

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 8 Jomada El Oula 1438 correspondant au 5 février 2017 rendant obligatoire la méthode horizontale pour la recherche des *salmonella* spp.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 15-125 du 25 Rajab 1436 correspondant au 14 mai 2015, modifié, portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret présidentiel n° 17-25 du 19 Rabie Ethani 1438 correspondant au 18 janvier 2017 chargeant le ministre de l'habitat, de l'urbanisme et de la ville de l'intérim du ministre du commerce ;

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, notamment son article 19 ;

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

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaâda 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 13- 328 du 20 Dhou EL Kaâda 1434 correspondant au 26 septembre 2013 fixant les conditions et les modalités d'agrément des laboratoires au titre de la protection du consommateur et de la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 15- 172 du 8 Ramadhan 1436 correspondant au 25 juin 2015 fixant les conditions et les modalités applicables en matière des spécifications microbiologiques des denrées alimentaires ;

Vu l'arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons pour essai et des dilutions en vue de l'examen microbiologique ;

Vu l'arrêté du 28 Rajab 1435 correspondant au 28 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique ;

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 la méthode horizontale pour la recherche des *salmonella* spp .

Art. 2. — Pour la recherche des *salmonella* spp, les laboratoires de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet, doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être 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 8 Jomada El Oula 1438 correspondant au 5 février 2017.

Abdelmadjid TEBBOUNE.

ANNEXE

METHODE HORIZONTALE POUR LA RECHERCHE DES *SALMONELLA* SPP

1. DOMAINE D'APPLICATION :

La présente méthode a pour objet de fixer une technique horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp, incluant *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi. Elle est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

NOTE 1- Cette méthode peut ne pas permettre de retrouver toutes les *Salmonella* Typhi et Paratyphi.

2. TERMES ET DEFINITIONS :

Au sens de la présente méthode, il est entendu par :

2.1 *Salmonella* :

Micro-organismes formant des colonies typiques ou moins typiques sur des milieux sélectifs solides et possédant les caractéristiques biochimiques et sérologiques décrites lorsque l'essai est exécuté selon la présente méthode.

2.2 Recherche des *Salmonella* :

Détermination de la présence ou de l'absence de *Salmonella* (2.1) dans une quantité déterminée de produit.

3. PRINCIPE :

3.1. Généralités :

La recherche de *Salmonella* nécessite quatre (4) phases successives (A : schéma du mode opératoire).

NOTE 2- Les *Salmonella* peuvent, en effet, être présentes en petit nombre et sont souvent accompagnées d'un nombre beaucoup plus grand que d'autres micro-organismes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceæ* ou à d'autres familles.

En conséquence, un préenrichissement et un enrichissement sélectif sont souvent nécessaires, afin de pouvoir rechercher les *Salmonella* en nombre restreint ou ayant subi une altération.

3.2. Préenrichissement en milieu non sélectif liquide :

Ensemencement de la prise d'essai dans de l'eau peptonée tamponnée à la température ambiante, puis incubation à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Pour certains aliments (8.1.2), l'utilisation d'autres modalités de préenrichissement est nécessaire.

En cas de grandes quantités, il convient de chauffer l'eau peptonée tamponnée à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ avant l'ensemencement de la prise d'essai.

3.3. Enrichissement en milieux sélectifs liquides :

Ensemencement du bouillon Rappaport-Vassiliadis avec Soja (bouillon RVS) et d'un bouillon Muller-Kauffmann au Tétrathionate-novobiocine (MKTTn) avec la culture obtenue en (3.2).

Incubation du bouillon RVS à $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ et du bouillon MKTTn à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

3.4. Isolement et identification :

A partir des cultures obtenues en (3.3), ensemencement de deux milieux sélectifs solides :

— gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD) ;

— un autre milieu sélectif solide approprié, laissé au choix du laboratoire, complémentaire du milieu gélosé XLD, permettant la recherche de *Salmonella* lactose positive, incluant *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi.

Incubation du milieu gélose XLD à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ puis examen après $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Incubation du second milieu sélectif selon les recommandations du fabricant.

NOTE 3- La gélose au vert brillant (BGA: brillant green agar) et la gélose au sulfite de bismuth, etc, pourraient être utilisées comme second milieu d'isolement.

