
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour la recherche, le
dénombrement et le sérotypage des
Salmonella —**

Partie 2:
**Dénombrement par une technique
miniaturisée du nombre le plus probable**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

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

ISO/TS 6579-2:2012

Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6579-2-100a-470c-a70f-a693b76e9451/iso-ts-6579-2-2012>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 6579-2:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0bbcfcc4-106a-47be-a7bf-a693b76e9451/iso-ts-6579-2-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0bbcfcc4-106a-47be-a7bf-a693b76e9451/iso-ts-6579-2-2012>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2012

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	2
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
4.1 Généralités	2
4.2 Préenrichissement en milieu liquide non sélectif	2
4.3 Enrichissement en milieu semi-solide sélectif	2
4.4 Isolement sélectif et identification	3
4.5 Confirmation	3
4.6 Calcul du NPP	3
5 Milieus de culture et sérums	3
5.1 Généralités	3
5.2 Milieus de culture	3
6 Appareillage	4
7 Échantillonnage	4
8 Préparation de l'échantillon pour essai	4
9 Mode opératoire	5
9.1 Prise d'essai et suspension mère	5
9.2 Dilution et préenrichissement en milieu liquide non sélectif	5
9.3 Enrichissement sélectif en milieu semi-solide	5
9.4 Isolement sélectif	6
9.5 Confirmation biochimique et sérologique	6
10 Expression des résultats	8
11 Rapport d'essai	8
Annexe A (informative) Composition et préparation de milieux de culture et de réactifs	10
Annexe B (informative) Schéma du mode opératoire	17
Bibliographie	18

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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale soit de son annulation.

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/TS 6579-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

L'ISO 6579 comprend la partie suivante, présentée sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des Salmonella*:

- *Partie 2: Dénombrement par une technique miniaturisée du nombre le plus probable* [Spécification technique]

Des parties supplémentaires, traitant d'une méthode de détection et donnant des lignes directrices pour la sérotypie, sont prévues. L'ISO 6579:2002 sera annulée ultérieurement.

Introduction

Le mode opératoire décrit est fondé sur la méthode donnée en Référence [1].

Le mode opératoire de dénombrement décrit ici se rapporte à une technique miniaturisée du nombre le plus probable (NPP). Pour cette technique miniaturisée du NPP sur milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis modifié (MSRV), le volume de la première dilution soumise à essai est inférieur au volume employé dans la méthode de détection spécifiée dans l'ISO 6579:2002 + Cor.1:2004 + Amd.1:2007^[6]. Pour cette raison, la sensibilité de la technique sur MSRV miniaturisé est inférieure à celle obtenue pour ces méthodes de détection (Référence [1]). La limite de détection de la méthode sur MSRV miniaturisé est d'environ 1 ufc/g, mais peut fluctuer d'un sérovar de *Salmonella* à un autre et d'une matrice à une autre. Pour les méthodes de détection susmentionnées, la limite de détection est habituellement de 1 ufc/25 g (0,04 ufc/g). Pour les échantillons ne comptant qu'un (très) petit nombre de *Salmonella* spp. (< 1 ufc/g), le mode opératoire en milieu MRSV miniaturisé peut ne pas être suffisamment sensible. Si un résultat quantitatif est attendu pour des échantillons susceptibles de contenir de si faibles nombres de *Salmonella* spp. (et testés négatifs par cette technique sur MSRV miniaturisé, par exemple), il est conseillé de procéder au dénombrement à l'aide d'une technique du NPP «classique» (non miniaturisée). Pour les autres échantillons, la méthode sur MSRV miniaturisé peut être avantageuse par rapport à la technique du NPP classique du fait que la technique miniaturisée du NPP peut prendre moins de temps et nécessite moins de ressources (en raison de faibles quantités).

