.

### 2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 6887 (toutes les parties), *Microbiologie de la chaîne alimentaire* Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

ISO 11133:2014, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

### 3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

#### 3.1

##### **Salmonella**

microorganisme formant des colonies caractéristique ou moins caractéristiques sur des milieux sélectifs solides et possédant les caractéristiques biochimiques et sérologiques décrites lorsque des essais de confirmation sont réalisés conformément au présent document

#### 3.2

##### **recherche des Salmonella**

détermination des *Salmonella* (3.1), dans une quantité déterminée de produit ou de surface ou d'objet (par exemple, pédi-chiffonnettes), lorsque les essais sont réalisés conformément au présent document

### 4 Principe

#### 4.1 Généralités

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

La recherche de *Salmonella* nécessite quatre phases successives, comme indiqué dans l'Annexe A.

NOTE Les *Salmonella* peuvent être présentes en petit nombre et sont souvent accompagnées d'un nombre beaucoup plus grand d'autres microorganismes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ou à des bactéries d'autres familles. Un préenrichissement est nécessaire pour permettre la détection des *Salmonella* en nombre restreint ou des *Salmonella* stressées.

#### 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 entre 34 °C et 38 °C pendant 18 h.

En cas de grandes quantités (par exemple, 1 l ou plus), il est recommandé de chauffer l'eau peptonée tamponnée entre 34 °C et 38 °C avant son mélange avec la prise d'essai.

#### 4.3 Enrichissement en milieux sélectifs

Ensemencement du bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS) ou de la gélose Rappaport-Vassiliadis semi-solide modifiée (MSRV) et d'un bouillon Müller-Kauffmann tétrathionate-novobiocine (MKTn) avec la culture obtenue en 4.2.

Incubation du bouillon RVS ou de la gélose MSRV à 41,5 °C pendant 24 h, et du bouillon MKTn à 37 °C pendant 24 h.

Pour certains produits, il peut être nécessaire d'incuber le ou les milieux d'enrichissement sélectifs pendant 24 h supplémentaires.

NOTE La gélose MSRV est conçu pour la recherche des *Salmonella* mobiles et n'est pas adapté à la détection des *Salmonella* immobiles.

#### 4.4 Isolement sur des milieux solides sélectifs

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

- gélose xylose-lysine-désoxycholate (gélose XLD);
- un autre milieu sélectif solide complémentaire de la gélose XLD (voir les exemples donnés dans l'Annexe E).

Incubation de la gélose XLD à 37 °C puis examen après 24 h. Incubation du second milieu sélectif selon les recommandations du fabricant.

#### 4.5 Confirmation

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

### 5 Milieux de culture, réactifs et sérums

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218 et l'ISO 11133.

La composition des milieux de culture et des réactifs, ainsi que leur préparation, sont décrites en Annexe B.

### 6 Matériels et consommables

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)

Comme spécifié dans l'ISO 7218.

**6.2 Enceinte de séchage**, ou **étuve**, ventilée par convection, réglable entre 25 °C et 50 °C.

**6.3 Incubateur(s)**, réglables entre 34 °C et 38 °C et à  $(37 \pm 1)$  °C.

**6.4 Incubateur**, réglable à  $(41,5 \pm 1)$  °C, ou **bain d'eau**, réglable à  $(41,5 \pm 1)$  °C.

**6.5 Bain d'eau**, réglable de 47 °C à 50 °C.

**6.6 Bain d'eau**, réglable à  $(37 \pm 1)$  °C.

**6.7 Bain d'eau**, réglable à  $(45 \pm 1)$  °C.

La dose infectante de *Salmonella* étant faible, il est recommandé d'utiliser un bain d'eau (6.4 à 6.7) contenant un agent antibactérien.

**6.8 Réfrigérateur**, réglable à  $(5 \pm 3)$  °C

**6.9 Congélateur**, réglable à  $(-20 \pm 5)$  °C

**6.10 Anses bouclées stériles**, d'environ 3 mm de diamètre (volume de 10 µl) et d'un volume de 1 µl, et **fil droit (ose)**.

**6.11 pH-mètre**, ayant une exactitude d'étalonnage de  $\pm 0,1$  unité de pH de 20 °C à 25 °C.

**6.12 Tubes ou flacons stériles** munis de bouchons et de capacité appropriée.

**6.13 Pipettes graduées** ou **pipettes automatiques stériles**, de capacités nominales 25 ml, 10 ml, 1 ml et 0,1 ml.

**6.14 Boîtes de Petri stériles**, de diamètre d'environ 90 mm et (facultatif) de grandes dimensions (environ 140 mm de diamètre).

