

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers.

Art. 2. — Pour la recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe. Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005.

Noureddine BOUKROUH

ANNEXE

METHODE DE RECHERCHE DES SALMONELLA DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS

1. DEFINITIONS :

Dans le cadre de la présente méthode, les définitions suivantes sont applicables.

1.1 SALMONELLA

Micro-organisme formant des colonies typiques sur des milieux sélectifs solides et possédant des caractéristiques biochimiques et sérologiques décrites lorsque les essais sont effectués conformément à la présente méthode.

1.2 RECHERCHE DES SALMONELLA

Détermination de la présence ou de l'absence de ces micro-organismes dans une masse ou un volume déterminé de produit, lorsque l'essai est exécuté selon la présente méthode.

2. PRINCIPE :

En général, la recherche des salmonella nécessite 4 phases successives telles qu'indiquées de 2.1 à 2.4

(Voir également le schéma du mode opératoire dans l'annexe).

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 04-138 du 6 Rabie El Aouel 1425 correspondant au 26 avril 2004 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

2.1 PRE-ENRICHISSEMENT DANS UN MILIEU LIQUIDE

Ensemencement de la prise d'essai dans le milieu de pré-enrichissement approprié, puis incubation à 37 °C durant 16h à 20h.

2.2 ENRICHISSEMENT DANS DES MILIEUX LIQUIDES SELECTIFS

— Ensemencement d'un milieu au tétrathionate et d'un milieu sélénite-cystine avec la culture obtenue (2.1)

— Incubation du milieu au tétrathionate à 43 °C et incubation du milieu sélénite cystine à 37 °C durant 2 périodes de 18h à 24h.

2.3 ISOLEMENT ET IDENTIFICATION

A partir des cultures obtenues (2.2), ensemencement des 2 milieux sélectifs solides gélose au rouge de phénol et au vert brillant et gélose au sulfite de bismuth.

Incubation à 37 °C et examen après 20h à 24h, et si nécessaire, après 40h à 48h, pour contrôler s'il y a présence de colonies, présumées être des salmonella en raison de leurs caractéristiques.

2.4 CONFIRMATION

Repiquage des colonies présumées de Salmonella (2.3) et confirmation au moyen des essais biochimiques et sérologiques appropriés.

3. MILIEUX DE CULTURE, REACTIFS ET SERUMS

3.1 COMPOSANTS DE BASE

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés.

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture et des réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, et être exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Lorsque la gélose est spécifiée, la quantité utilisée doit varier conformément aux prescriptions indiquées pour donner des milieux d'une fermeté appropriée.

Les mesurages de pH doivent être effectués à l'aide d'un pH-mètre, ces mesurages se référant à une température de 25°C. Les ajustements éventuels sont faits par addition, soit d'une solution d'acide chlorhydrique à 1 mol/l, soit d'une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l.

Les milieux de culture préparés et les réactifs ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité, à une température de 4 ± 1°C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions qui évitent toute modification de leur composition.

3.2 MILIEUX DE CULTURE

3.2.1 MILIEU DE PRE-ENRICHISSEMENT EAU PEPTONNEE TAMPONNEE.

COMPOSITION :

Peptone	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogène-orthophosphate disodique Dodécahydraté (Na ₂ HP0 ₄ , 12H ₂ O).....	9,0 g
Dihydrogène-orthophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄).....	1,5 g
Eau.....	1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1.

— Répartir le milieu, par quantités de 225 ml, dans des flacons de 500 ml de capacité (ou des multiples de 225 ml dans des flacons de capacité adéquate).

— Stériliser le milieu durant 15 min. à 121 ± 1° C.

3.2.2 MILIEU D'ENRICHISSEMENT SELECTIF

Bouillon au tétrathionate (Muller - Kauffmann)

Vert brillant	0,5 g
Eau	100 ml

3.2.2.1 MILIEU DE BASE

COMPOSITION :

Extrait de viande	5,0 g
Peptone	10,0 g
Chlorure de sodium	3,0 g
Carbonate de calcium	45,0 g
Eau	1000 ml

PREPARATION :

— Ajouter les composants de base déshydratés ou le milieu de base complet déshydraté à l'eau, en portant à ébullition jusqu'à dissolution complète des composants solubles.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1

— Stériliser le milieu de base durant 15 min. à 121 ± 1°C.

3.2.2.2 SOLUTION DE THIOSULFATE DE SODIUM

COMPOSITION :

Thiosulfate de sodium pentahydraté (Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O)	50,0 g
Eau, quantité suffisante pour	100 ml

PREPARATION :

- Dissoudre le thiosulfate de sodium dans une partie de l'eau.
- Compléter au volume final.
- Stériliser la solution durant 15 min. à $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.2.3 SOLUTION D'IODE

COMPOSITION :

Iode	20,0 g
Iodure de potassium	25,0 g
Eau, quantité suffisante pour	100 ml

PREPARATION :

- Dissoudre l'iodure de potassium dans un petit volume d'eau et ajouter l'iode.
- Agiter jusqu'à dissolution complète.
- Compléter au volume final.
- Conserver la solution dans un récipient opaque complètement fermé.