3.5. Confirmation :

Repiquage des colonies présumées de *Salmonella* isolées en (3.4), et confirmation au moyen des essais biochimiques et sérologiques appropriés.

4. MILIEUX DE CULTURE, RÉACTIFS ET SÉRUM :

4.1. Milieux de culture et réactifs :

NOTE 4- En raison du nombre important de milieux de culture et de réactifs, il a été jugé important, pour une meilleure compréhension de la méthode, de donner leur composition et leur préparation dans (B) de la présente méthode.

4.1.1. Milieu de préenrichissement non sélectif : eau peptonée tamponnée (B- point B.1).

4.1.2. Premier milieu d'enrichissement sélectif : bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS) (B-point B.2).

4.1.3. Deuxième milieu d'enrichissement sélectif : bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (bouillon MKTTn) (B-point B.3).

4.1.4. Milieux d'isolement sélectifs solides :

4.1.4.1. Premier milieu : gélose au xylose lysine désoxycholate (gélose XLD) (B-point B.4).

4.1.4.2. Deuxième milieu :

Le choix du deuxième milieu est laissé à l'initiative du laboratoire d'essais. Il convient de suivre scrupuleusement les instructions du fabricant quant à sa préparation.

4.1.5. Gélose nutritive (B-point B.5).

4.1.6. Gélose au citrate de fer et aux trois sucres (gélose TSI) (B-point B.6).

4.1.7. Gélose à l'urée (Christensen) (B-point B.7).

4.1.8. Milieu pour décarboxylation de la L-lysine (B-point B.8).

4.1.9. Réactif pour la recherche de la β -galactosidase (ou disques de papier préparés et utilisés selon les instructions du fabricant) (B-point B.9).

4.1.10. Réactifs pour la réaction de Voges-Proskauer (réaction VP) (B-point B.10).

4.1.11. Réactifs pour la recherche de l'indole (B-point B.11).

4.1.12. Gélose nutritive semi-solide (B-point B.12).

4.1.13. Solution saline physiologique (B-point B.13).

4.2. Sérums :

Sérums agglutinants contenant des anticorps contre un ou plusieurs facteurs antigéniques «O», c'est-à-dire des antisérums contenant un ou plusieurs groupes «O» (dénommés antisérums «O» monovalents ou polyvalents), des antisérums «Vi» et des antisérums contenant des anticorps contre un ou plusieurs facteurs «H» (dénommés antisérums «H» monovalents ou polyvalents).

Il est important de s'assurer que les antisérums utilisés conviennent pour la recherche de tous les sérotypes de *Salmonella*. Dans ce but, des antisérums préparés par un fournisseur dont la compétence est reconnue, peuvent être utilisés.

5. APPAREILLAGE ET VERRERIE :

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

5.1. Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

5.2. Enceinte de séchage ou étuve ventilée par convection réglable entre 37 °C et 55 °C.

5.3. Étuve réglable à 37 °C ± 1 °C.

5.4. Bain d'eau réglable à 41,5 °C ± 1 °C ou **étuve** réglable à 41,5 °C ± 1 °C.

5.5. Bains d'eau réglables de 44 °C à 47 °C.

5.6. Bain d'eau réglable à 37 °C ± 1 °C.

Il est recommandé d'utiliser des bains d'eau [(5.4), (5.5) et (5.6)] contenant un agent antibactérien, la dose infectante de *Salmonella* étant faible.

5.7. Anses bouclées d'environ 3 mm de diamètre ou 10 µl ou **pipettes stériles**.

5.8. pH-mètre ayant une précision de réglage de ± 0,1 unité de pH de 20 °C à 25 °C.

5.9. Tubes à essai ou **flacons** de capacité appropriée.

Des bouteilles ou flacons à capsules métalliques ou en matière plastique à vis non toxiques peuvent être utilisés.

5.10. Pipettes graduées ou **pipettes automatiques** de 10 ml et 1 ml de capacités nominales, graduées respectivement en divisions de 0,5 ml et 0,1 ml.

5.11 Boîtes de Pétri de petites dimensions (diamètre de 90 mm à 100 mm) et/ou de grandes dimensions (diamètre de 140 mm).