## 7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document (voir la Norme internationale spécifique au 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.

Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO/TS 17728[26] pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, dans l'ISO 707[27] pour le lait et les produits laitiers, dans l'ISO 13307[28] pour l'échantillonnage au stade de la production primaire, dans l'ISO 17604[29] pour l'échantillonnage des carcasses et dans l'ISO 18593[25] pour l'échantillonnage des surfaces.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et du stockage.

iTeh STANDARD PREVIEW

## 8 Préparation de l'échantillon (pour essai)

Préparer l'échantillon pour essai à partir de l'échantillon de laboratoire 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 les schémas en [Annexe A](#))

### 9.1 Prise d'essai et suspension mère

Pour la préparation de la suspension mère, dans le cas général utiliser comme diluant le milieu de préenrichissement spécifié en [B.2](#) (eau peptonée tamponnée). Préchauffer l'eau peptonée tamponnée à température ambiante avant utilisation.

En règle générale, une quantité de prise d'essai (masse ou volume) est ajoutée à une quantité d'eau peptonée tamponnée de manière à obtenir une dilution au 1/10<sup>ème</sup>. Il s'agit généralement de l'ajout d'une quantité de 25 g de prise d'essai à 225 ml d'eau peptonée tamponnée. Néanmoins, pour certains types d'échantillons (par exemple, pour les pédi-chiffonnettes ou la poussière), il peut être nécessaire d'utiliser un rapport de dilution différent.

Pour la préparation de produits spécifiques, suivre les modes opératoires spécifiés dans l'ISO 6887 (toutes les parties).

Le présent document a été validé pour des prises d'essai de 25 g. L'utilisation d'une prise d'essai plus petite est autorisée sans validation ou vérification supplémentaire, dans la mesure où le rapport entre le bouillon de préenrichissement et la prise d'essai demeure le même. Il est admis d'utiliser une prise d'essai plus importante que celle validée à l'origine si une étude de validation/vérification a démontré l'absence d'effets négatifs sur la détection de *Salmonella* spp.

NOTE 1 Une validation peut être effectuée conformément aux parties appropriées de l'ISO 16140. La vérification du regroupement d'échantillons peut être effectuée conformément au protocole décrit dans l'ISO 6887-1:2017, Annexe D.[38]

En cas de grandes quantités (par exemple, 1 l ou plus), il est recommandé de chauffer l'eau peptonée tamponnée entre 34 °C et 38 °C avant son mélange avec la prise d'essai.

NOTE 2 Lorsqu'il faut examiner plusieurs prises d'essai de 25 g provenant d'un lot déterminé de produit alimentaire, et lorsqu'on dispose de preuves indiquant que la combinaison de prises d'essai ne modifie pas les résultats en ce qui concerne ce produit alimentaire en particulier, les prises d'essai peuvent être regroupées. Des informations supplémentaires sur le regroupement d'échantillons, ainsi qu'un mode opératoire permettant d'analyser l'influence du regroupement sur la sensibilité de la méthode figurent dans l'ISO 6887-1.[38]

## 9.2 Préenrichissement non sélectif

Incuber la suspension mère (9.1) entre 34 °C et 38 °C (6.3) pendant  $18 \pm 2$  h.

Après incubation, il est permis de conserver la culture de préenrichissement à 5 °C (6.8) pendant 72 h au maximum (voir les Références [30] à [34]).

## 9.3 Enrichissement sélectif

### 9.3.1 Généralités

Laisser les milieux d'enrichissement sélectifs, le bouillon RVS ou la gélose MSRV (B.3 ou B.4), et de bouillon MKTTn (B.5), se réchauffer à température ambiante s'ils étaient conservés à une température inférieure.

Minimiser le transfert de particules entre le milieu de préenrichissement et les milieux d'enrichissement sélectifs.

Après l'incubation, il est permis de conserver l'enrichissement sélectif à 5 °C (6.8) pendant 72 h au maximum (voir les Références [30] à [34]).

NOTE La gélose MSRV est conçu pour la recherche des *Salmonella* mobiles et n'est pas adapté à la détection des *Salmonella* immobiles.