3.2.2.4 SOLUTION DE VERT BRILLANT

COMPOSITION :

Vert brillant	0,5 g
Eau	100 ml

PREPARATION :

- Ajouter le vert brillant à l'eau.
- Conserver la solution au moins une journée à l'obscurité pour permettre l'autostérilisation.

3.2.2.5 SOLUTION DE BILE DE BŒUF

COMPOSITION :

Bile de bœuf desséchée	10,0 g
Eau	100 ml

PREPARATION :

- Dissoudre la bile de bœuf desséchée dans l'eau en portant à ébullition ;
- Stériliser la solution durant 15 min. à $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.2.6 MILIEU COMPLET

COMPOSITION :

Milieu de base (3.2.2.1)	900 ml
Solution de thiosulfate de sodium (3.2.2.2)	100 ml
Solution d'iode (3.2.2.3)	20 ml
Solution de vert brillant (3.2.2.4)	2 ml
Solution de bile de bœuf (3.2.2.5)	50 ml

PREPARATION :

- Ajouter aseptiquement au milieu de base les autres composants dans l'ordre donné ci-dessus. Bien mélanger les liquides après chaque addition.
- Répartir stérilement le milieu complet, par quantités de 100 ml, dans des flacons stériles de 500 ml de capacité.
- Conserver à $0,5^\circ\text{C}$ à l'obscurité mais utiliser dans la semaine qui suit la préparation.

3.2.3 PREMIER MILIEU D'IDENTIFICATION :

Gélose au rouge de phénol et au vert brillant (Edel & Kampelmacher)

3.2.3.1 MILIEU DE BASE

COMPOSITION :

Extrait de viande en poudre	5,0 g
Peptone	10,0 g
Extrait de levure en poudre	3,0 g
Hydrogène-orthophosphate disodique (Na ₂ HPO ₄)	1,0 g
Dihydrogène-orthophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄)	0,6 g
Agar-agar	12,0 à 18,0 g
Eau	900 ml

PREPARATION :

- Dissoudre les composants de base déshydratés ou le milieu de base complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.
- Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,0 \pm 0,1$.
- Répartir le milieu de base dans des tubes ou des flacons stériles de 500 ml de capacité maximale.

3.2.3.2 SOLUTION DE SUCRE AU ROUGE DE PHENOL

COMPOSITION :

Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Rouge de phénol	0,09 g
Eau, quantité suffisante pour	100 ml

PREPARATION :

- Dissoudre les ingrédients dans l'eau.
- Chauffer au bain d'eau durant 20 min à 70°C .
- Refroidir à 55°C et utiliser immédiatement.

3.2.3.3 MILIEU COMPLET

COMPOSITION :

Milieu de base (3.2.3.1)	900 ml
Solution de sucres au rouge de phénol (3.2.3.2)	100 ml
Solution de vert brillant. (3.2.2.4)	1 ml

PREPARATION :

— Ajouter aseptiquement la solution de vert brillant à la solution de sucres au rouge de phénol refroidie à 55° C.

— Ajouter au milieu de base fondu et maintenu de 50 à 55° C et mélanger.

3.2.3.4 PREPARATION DES BOITES

— Répartir le milieu complet refroidi à 45 ° C, par quantités d'environ 15 ml, dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre et laisser se solidifier.

— Juste avant l'emploi, sécher soigneusement les boîtes de milieu gélosé, de préférence après avoir retiré les couvercles et retourné les boîtes, dans une étuve ou un incubateur réglé à 50 ± 5° C durant 30 minutes.

— Les boîtes de milieu gélosé non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température du laboratoire ou plus de 24h de 0 à 5° C.

**3.2.4 SECOND MILIEU D'IDENTIFICATION:
GELOSE AU SULFITE DE BISMUTH****COMPOSITION :**

Peptone	10,0 g
Extrait de bœuf	5,0 g
Glucose	5,0 g
Hydrogéo-orthophosphate disodique	4,0 g
Sulfate de fer (II)	0,3 g
Citrate de bismuth ammoniacal	1,85 g
Sulfite de sodium	6,15 g
Agar-agar.....	20,0 g
Vert brillant	0,025 g
Eau	1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les ingrédients dans l'eau, en portant à ébullition durant environ 1 min.

— Ajuster le pH à 7,7 ± 0, 1.

— Refroidir entre 45 °C et 50 ° C en agitant doucement le précipité en suspension.

— Ne pas stériliser le milieu.

— Répartir le milieu, par quantités de 20 ml, dans des boîtes de Pétri stériles (de 90 mm de diamètre) et laisser se solidifier.