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TS 6579-2:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0bbcfcc4-106a-47be-a7bf-a693b76e9451/iso-ts-6579-2-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0bbcfcc4-106a-47be-a7bf-a693b76e9451/iso-ts-6579-2-2012>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 6579-2:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0bbcfcc4-106a-47be-a7bf-a693b76e9451/iso-ts-6579-2-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0bbcfcc4-106a-47be-a7bf-a693b76e9451/iso-ts-6579-2-2012>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* —

Partie 2:

Dénombrement par une technique miniaturisée du nombre le plus probable

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel d'effectuer les essais de recherche de *Salmonella* 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.

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 6579 décrit une méthode de dénombrement de *Salmonella* spp. présentes dans:

- les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale;
- les échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de produits alimentaires;
- les matières fécales des animaux;
- les échantillons environnementaux au stade de la production primaire;

par le calcul du nombre le plus probable (NPP).

La méthode est fondée sur une miniaturisation des étapes de dilution, de préenrichissement et d'enrichissement sélectif. Le milieu d'enrichissement sélectif, le milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis modifié (MSRV), est conçu pour la recherche des *Salmonella* mobiles et n'est pas adapté à la recherche des *Salmonella* immobiles.

Il est possible que la méthode soit moins appropriée au dénombrement de *Salmonella* ser. Typhi et *Salmonella* ser. Paratyphi.

La méthode n'est pas appropriée au dénombrement de *Salmonella* spp. présentes en (très) faibles concentrations dans des échantillons contaminés (< 1 ufc/g).

NOTE Le nombre de *Salmonella* immobiles est généralement faible dans la plupart des matrices pertinentes pour la présente méthode. Dans la présente note, des exemples sont donnés pour des échantillons provenant d'une production primaire. Il semble que les biovars de *Salmonella* immobiles, les *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, en Référence [4], environ 1 000 échantillons de fèces de poules pondeuses et environ 900 échantillons de fèces 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 milieu 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 décrite en Référence [4], pratiquement 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.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables à 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 (y compris les éventuels amendements) s'applique.

ISO 6887 (toutes les parties), *Microbiologie des aliments — 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/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Lignes directrices pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Lignes directrices générales d'assurance qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

ISO/TS 11133-2, *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*

3 Termes et définitions

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

3.1
Salmonella
microorganisme formant des colonies caractéristiques ou moins caractéristiques sur des milieux solides sélectifs et possédant des caractéristiques biochimiques et sérologiques spécifiques

NOTE Des essais appropriés relatifs aux caractéristiques biochimiques et sérologiques spécifiques sont spécifiés dans la présente partie de l'ISO 6579.

3.2
dénombrement des *Salmonella*
nombre de *Salmonella* spp. présentes par millilitre ou par gramme d'un échantillon pour essai ou par aire d'un objet (par exemple chausson)

4 Principe

4.1 Généralités

Le dénombrement de *Salmonella* spp. dans le format du NPP nécessite quatre étapes successives (4.2 à 4.5).

4.2 Préenrichissement en milieu liquide non sélectif

Préparation d'une dilution au dixième de l'échantillon dans de l'eau peptonée tamponnée (EPT) (suspension mère).

Dépôt de la suspension mère dans la première rangée (vide) comportant trois puits d'une plaque de «microtitrage» à 12 puits.

Ensemencement de la deuxième rangée de trois puits de la plaque de «microtitrage» à 12 puits, contenant un bouillon de préenrichissement non sélectif (EPT) avec une quantité spécifiée de la première rangée.

Ensemencement des troisième et quatrième rangées de trois puits contenant de l'EPT, et si nécessaire des rangées de plaques supplémentaires.

Incubation des plaques de «microtitrage» à 12 puits à 37 °C pendant 18 h.

4.3 Enrichissement en milieu semi-solide sélectif

Repiquage de chaque puits obtenu en 4.2 dans un puits contenant de la gélose semi-solide (MSRV).

Incubation de la plaque de MSRV à 41,5 °C pendant 24 h. Si le MSRV est négatif après 24 h, la plaque est incubée pendant 24 h supplémentaires.

4.4 Isolement sélectif et identification

À partir des cultures (les plus fortes dilutions) (suspectes) obtenues en 4.3, un milieu solide sélectif xylose lysine désoxycholate (XLD) est ensemencé et incubé à 37 °C pendant 24 h.