### 9.3.2 Mode opératoire pour les échantillons d'aliments, d'aliments pour animaux et les échantillons environnementaux au stade de la production d'aliments

Transférer 0,1 ml de la culture obtenue en 9.2 dans un tube contenant 10 ml du bouillon RVS (B.3) ou sur la surface d'une boîte de gélose MSRV (B.4). Ensemencer la gélose MSRV par dépôt de 1 à 3 gouttes réparties de manière équidistante sur la surface du milieu.

Transférer 1 ml de la culture obtenue en 9.2 dans un tube contenant 10 ml de bouillon MKTTn (B.5).

Incuber le bouillon RVS ensemencé à 41,5 °C (6.4) pendant  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .

Incuber les boîtes de gélose MRVS ensemencées à 41,5 °C (6.4) pendant  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . **Ne pas retourner les boîtes.**

Incuber le bouillon MKTTn ensemencé à 37 °C (6.3) pendant  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .

Les boîtes MSRV caractéristiques présentent une zone trouble blanche grisâtre s'étendant à partir de la goutte ensemencée.

Dans les produits laitiers secs et le fromage, les *Salmonella* peuvent être stressées avec des dommages sublétaux. Incuber les milieux d'enrichissement sélectifs de ces produits pendant  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  supplémentaires (voir la Référence [35]).

Cette durée d'incubation supplémentaire peut s'avérer bénéfique pour certains autres produits, par exemple lors de l'étude d'échantillons liés à une toxi-infection.

### 9.3.3 Mode opératoire pour les échantillons au stade de la production primaire

Ensemencer les boîtes de gélose MSR/V (B.4) avec 0,1 ml de la culture du pré-enrichissement (9.2) par dépôt de 1 à 3 gouttes réparties de manière équidistante sur la surface du milieu.

Incuber les boîtes de MRVS ensemencées à 41,5 °C (6.4) pendant 24 h ± 3 h.

#### Ne pas retourner les boîtes.

Les boîtes MSR/V caractéristiques présentent une zone trouble blanche grisâtre s'étendant à partir de la goutte ensemencée.

Si les boîtes s'avèrent négatives après 24 h, incuber pendant 24 h ± 3 h supplémentaires.

NOTE Il est possible d'augmenter la sensibilité en appliquant un second mode opératoire d'enrichissement sélectif, par exemple le bouillon MKT/Tn incubé à 41,5 °C pendant 24 h [36].

## 9.4 Isolement

### 9.4.1 Généralités

À partir des cultures obtenues dans les milieux d'enrichissement sélectifs (9.3), ensemencer deux milieux gélosés d'isolement sélectifs. Le premier milieu d'isolement est une gélose xylose-lysine-désoxycholate (XLD). Le second milieu d'isolement est choisi par le laboratoire d'essais.

Choisir un second milieu d'isolement sélectif complémentaire à la gélose XLD, et basé sur des caractéristiques diagnostiques différentes de celles de la gélose XLD, de façon à faciliter la détection, par exemple, des *Salmonella* lactose positives ou H<sub>2</sub>S négatives. Des exemples de milieux d'isolement sont donnés en Annexe E.

Laisser les boîtes de gélose XLD (B.6) et le second milieu d'isolement sélectif revenir à température ambiante, si elles étaient stockées à une température inférieure. Si nécessaire, sécher la surface des boîtes avant utilisation (voir l'ISO 11133).

### 9.4.2 Mode opératoire pour les échantillons d'aliments, d'aliments pour animaux et les échantillons environnementaux au stade de la de production d'aliments

À partir de la culture obtenue dans le bouillon RVS (9.3.2), ensemencer à l'aide d'une anse de 10 µl (6.10) la surface d'une boîte de gélose XLD (B.6) de façon à permettre le développement de colonies bien isolées. Procéder de la même manière pour le second milieu d'isolement sélectif.

À partir de la culture positive obtenue sur la gélose MSR/V (9.3.2), localiser le front de migration de la culture opaque le plus éloigné des points d'ensemencement et piquer une anse de 1 µl (6.10) juste en bordure interne de la zone opaque. Retirer l'anse en veillant à ne pas entraîner de gros fragments de la gélose MSR/V. Ensemencer la surface d'une boîte de gélose XLD (B.6) afin d'obtenir des colonies bien isolées. Procéder de la même manière pour le second milieu d'isolement sélectif.

À partir de la culture obtenue dans le bouillon MKT/Tn (9.3.2), ensemencer à l'aide d'une anse de 10 µl (6.10) la surface d'une boîte de gélose XLD (B.6) de façon à permettre le développement de colonies bien isolées. Procéder de la même manière pour le second milieu d'isolement sélectif.