— Juste avant l'emploi, sécher soigneusement les boîtes de milieu gélosé, de préférence après avoir retiré les couvercles et retourné les boîtes, dans une étuve ou un incubateur réglé à 50 ± 5° C durant 30 minutes.

— Utiliser les boîtes séchées entre 24 et 48 h après leur préparation. Les conserver à l'obscurité.

3.2.5 GELOSE NUTRITIVE**COMPOSITION :**

Extrait de viande	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar-agar	12,0 g
Eau	1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants déshydratés du milieu ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1.

— Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des flacons stériles de 500 ml de capacité maximale.

— Stériliser le milieu durant 20 minutes à 121 ± 1° C.

**PREPARATION DES BOITES DE GELOSE
NUTRITIVE**

Verser environ 15 ml du milieu fondu dans des boîtes de Pétri stériles (de 90 mm de diamètre) et procéder comme spécifié en (3.2.3.4).

**3.2.6 GELOSE AU CITRATE DE FER ET AUX
TROIS SUCRES (GELOSE TSI)****COMPOSITION**

Extrait de viande	3,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Peptone	20,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Glucose	1,0 g
Citrate de fer (III)	0,3 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Rouge de phénol	0,024 g
Agar-agar	12,0 g
Eau	1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants du milieu déshydraté ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,4 ± 0,1.

— Répartir le milieu, par quantités de 10 ml, dans des tubes de 17 mm à 18 mm de diamètre.

— Stériliser le milieu durant 10 min à 121 ± 1° C.

— Laisser reposer en position inclinée de façon à obtenir un culot de 2,5 cm de profondeur et une pente de 4 cm à 5 cm.

**3.2.7 GELOSE POUR LA RECHERCHE A
L'UREASE (CLIRISTENSEN)****3.2.7.1 MILIEU DE BASE****COMPOSITION :**

Peptone	1,0 g
Glucose	1,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g

Dihydrogéo-orthophosphate de potassium
(KH_2PO_4) 2,0 g
Rouge de phénol 0,012 g
Agar - agar 15,0 g
Eau 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants de base déshydratés ou le milieu de base complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $6,8 \pm 0,1$.

— Stériliser le milieu de base durant 15 min à $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.7.2 SOLUTION D'UREE

COMPOSITION :

Urée 400 g
Eau, quantité suffisante pour 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre l'urée dans l'eau.

— Stériliser par filtration et contrôler la stérilité. (selon la technique de stérilisation par filtration).

3.2.7.3 MILIEU COMPLET

COMPOSITION :

Milieu de base (3.2.7.1) 950 ml
Solution d'urée (3.2.7.2) 50 ml

PREPARATION :

— Ajouter stérilement la solution d'urée au milieu de base préalablement fondu puis refroidi à 45°C .

— Répartir le milieu complet, par quantités de 10 ml, dans des tubes stériles.

— Laisser reposer en position inclinée.

3.2.8 MILIEU DE DECARBOXYLATION A LA LYSINE

COMPOSITION :

Monohydrochlorure de L-lin 5,0 g
Extrait de levure 3,0 g
Glucose 1,0 g
Pourpre de bromocrésol 0,015 g
Eau 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,0 \pm 0,1$.

— Répartir le milieu, par quantités de 5 ml, dans des tubes de culture d'environ 8 mm de diamètre et 160 mm de longueur. Stériliser le milieu durant 10 minutes à $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

3. 3 REACTIFS

3. 3.1 SOLUTION SALINE

COMPOSITION :

Chlorure de sodium 8,5 g
Eau 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre le chlorure de sodium dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,0 \pm 0,1$.

— Répartir la solution dans des flacons ou dans des tubes, de sorte qu'après stérilisation, ils contiennent 90 à 100 ml de solution.

— Stériliser la solution durant 15 minutes à $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

3. 3. 2 REACTIFS POUR LA RECHERCHE DE β -GALACTOSIDASE

3. 3. 2.1 TOLUENE

3. 3. 2. 2 SOLUTION TAMPON

COMPOSITION :

Dihydrogéo-orthophosphate de sodium
(NaH_2PO_4) 6,9 g
Hydroxyde de sodium, Sol. 0, 1 mol/l 3 ml
Eau, quantité suffisante pour 50 ml

PREPARATION :

— Dissoudre le dihydrogéo-orthophosphate de sodium dans environ 45 ml d'eau.

— Ajuster le PH à $7,0 \pm 0,1$ avec environ 3 ml de la solution d'hydroxyde de sodium.

— Compléter à 50 ml avec de l'eau.

3.3.2.3 SOLUTION d'Orthonitrophényl - β - D - galactopyranoside (ONPG)

COMPOSITION :

(ONPG) 0,08 g
Eau 15 ml

PREPARATION :

— Dissoudre l'ONPG dans l'eau à 50°C .