NOTE 5- Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si les spécifications sont similaires.

6. ÉCHANTILLONNAGE :

L'échantillon doit être réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

7. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI :

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode spécifique du produit concerné.

8. MODE OPERATOIRE (A : schéma du mode opératoire).

8.1. Prise d'essai et suspension mère :

8.1.1. Généralités :

Pour la préparation de la suspension mère, utiliser dans le cas général comme diluant le milieu de préenrichissement spécifié en (4.1.1) et (3.2).

Si la masse de la prise d'essai spécifiée n'est pas de 25 g, utiliser la quantité nécessaire de milieu de préenrichissement pour obtenir une dilution au 1/10.

Lorsqu'on doit examiner plus d'une prise d'essai de 25 g provenant d'un lot déterminé de produit alimentaire, les prises d'essai peuvent être mélangées, à condition que ce mélange ne modifie pas les résultats d'analyse en ce qui concerne ce produit alimentaire en particulier.

Par exemple, si on doit examiner 10 prises d'essai de 25 g, il est possible de combiner ces 10 unités afin d'obtenir une prise d'essai composée de 250 g et ajouter 2,25 ℓ de bouillon de préenrichissement ou bien encore, réunir les portions de 0,1 ml (dans 10 ml de bouillon RVS) et de 1 ml (dans 10 ml de bouillon MKTTn) des bouillons de préenrichissement provenant des 10 prises d'essai séparées (8.3.1) pour en enrichir 100 ml des milieux d'enrichissement sélectifs.

8.1.2. Préparations spécifiques de la suspension mère pour certains aliments :

8.1.2.1. Cacao et produits contenant du cacao (par exemple, plus de 20 %) :

Ajouter à l'eau peptonée tamponnée (4.1.1) de préférence 50 g/l de caséine (éviter l'emploi de caséine acide) ou bien 100 g/l de lait écrémé en poudre et ajouter, après environ 2 h d'incubation, 0,018 g/l de vert brillant s'il est probable que le produit soit fortement contaminé par des flores Gram positif.

8.1.2.2. Aliments acides et acidifiants :

S'assurer que la valeur du pH ne descende pas au-dessous de 4,5 pendant le préenrichissement.

NOTE 6- Le pH d'aliments acides et acidifiants est plus stable quand l'eau peptonée tamponnée à double titre est utilisée.

8.2. Préenrichissement non sélectif :

Incuber la suspension mère (8.1) à 37 °C ± 1 °C pendant 18 h ± 2 h.

8.3. Enrichissement sélectif :

8.3.1. Transférer 0,1 ml de la culture obtenue en (8.2) dans un tube contenant 10 ml de bouillon RVS (4.1.2) et également, transférer 1 ml de la culture obtenue en (8.2) dans un tube contenant 10 ml de bouillon MKTTn (4.1.3).

8.3.2. Incuber le bouillon RVS ensemencé (8.3.1) à 41,5 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 3 h et le bouillon MKTTn à 37 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 3 h. Il convient de s'assurer que la température maximale d'incubation ne dépasse, à aucun moment, 42,5 °C pour le bouillon RVS.

8.4. Isolement et identification :

8.4.1. A partir de la culture obtenue dans le bouillon RVS (8.3.2) après 24 h ± 3 h d'incubation, ensemencer avec une anse (5.7) la surface d'une grande boîte de Petri (5.11) contenant le milieu d'isolement sélectif [gélose XLD, (4.1.4.1)], de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

A défaut de grandes boîtes, utiliser deux petites boîtes, l'une après l'autre, en se servant de la même anse.

Procéder de la même manière avec le deuxième milieu d'isolement sélectif (4.1.4.2) en se servant d'une nouvelle anse et de boîtes de Petri de dimensions appropriées.

8.4.2. A partir de la culture obtenue dans le bouillon MKTTn (8.3.2) après 24 h ± 3 h d'incubation, répéter les opérations décrites en (8.4.1) avec les deux milieux d'isolement sélectifs.

8.4.3. Dans le cas du premier milieu d'isolement (4.1.4.1), retourner les boîtes [(8.4.1) et (8.4.2)], les placer dans une étuve (5.3) réglée à 37 °C. Pour le second milieu d'isolement (4.1.4.2), suivre les recommandations du fabricant.