NOTE 1 Pour obtenir des colonies bien isolées, il peut être nécessaire d'utiliser des boîtes de Petri de grandes dimensions (diamètre d'environ 140 mm) contenant les milieux d'isolement ou deux boîtes de taille normale (diamètre d'environ 90 mm).

Incuber les boîtes de géloses XLD surface de la gélose vers le bas à 37 °C (6.3) pendant 24 h ± 3 h.

Incuber le second milieu d'isolement sélectif selon les instructions du fabricant.

Si les milieux d'enrichissement sélectif ont été incubés pendant 24 h supplémentaires, suivre le même mode opératoire d'isolement que celui décrit ci-dessus.



Les colonies caractéristiques de *Salmonella* cultivées sur gélose XLD ont un centre noir et sont entourées d'un halo clair rouge légèrement transparent dû à un changement de l'indicateur du milieu.

NOTE 2 Les *Salmonella* variant H<sub>2</sub>S négatif cultivées sur gélose XLD sont roses avec un centre rose foncé. Les *Salmonella* lactose positives cultivées sur gélose XLD sont jaunes sans noircissement. La fréquence de ces phénotypes est résumée dans le [Tableau 1](#).

Après la durée d'incubation appropriée du second milieu d'isolement sélectif, examiner la boîte afin de rechercher la présence de colonies présumées être des *Salmonella* en raison de leurs caractéristiques.

#### 9.4.3 Mode opératoire pour les échantillons au stade de la production primaire

À partir de la culture positive obtenue sur la gélose MSRV (9.3.3), localiser le front de migration de la culture opaque le plus éloigné des points d'ensemencement et piquer une anse de 1 µl (6.10) juste en bordure interne de la zone opaque. Retirer l'anse en veillant à ne pas entraîner de gros fragments de la gélose MSRV. Ensemencer la surface d'une boîte de gélose XLD afin d'obtenir des colonies bien isolées. Procéder de la même manière pour le second milieu d'isolement sélectif.

Incuber les boîtes de géloses XLD surface de la gélose vers le bas à 37 °C (6.3) pendant 24 h ± 3 h.

Incuber le second milieu d'isolement sélectif selon les instructions du fabricant.

Réincuber les boîtes de MSRV négatif dans l'incubateur à 41,5 °C pendant 24 h ± 3 h supplémentaires. Appliquer le mode opératoire d'isolement en milieux sélectifs si, après 48 h d'incubation, ces MSRV en boîtes deviennent positifs.

Sur gélose XLD, les colonies caractéristiques de *Salmonella* ont un centre noir entouré d'une zone légèrement transparente de couleur rougeâtre, due à un changement de couleur de l'indicateur.

NOTE Les *Salmonella* variant H<sub>2</sub>S négatif cultivées sur gélose XLD sont roses avec un centre rose foncé. Les *Salmonella* lactose positives cultivées sur gélose XLD sont jaunes sans noircissement. La fréquence de ces phénotypes est résumée dans le [Tableau 1](#).

Après la durée d'incubation appropriée du second milieu d'isolement sélectif, examiner la boîte afin de rechercher la présence de colonies présumées être des *Salmonella* en raison de leurs caractéristiques.

### 9.5 Confirmation

#### 9.5.1 Généralités

La combinaison des résultats des essais biochimiques et sérologiques indique si un isolat appartient au genre *Salmonella*. Un sérotypage complet est nécessaire pour caractériser les souches de *Salmonella*. Des lignes directrices pour le sérotypage sont données dans l'ISO/TR 6579-3[24].

Pour certains milieux de confirmation tel que décrit en 9.5.3 ainsi qu'en B.8 à B.12, des compositions alternatives existantes (commerciales) peuvent également être utilisées pour la confirmation biochimique des *Salmonella*. Ces compositions alternatives sont autorisées dans la mesure où leurs performances pour la confirmation biochimique des *Salmonella* ont été vérifiées avant utilisation.

Pour établir une distinction nette entre les réactions biochimiques positives et négatives, il est utile de vérifier pour chaque essai biochimique les réactions des milieux avec des souches de contrôle positives et négatives bien caractérisées.

NOTE 1 La détection des colonies de *Salmonella* est en grande partie une question d'expérience, et leurs aspects peuvent quelquefois varier, non seulement d'un sérovar à un autre, mais également d'un lot de milieu de culture à un autre.