— Refroidir la solution.

3. 3. 2. 4 REACTIF COMPLET**COMPOSITION :**

Solution tampon (3.3.2.2)	5 ml
Solution d'ONPG (3.3.2.3)	15 ml

PREPARATION :

Ajouter la solution tampon à la solution d'ONPG.

**3.3.3 REACTIFS POUR LA REACTION DE VOGES-PROSKAUER (VP).
(METHODE RAPIDE DE BARRY ET FEENEY)**
3.3.3.1 MILIEU VP**COMPOSITION :**

Peptone	7,0 g
Glucose	5,0 g
Hydrogène-orthophosphate dipotassique	5,0 g (K ₂ HPO ₄)
Eau	1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants dans l'eau.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1.

— Répartir 3 ml de milieu dans chacun des tubes.

— Stériliser le milieu durant 15 minutes au maximum, à 121±1° C.

3. 3. 3. 2 SOLUTION DE CREATINE**COMPOSITION :**

Créatine monohydratée (N-amidinosarcosine).....	0,5 g
Eau	100 ml

PREPARATION :

Dissoudre la créatine monohydratée dans l'eau.

3.3.3.3 SOLUTIO ETHANOLIQUE DE NAPHTOL-1**COMPOSITION :**

Naphtol-1	6 g
Ethanol, à 96 % (V/V)	100 ml

PREPARATION :

Dissoudre le naphtol-1 dans l'éthanol.

3.3.3.4 SOLUTION D'HYDROXYDE DE POTASSIUM**COMPOSITION :**

Hydroxyde de potassium	40 g
Eau	100 ml

PREPARATION :

Dissoudre l'hydroxyde de potassium dans l'eau.

3.3.4 REACTIFS POUR LA REACTION DE L'INDOLE**3.3.4.1 MILIEU TRYPTONE - TRYPTOPHANE (DE L - JUTOV)****COMPOSITION :**

Tryptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
DL-Tryptophane	1 g
Eau	1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à ébullition, et filtrer.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,5 ± 0,1.

— Répartir 5ml de milieu dans chacun des tubes.

— Stériliser le milieu durant 15 min à 121 + 1° C.

3.3.4.2 REACTIF DE KOWACS**COMPOSITION :**

Diméthylarnino-4 benzaldéhyde,.....	5 g
Acide chlorhydrique, 1,18 à 1,19 g/ml	25 ml
Méthyl - 2 butanol - 2	75 ml

PREPARATION :

Mélanger les composants.

3.3.5 GELOSE NUTRITIVE SEMI-SOLIDE**COMPOSITION :**

Extrait de viande	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar-agar.....	4 à 9 g
Eau.....	1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants de base déshydratés dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1

— Répartir le milieu dans des flacons de 500 ml de capacité maximale.

— Stériliser le milieu durant 15 minutes à 121 ± 1°C.

PREPARATION DES BOITES DE GELOSE

Répartir le milieu complet, récemment préparé, dans des boîtes de Pétri par quantité d'environ 15 ml. Les boîtes ne doivent pas être séchées.

3.4 SERUMS

Il existe plusieurs sérums anti-salmonella contenant un ou plusieurs groupes "O" (dénommés anti- sérums O monovalents ou polyvalents), des anti-sérums Vi et des anti-sérums contenant des anticorps pour un ou plusieurs facteurs « H » (dénommés anti-sérums H monovalents). Pour chaque sérum, suivre les instructions d'utilisation .

4. APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

4.1 APPAREILLAGE

4.1.1 APPAREILS POUR LA STERILISATION EN CHALEUR SECHE (FOUR) OU EN CHALEUR HUMIDE (AUTOCLAVE).

Le matériel en contact avec les milieux de culture, le diluant et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile et particulièrement celui en plastique, doit être stérilisé :

— soit au four en le maintenant à une température comprise entre 170 °C et 175° C durant au moins 1 heure;

— soit à l'autoclave en le maintenant à une température de $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durant au moins 20 minutes.

Un autoclave est également nécessaire pour la stérilisation des milieux de culture et des réactifs. Il doit être réglable à $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.1.2 **Encainte de séchage** : étuve ou incubateur, ventilé(e) (permettant de sécher la surface des milieux gélosés coulés en boîtes), réglable à $50 \pm 5^\circ\text{C}$.

4.1.3 **Incubateur, réglable** à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.1.4 **Incubateur, réglable** à $43 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

4.1.5 **Bains marie. réglables** à $45 \pm 1^\circ\text{C}$ et à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.1.6 **Homogénéisateurs.**

L'un des appareils suivants doit être utilisé :

a) homogénéisateur rotatif, fonctionnant à une fréquence de rotation comprise entre 8000 t/min. et 45000 t/min , avec des récipients en verre ou en métal, munis de préférence de couvercles et résistant aux conditions de stérilisation ;

b) Homogénéisateur de type péristaltique, avec des sacs en plastique stériles.