8.4.4. Après 24 h ± 3 h d'incubation, examiner les boîtes (8.4.3) afin de rechercher la présence de colonies typiques de *Salmonella*, ainsi que les colonies atypiques susceptibles d'être des *Salmonella* (note 7). Marquer leur position sur le dessous de la boîte.

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

NOTE 7- Les *Salmonella* H₂S négatif (par exemple *Salmonella* Paratyphi A) cultivées sur la gélose XLD sont roses avec un centre rose foncé et les *Salmonella* lactose positif cultivées sur la gélose XLD sont jaunes sans noircissement.

Incuber le second milieu sélectif à la température et au temps appropriés puis examiner la présence de colonies qui, d'après leurs caractéristiques, peuvent être considérées comme des *Salmonella* présumées.

8.5. Confirmation :

8.5.1. Généralités :

Des kits d'identification biochimique des colonies peuvent être utilisés pour identifier les *salmonella*. Il convient d'utiliser ces kits conformément aux instructions du fabricant.

NOTE 8- L'aspect des colonies de *Salmonella* peut, quelquefois, varier non seulement d'une espèce à une autre, mais également d'un lot de milieu de culture à un autre.

8.5.2. Choix des colonies pour la confirmation :

Pour la confirmation, prélever à partir de chaque boîte (deux boîtes de petites dimensions ou une boîte de grandes dimensions) de chacun des milieux sélectifs (8.4), au moins, une colonie considérée comme caractéristique ou suspecte, puis quatre autres colonies si la première s'est révélée négative.

Dans le cas d'études épidémiologiques, il est recommandé que cinq (5) colonies, au moins, soient identifiées. S'il se trouve qu'une boîte contient moins de cinq (5) colonies caractéristiques ou suspectes, retenir toutes les colonies caractéristiques ou suspectes.

Ensemencer les colonies sélectionnées sur la surface de boîtes de gélose nutritive (4.1.5) préalablement séchées, de façon à permettre le développement de colonies bien isolées. Incuber les boîtes ainsi ensemencées (8.4.3) à 37 °C ± 1 °C durant 24 h ± 3 h.

Utiliser des cultures pures pour les confirmations biochimiques et sérologiques.

8.5.3. Confirmation biochimique :

8.5.3.1. Généralités :

A l'aide d'un fil à ensemencer, ensemencer les milieux indiqués de [(8.5.3.2) à (8.5.3.7)] avec chacune des cultures obtenues à partir des colonies retenues en (8.5.2).

8.5.3.2. Gélose TSI (4.1.6) :

Ensemencer la pente du milieu en stries et le culot par piqûre. Incuber à 37 °C ± 1 °C durant 24 h ± 3 h. Interpréter les phénomènes qui se produisent, de la façon suivante :

a) Culot

- jaune.....glucose positif
(utilisation du glucose)
- rouge ou inchangé.....glucose négatif
(pas d'utilisation du glucose)
- noir.....formation de
sulfure d'hydrogène
- bulles ou fissures..... formation de gaz
à partir du glucose

b) Pente de la gélose

- jaune.....lactose et/ou saccharose
positifs (utilisation
du lactose et/ou du saccharose)
- rouge ou inchangé.....lactose et saccharose
négatifs (pas d'utilisation
du lactose ni du saccharose)

Les cultures caractéristiques de *Salmonella* correspondent à une pente alcaline (rouge) et un culot acide (jaune) avec formation de gaz (bulles) et (dans environ 90 % des cas) formation de sulfure d'hydrogène (noircissement de la gélose) (tableau 1).

Lorsqu'on isole une *Salmonella* lactose positif (3.4), la pente de la gélose TSI est jaune. En conséquence, une confirmation préliminaire de cultures de *Salmonella*, ne doit pas être fondée uniquement sur les résultats obtenus à partir de la gélose TSI (8.5.3.2).

8.5.3.3. Gélose à l'urée (4.1.7) :

Ensemencer en stries la pente de la gélose. Incuber à 37 °C ± 1 °C durant 24 h ± 3 h et examiner de temps en temps.

En cas de réaction positive, la décomposition de l'urée produit un dégagement d'ammoniac, faisant virer le rouge de phénol au rose puis au rouge foncé. La réaction est souvent visible au bout de 2 h à 4 h.