4.5 Confirmation

Repiquage des colonies présumées de *Salmonella* isolées obtenues en 4.4 et confirmation au moyen des essais biochimiques et sérologiques appropriés.

4.6 Calcul du NPP

Le nombre le plus probable de *Salmonella* spp. par millilitre ou par gramme de l'échantillon pour essai est calculé à partir du nombre de puits confirmés positifs.

5 Milieux de culture et sérums

5.1 Généralités

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

En ce qui concerne les essais de performance des milieux, suivre les recommandations de l'ISO/TS 11133-1, de l'ISO/TS 11133-2 et les informations données en A.8.

Tous les milieux et réactifs nécessaires sont décrits à l'Annexe A. En alternative, il est possible d'utiliser des milieux complets ou des diluants déshydratés. Dans ce cas, suivre les instructions du fabricant.

5.2 Milieux de culture

5.2.1 Milieu de préenrichissement non sélectif: eau peptonée tamponnée (EPT). Voir A.1.

5.2.2 Gélose d'enrichissement sélectif semi-solide: milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis modifié (MSRV). Voir A.2.

5.2.3 Gélose au xylose lysine désoxycholate (gélose XLD). Voir A.3.

5.2.4 Gélose nutritive. Voir A.4.

5.2.5 Gélose au citrate de fer et aux trois sucres (gélose TSI). Voir A.5.

De la gélose au citrate de fer et aux deux sucres (Kligler-Hajna) peut être utilisée en variante.

5.2.6 Gélose à l'urée (Christensen). Voir A.6.

5.2.7 Milieu de décarboxylation de la L-lysine (LDC).

5.2.8 Antisérums

Il est possible de trouver dans le commerce plusieurs types de sérums agglutinants contenant des anticorps contre un ou plusieurs facteurs antigéniques O et des anticorps contre un ou plusieurs facteurs antigéniques H.

Il convient de faire tous les efforts afin de s'assurer que les antisérums utilisés conviennent pour la recherche de tous les sérovars de *Salmonella*.

6 Appareillage

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si les spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave). Voir l'ISO 7218.

6.2 Enceinte de séchage ou étuve ventilée, pouvant être maintenue à une température comprise entre 25 °C et 50 °C, ou **hotte à flux d'air laminaire.**

6.3 Étuves, pouvant fonctionner à 37 °C ± 1 °C et à 41,5 °C ± 1 °C.

6.4 Bain d'eau, pouvant fonctionner à une température comprise entre 47 °C et 50 °C.

6.5 Réfrigérateur (destiné à la conservation de milieux préparés), pouvant fonctionner à 5 °C ± 3 °C.

6.6 pH-mètre, ayant une résolution de 0,01 unité de pH et une exactitude de ± 0,1 unité de pH à 25 °C. Voir l'ISO 7218.

6.7 Tubes à essai et flacons stériles, de capacité appropriée. Des bouteilles ou flacons à bouchons métalliques ou en matière plastique (à vis) non toxiques peuvent être utilisés.

6.8 Anses bouclées, de 1 µl.

6.9 Pipettes graduées stériles ou pipettes automatiques, de capacités nominales de 10 ml (graduées en divisions de 0,5 ml), de 2 ml (graduées en divisions de 0,1 ml), de 0,1 ml (graduées en divisions de 0,01 ml). Pipettes multicanaux de capacités nominales de 0,5 ml et de 0,02 ml pour pipeter trois puits à la fois.

6.10 Boîtes de Petri stériles, d'environ 90 mm de diamètre.

6.11 Plaques de «microtitrage» à 12 puits stériles, dont les puits ont un diamètre d'environ 25 mm et une profondeur de 20 mm (5 ml) et présentent un fond plat et sont dotés de couvercles.

6.12 Homogénéisateur. Voir l'ISO 7218.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 6579. Se référer à la Norme internationale spécifique concernant le produit concerné.