Les récipients ou les sacs en plastique doivent être de capacité suffisante pour permettre le mélange correct de l'échantillon pour essai avec le diluant. En général, le volume du récipient doit être égal à environ deux fois le volume de l'échantillon et du diluant.

4.1.7 **Anses bouclées**, en platine ou en nickel-chrome, d'environ 3 mm de diamètre.

4.1.8 **pH-mètre** (permettant de mesurer le pH des milieux et réactifs préparés), avec une précision de réglage de $\pm 0,1$ unité de pH à 25°C .

4.1.9 **Réfrigérateur** (permettant de conserver les milieux et réactifs préparés), réglable à $0 - 5^\circ\text{C}$

4.2 VERRERIE

La verrerie doit pouvoir résister à des stérilisations répétées.

4.2.1 **Flacons de culture** , pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture et l'incubation des milieux liquides.

4.2.2 **Tubes de culture** , de 8 mm de diamètre et 160 mm de longueur, pour le milieu de décarboxylation à la lysine.

4.2.3 **Eprouvettes graduée** s, pour la préparation des milieux complets.

4.2.4 **Pipettes graduées** en verre de 25 ml, 10 ml et 1 ml, graduées respectivement en 0,5 ml et 0,1 ml.

4.2.5. **Boîtes de Pétri.**

5. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI.

6.1 LAIT

— Agiter vigoureusement l'échantillon pour essai afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes , en inversant rapidement 25 fois le récipient avec l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien la laisser se disperser.

— L'intervalle entre le mélange et le prélèvement de l'échantillon pour essai ne doit pas dépasser 3 minutes.

6.2 LAIT SEC, POUDRE DE LACTOSERUM, BABEURRE EN POUDRE , LACTOSE , CASEINE

— Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en secouant manuellement et en inversant de façon répétée. Si le récipient est trop rempli pour permettre une agitation vigoureuse, prendre un récipient plus grand pour mélanger.

6.3 BEURRE

— Faire fondre l'échantillon dans un récipient stérile dans un bain-marie maintenu à $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ$ (4.1.5.).

— Agiter lorsqu'on fait fondre et retirer le récipient immédiatement du bain-marie lorsque l'échantillon vient d'être fondu.

6.4 FROMAGE

Habituellement, un (1) échantillon pour laboratoire constituera l'échantillon pour essai. Procéder alors comme au point (7.1.5).

6.5 GLACES DE CONSOMMATION

Procéder comme dans le cas du beurre (6.3) mais en utilisant un bain-marie maintenu à 37°C (4.1.5), de façon que l'échantillon ne doit pas dépasser cette température.

6.6 LAITS FERMENTES, YAOURTS, CREMES-DESSERT

Mélanger le contenu du récipient fermé, en secouant manuellement et en inversant de façon répétée, et ouvrir le récipient et mélanger le contenu aseptiquement à l'aide d'une spatule ou d'une cuillère stérile.

7. MODE OPERATOIRE

7.1 PRISE D'ESSAI ET PREENRICHISSEMENT

— Introduire la prise d'essai dans le milieu de pré-enrichissement et opérer comme décrit en (7.1.1) à (7.1.7).

— Pour une récapitulation des modes opératoires de pré-enrichissement et d'enrichissement, se reporter au tableau 1.

7.1.1 LAIT

Un pré-enrichissement n'est pas nécessaire, se reporter à (7.2) en utilisant 25 ml de l'échantillon pour essai et 225ml du milieu d'enrichissement, respectivement.

7.1.2 LAIT SEC

— Préparer un flacon bouché contenant 225 ml d'eau distillée stérile et 1 ml de la solution de vert brillant (3.2.2.4). Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai et le verser à la surface du liquide dans le flacon.

— Boucher le flacon, mais ne pas l'agiter. Laisser reposer à la température ambiante durant 60 ± 10 minutes avant incubation. L'ajustement du pH n'est pas nécessaire.

Si après 3 heures d'incubation, le lait sec n'est pas encore dissout, mélanger le contenu du flacon par agitation.

7.1.3 LAIT SEC. BABEURRE SEC

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant 225 ml d'eau distillée stérile.

— Agiter jusqu'à dissolution et ajouter 1 ml de la solution de vert brillant (3.2.2.4).

7.1.4 LACTOSE

Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant 225 ml du milieu de pré-enrichissement (3.2.1) et agiter jusqu'à dissolution.

7.1.5 CASEINE FROMAGE

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans le récipient stérile d'un homogénéisateur à grande vitesse ou de type péristaltique (4.1.6) et ajouter 225 ml du milieu de pré-enrichissement (3.2.1) à 45° C.

— Mélanger jusqu'à ce que la prise d'essai soit totalement dispersée (1 à 3 minutes).

S'assurer que la température de dispersion ne dépasse pas 45°C.

7.1.6 BEURRE

— Agiter l'échantillon pour essai fondu, et à l'aide d'une pipette, porter à environ 45 ° C, en introduire 25 ml dans un flacon contenant 225 ml du milieu de pré-enrichissement (3.2.1). Mélanger.

7.1.7 PRODUITS LAITIERS CONGELES (y compris les glaces de consommation).

Introduire, à l'aide d'une pipette, 25 ml de l'échantillon pour essai fondu, dans un flacon contenant 225 ml du milieu de pré-enrichissement (3.2.1). Mélanger.

7.1.8 LAITS FERMENTES, YAOURTS, CREMES-DESSERT

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant des billes de verre et 225 ml du milieu de pré-enrichissement (3.2.1) et agiter pour disperser.

— Sauf spécifications contraires, contrôler le pH de la suspension et l'ajuster, si nécessaire, à 7,0.

7.1.9 INCUBATION

Incuber les flacons préparés conformément à (7.1.2) jusqu'à (7.1.8), à 37° C durant 16 h. à 20 heures.

7.2 ENRICHISSEMENT

7.2.1 Transférer, à l'aide d'une pipette, 10 ml du milieu de pré-enrichissement incubé (7.1) dans un flacon contenant 100 ml du milieu d'enrichissement sélectif au tétrathionate (3.2.2).

Dans le cas du lait, transférer aseptiquement 25 ml de l'échantillon pour essai dans 225 ml du milieu au tétrathionate (3.2.2).

7.2.2 Incuber le milieu au tétrathionate inoculé durant 18 h. à 24 heures à 43 °C $\pm 0,5$.

7.3 ENSEMENCEMENT ET IDENTIFICATION

7.3.1 Ensemencer avec une anse, à partir de la culture du milieu d'enrichissement, la surface d'une boîte de gélose au vert brillant et au rouge de phénol (3.2.3) et d'une boîte de gélose au sulfite de bismuth (3.2.4), de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

Remettre le milieu d'enrichissement en incubation (voir 7.3.3).

7.3.2 Incuber les boîtes (retournées) à 37 ± 1 °C durant 20 h. à 24 heures.

7.3.3 Après incubation des flacons durant encore 18 h. à 24 heures, répéter les opérations d'ensemencement et d'incubation décrites en (7.3.1) et (7.3.2).

7.3.4 Examiner les boîtes (7.3.2) et (7.3.3) après incubation afin de rechercher la présence de colonies typiques de salmonella. Si le développement est faible, et s'il n'y a pas de colonies typiques de salmonella, incuber à nouveau les boîtes à 37 ± 1 °C durant 18 h. à 24 heures et réexaminer les boîtes pour rechercher la présence de colonies typiques de salmonella.

7.3.5 Les colonies typiques de salmonella peuvent être caractérisées comme suit :

— sur gélose au vert brillant / rouge de phénol (3.2.3), les colonies typiques de salmonella sont roses bordées de rouge.

— sur gélose au sulfite de bismuth (3.2.4), les colonies typiques de salmonella sont brunes ou noires avec un éclat métallique. Certaines souches donnent des colonies vertes.

Tableau 1 – Récapitulation des modes opératoires de pré-enrichissement et d'enrichissement

Produit	Taille de l'échantillon	Milieu de pré-enrichissement*	Méthode de préparation	Milieu d'enrichissement
Lait	50 ml (2x25ml)	Néant	Mélanger	225ml de tétrathionate
Lait sec	25 g	Eau distillée plus solution de vert brillant	Imprégner pendant 60 ± 10 mn ne pas mélanger **	100ml de tétrathionate
Lacto-sérum sec Babeurre sec	25 g	Eau distillée plus solution de vert brillant	Mélanger	100ml de tétrathionate
Lactose	25 g	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger	100ml de tétrathionate
Caséine, Fromage	25 g	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger à 45°C max.	100ml de tétrathionate
Beurre	25 g	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger	100ml de tétrathionate
Produits laitiers congelés	25 ml	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger	100ml de tétrathionate
Laits fermentés Yaourts, Crèmes dessert	25 g	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger	100ml de tétrathionate

(*) Lorsque le milieu de pré-enrichissement est utilisé, après incubation de 20 h à 37 °C, repiquer 10 ml de l'échantillon incubé, mélanger au milieu de pré-enrichissement dans le milieu d'enrichissement.

(**) Si après 3 h d'incubation, le lait sec n'est pas encore dissous, mélanger le contenu des flacons par agitation.

7.4 CONFIRMATION

7.4.1 CHOIX DES COLONIES POUR LES CONFIRMATIONS

A partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs (7.3.5), prélever 5 colonies typiques ou suspectes ou, s'il y a moins de 5 colonies typiques ou suspectes, les prélever toutes pour confirmation.