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

S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique appropriée 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.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai et suspension mère

Se référer à l'ISO 6887 et à la Norme internationale spécifique appropriée au produit concerné. Préparer la suspension mère en diluant la prise d'essai au dixième dans de l'EPT (5.2.1). Par exemple, ajouter 25 g d'échantillon à 225 ml d'EPT et homogénéiser (6.12), par exemple dans un mélangeur à palettes, pendant 1 min.

9.2 Dilution et préenrichissement en milieu liquide non sélectif

Utiliser une plaque de «microtitrage» à 12 puits (6.11) dont les trois puits de la première rangée sont vides et dont les autres puits sont remplis avec 2 ml d'EPT (5.2.1) (les deuxième, troisième et quatrième rangées de trois puits chacune, voir Annexe B).

NOTE 1 En tant que cas général, le mode opératoire décrit spécifie les dilutions pour une seule plaque de «microtitrage» à 12 puits. Lorsqu'un nombre de *Salmonella* supérieur à 500 ufc/g est attendu, il est nécessaire d'employer une deuxième plaque de «microtitrage» à 12 puits contenant dans chaque puits 2 ml d'EPT (5.2.1). Préparer un nombre suffisant de plaques (dilutions) pour s'assurer que le dernier puits dans la plaque de «microtitrage» à 12 puits donne un résultat négatif.

Remplir chacun des trois puits de la première rangée (vides) de 2,5 ml de la suspension mère (9.1), en utilisant une pipette (6.9).

Prélever 0,5 ml (par exemple en utilisant une pipette multicanaux, 6.9) de chaque puits de la première rangée et les ajouter aux puits de la deuxième rangée contenant 2 ml d'eau peptonée tamponnée (première dilution au cinquième).

Prélever 0,5 ml (par exemple en utilisant une pipette multicanaux, 6.9, avec de nouveaux embouts) de chaque puits de la deuxième rangée et les ajouter aux puits de la troisième rangée contenant 2 ml d'eau peptonée tamponnée (deuxième dilution au cinquième).

Avant de transférer les 0,5 ml de la deuxième rangée dans la troisième rangée, mélanger les suspensions dans les puits en répétant plusieurs fois (avec soin) la manipulation consistant à prélever la suspension à la pipette et à l'expulser dans son puits d'origine.

Procéder de la même façon pour les rangées suivantes.

Incuber la plaque de «microtitrage» à 12 puits à 37 °C (6.3) pendant 18 h ± 2 h.

NOTE 2 Comme le niveau de contamination des échantillons soumis à essai n'est en général pas connu et est bien souvent faible, il peut s'avérer utile de vérifier que des *Salmonella* spp. sont présentes dans l'échantillon en mettant en culture la suspension mère. À cette fin, incuber la suspension mère (9.1) à 37 °C (6.3) pendant 18 h. En ce qui concerne les étapes de culture suivantes, suivre les modes opératoires décrits de 9.3 à 9.5. En 9.3: ensemercer une boîte de Petri contenant du MSR/V avec 1 à 3 gouttes équidistantes ayant un volume total de 0,1 ml de la culture incubée à l'EPT de la suspension mère (9.1).

9.3 Enrichissement sélectif en milieu semi-solide

Laisser le MSR/V (5.2.2) dans les plaques de «microtitrage» à 12 puits se réchauffer à température ambiante si ces dernières étaient conservées à une température inférieure.

Ensemencer chaque puits contenant 2 ml de MSR/V avec 20 µl d'EPT incubé (9.2), par exemple en utilisant une pipette multicanaux (6.9). Utiliser de nouveaux embouts pour chaque rangée de trois puits.

Déposer les 20 µl d'EPT incubé sur la surface du milieu et au bord du puits (voir Annexe B).

Lors du prélèvement d'une subculture d'EPT, essayer de ne pas remuer les agglomérats. Par conséquent, déplacer les plaques de microtitrage avec précaution. Éviter de pipeter les particules pour ne pas les déposer sur les plaques de MSR/V.

Incuber les plaques de MSR/V ensemençées à 41,5 °C (6.3) pendant 24 ± 3 h.

Ne pas retourner les plaques.