7.4.2 INCUBATION

Ensemencer les colonies sélectionnées sur la surface des boîtes de gélose nutritive (3.2.5) de façon à permettre le développement de colonies bien isolées et incuber les boîtes à 37 ± 1 °C durant 18 h. à 24 heures.

Après incubation, retenir les colonies pures bien isolées pour les confirmations biochimiques et sérologiques.

7.4.3 CONFIRMATION BIOCHIMIQUE

A l'aide d'un fil à ensemencement, ensemencer les milieux suivants avec les colonies pures.

7.4.3.1 GELOSE TSI (3.2.6)

Ensemencer la pente de la gélose par des stries et le culot par piqûre.

Incuber durant 24 h à 37 ± 1°C.

Interpréter les modifications du milieu de la façon suivante :

Culot

- Jaune : glucose positif
(fermentation du glucose)
- Rouge ou inchangé .. : glucose négatif
(pas de fermentation du glucose)
- Noir : formation de sulfure d'hydrogène
- Bulles ou fissures : formation de gaz à partir du glucose

Pente

- Jaune : lactose et/ou saccharose positifs (fermentation du lactose et/ou du saccharose)
- Rouge ou inchangé. : lactose et saccharose négatifs (pas de fermentation du lactose ni du saccharose)

7.4.3.2 GELOSE POUR LA RECHERCHE A L'UREASE (3.2.7)

Ensemencer par des stries la pente de la gélose.

Incuber durant 24 h à 37 °C ± 1°.

La présence d'uréase produit un dégagement d'ammoniac faisant virer le rouge de phénol au rose puis au rouge foncé lorsque la réaction est positive.

7.4.3.3 MILIEU DE DECARBOXYLATION A LA LYSINE (3.2.8)

— Ensemencer le milieu juste au-dessous de la surface du liquide.

— Incuber durant 24 h à 37 ± 1°C.

Une couleur violette, après incubation indique une réaction positive.

Une couleur jaune indique une réaction négative.

7.4.3.4 REACTIF POUR LA RECHERCHE DE LA β GALACTOSIDASE (3.3.2)

— Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube contenant 0,25 ml de la solution saline (3.3.1).

— Puis ajouter une goutte de toluène et agiter le tube.

— Mettre le tube au bain marie à 37 ± 1°C durant plusieurs minutes.

— Puis ajouter 0,25 ml du réactif pour la recherche de la β-galactosidase et mélanger.

— Replacer le tube dans le bain marie à 37 ± 1°C durant 24 heures.

Une couleur jaune indique une réaction positive.

La réaction est souvent visible au bout de 20 minutes.

7.4.3.5 MILIEU POUR LA REACTION DE VOGES - PROSKAUER (V.P) (3.3.3) :

— Ensemencer deux tubes par suspension d'une anse de la colonie suspecte dans 0,2 ml du milieu VP (3.3.3.1) dans chaque tube.

— Incuber un tube à la température ambiante et l'autre à 37° C durant 24 heures.

Après incubation, ajouter à chaque tube 2 gouttes de la solution de créatine (3.3.3.2), 3 gouttes de la solution éthanolique naphthol-1 (3.3.3.3), puis 2 gouttes de la solution d'hydroxyde de potassium (3.3.3.4); agiter les deux tubes après avoir ajouté chaque réactif.

Un virage du rose au rouge vif dans un délai de 15 minutes indique une réaction positive.

7.4.3.6 MILIEU POUR LA REACTION DE L'INDOLE (3.3.4) :

— Ensemencer avec une partie de la colonie un tube contenant 5 ml du milieu tryptone-tryptophane (3.3.4.1).

— Incuber durant 24 h. à 37 ± 1° C.

— Après incubation, ajouter 2 à 3 gouttes du réactif Kowacs (3.3.4.2).

La formation d'un anneau rouge indique une réaction positive.

Un anneau jaune - brun indique une réaction négative.

TABLEAU 2
INTERPRETATION DES RESULTATS

Essais de confirmation	Réaction positive ou négative	Pourcentage de souches de salmonella présentant la réaction
Glucose TSI (Formation d'acide) (7.4.3.1)	+	100
Glucose TSI (Formation de gaz) (7.4.3.1)	+	91,9
Lactose TSI (7.4.3.1)	- (1)	99,2
Saccharose TSI (7.4.3.1)	-	99,5
Sulfure d'hydrogène TSI (7.4.3.2.)	+	91,6
Décomposition de l'urée (7.4.3.2)	-	100
Décarboxylation à la lysine (7.4.3.3)	+	94,6
Réaction de la β galactosidase (7.4.3.4)	- (2)	98,5
Réaction de Voges-Proskauer (7.4.3.5)	-	100
Réaction de l'indole (7.4.3.6)	-	98,9

INTERPRETATION DES ESSAIS BIOCHIMIQUES

Interpréter les résultats selon le tableau 2.

TABLEAU 2

INTERPRETATION DES RESULTATS

(Voir tableau 2).

(1) Les salmonella du sous-genre III (Arizona) donnent une réaction positive ou négative au lactose mais toujours une réaction positive à la β galactosidase.

(2) Les salmonella du sous-genre II donnent une réaction négative au lactose, mais peuvent donner une réaction positive à la β galactosidase.

7.4.4 SYSTEMES DE DIAGNOSTIC RAPIDE

Les systèmes de diagnostic rapide (3.1) peuvent être utilisés à la place des opérations décrites en (7.4.3) pour la confirmation biochimique des colonies typiques ou suspectes.

Dans ce cas, les instructions d'utilisation doivent être scrupuleusement suivies.

7.4.5 CONFIRMATION SEROLOGIQUE

La détection de la présence des antigènes O, Vi et H des salmonella est effectuée par une agglutination sur lame avec des sérums appropriés, sur des colonies pures (7.4.1) après l'élimination des souches auto-agglutinables.

7.4.5.1 ELIMINATION DES SOUCHES AUTO - AGGLUTINABLES

— Déposer sur une lame de verre parfaitement propre une goutte de la solution saline (3.3.1).

— Disperser dans cette goutte, une partie de la colonie (7.4.2) à essayer afin d'obtenir une suspension homogène et trouble.

— Faire osciller la lame durant 30 secondes à 60 secondes.

— Observer les résultats sur fond noir, de préférence avec l'aide d'une loupe.

— Les souches sont considérées comme auto-agglutinables si les bactéries ont flocculé en amas plus ou moins distincts. La confirmation sérologique de ces souches auto-agglutinables par les modes opératoires spécifiés en (7.4.5.2), (7.4.5.3) et (7.4.5.4) est impossible.

7.4.5.2 MISE EN EVIDENCE DES ANTIGENES O

— Utiliser des souches pures (7.4.2) non auto-agglutinables (7.4.5.1).

— Opérer comme en (7.4.5.1), mais utiliser une goutte d'anti-sérum O (3.4) à la place de la solution saline.

— Utiliser les sérums mono ou polyvalents l'un après l'autre.

7.4.5.3 MISE EN EVIDENCE DES ANTIGENES Vi

Opérer comme en (7.4.5.2), mais utiliser une goutte d'anti-sérum Vi (3.4) à la place de la solution saline.

7.4.5.4 MISE EN EVIDENCE DES ANTIGENES H

— Ensemencer la gélose nutritive semi-solide (3.3.5) avec une souche pure non auto-agglutinable (7.4.5.1).

— Incuber le milieu durant 18 h. à 24 heures à 37 ± 1° C.

Utiliser cette culture pour l'examen des antigènes H en opérant comme en 7.4.5.2, mais en utilisant une goutte de l'anti-sérum H (3.4) à la place de la solution saline.

7.4.5.5 INTERPRETATION DES REACTIONS SEROLOGIQUES

S'il y a agglutination, les réactions sont considérées comme positives.

7.4.6 INTERPRETATION DES REACTIONS BIOCHIMIQUES ET SEROLOGIQUES

7.4.6.1. Les souches sont considérées comme étant des salmonella si elles présentent des réactions biochimiques typiques (7.4.3) et donnent des réactions sérologiques positives suivant (7.4.5).

7.4.6.2 Les souches qui présentent des réactions biochimiques typiques (7.4.3) mais qui ne donnent pas de réactions sérologiques positives suivant (7.4.5), les souches qui ne présentent pas de réactions biochimiques typiques (7.4.3), mais donnent des réactions sérologiques positives suivant (7.4.5), et les souches auto-agglutinables qui présentent des réactions biochimiques typiques (7.4.3) peuvent être des salmonella.

7.4.6.3 Les souches ne sont pas considérées comme étant des salmonella si elles ne présentent pas de réactions biochimiques typiques (7.4.3) et ne donnent pas de réactions sérologiques positives suivants (7.4.5).

7.4.7 CONFIRMATION DEFINITIVE

Pour les souches considérées comme étant des salmonella (7.4.6.1) ou pouvant l'être (7.4.6.2), une identification doit être effectuée en vue d'une détermination définitive du sérotype .

8. CULTURES DE CONTROLE

Pour vérifier la capacité des milieux d'enrichissement et d'identification de supporter le développement de salmonella, une souche de référence isolée nouvellement doit être utilisée pour contrôler les milieux d'enrichissement (7.2).

Les opérations de contrôle doivent alors suivre celles des cultures du matériau d'essai pour montrer qu'on retrouve la culture contrôle positive.

9. EXPRESSION DES RESULTATS

Selon les résultats de l'interprétation, indiquer la présence ou l'absence de salmonella dans la prise d'essai, en précisant la masse, en grammes, ou le volume, en millilitres, de l'échantillon analysé.

Schéma du mode opératoire