8.5.3.4. Milieu de décarboxylation de la L-lysine (4.1.8):

Ensemencer le milieu liquide juste au-dessous de la surface. Incuber à 37 °C ± 1 °C durant 24 h ± 3 h.

L'apparition d'une turbidité et d'une couleur violette après incubation indique une réaction positive et l'apparition d'une couleur jaune indique une réaction négative.

8.5.3.5. Recherche de la β-galactosidase (4.1.9) :

Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube contenant 0,25 ml de la solution saline (4.1.13).

Ajouter une (1) goutte de toluène et agiter le tube. Placer ce dernier dans le bain d'eau (5.6) réglé à 37 °C et l'y laisser séjourner quelques minutes (environ 5 min). Ajouter 0,25 ml du réactif pour la recherche de la β-galactosidase et mélanger.

Replacer le tube dans le bain d'eau réglé à 37 °C, l'y laisser séjourner 24 h ± 3 h en l'examinant de temps à autre.

Une couleur jaune indique une réaction positive. La réaction est souvent visible au bout de 20 min.

Dans le cas d'utilisation de disques en papier tout préparés (4.1.9), suivre les instructions du fabricant.

8.5.3.6. Milieu pour la réaction de Voges-Proskauer (VP) (4.1.10) :

Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube stérile contenant 3 ml du milieu VP.

Incuber à 37 °C ± 1 °C durant 24 h ± 3 h.

Après incubation, ajouter deux (2) gouttes de la solution de créatine, trois (3) gouttes de la solution éthanolique de naphthol-1 et ensuite deux (2) gouttes de la solution d'hydroxyde de potassium en agitant après avoir ajouté chaque réactif.

La formation d'une coloration rose à rouge brillant dans un délai de 15 min indique une réaction positive.

8.5.3.7. Milieu pour la recherche de l'indole (4.1.11) :

Ensemencer un tube contenant 5 ml du milieu tryptone/tryptophane avec la colonie suspecte et incuber à 37 °C ± 1 °C durant 24 h ± 3 h. Après incubation, ajouter 1 ml du réactif de Kovacs.

La formation d'un anneau rouge indique une réaction positive. Un anneau jaune-brun indique une réaction négative.

8.5.3.8. Interprétation des essais biochimiques :

Les *Salmonella* donnent en général les réactions indiquées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Interprétation des essais biochimiques

Essai [(8.5.3.2) à (8.5.3.7)]	Souche de <i>Salmonella</i>							
	<i>S. Typhi</i>		<i>S. Paratyphi A</i>		<i>S. Paratyphi B</i>	<i>S. Paratyphi C</i>	Autres souches	
	Réaction	% ^a	Réaction	% ^a	Réaction	Réaction	Réaction	% ^a
Glucose, TSI (formation d'acide)	+	100	+	100	+	+	+	100
Glucose, TSI (formation gaz)	..b	0	+	100	+	+	+	92
Lactose, TSI (formation d'acide)	-	2	-	100	-	-	-	1
Saccharose, TSI (formation d'acide)	-	0	-	0	-	-	-	1
Sulfure d'hydrogène, TSI	+	97	-	10	+	+	+	92
Hydrolyse de l'urée	-	0	-	0	-	-	-	1
Décarboxylation de la lysine	+	98	-	0	+	+	+	95
Réaction à la β-galactosidase	-	0	-	0	-	-	-	2 ^c
Réaction de Voges-Proskauer	-	0	-	0	-	-	-	0
Recherche de l'indole	-	0	-	0	-	-	-	1

^a Ces pourcentages indiquent seulement que toutes les souches de *Salmonella* ne donnent pas les réactions marquées par + ou-. Ces pourcentages peuvent varier au sein d'un même sérotype et d'un sérotype à un autre pour les sérotypes ayant causé des empoisonnements alimentaires à différents endroits.

^b *Salmonella* Typhi est anaérogène.

^c Les *Salmonella* enterica du sous-genre arizonæ donnent des réactions lactose positives ou négatives mais sont toujours β-galactosidase positive. Pour l'étude de ces souches, il peut être utile d'effectuer des essais biochimiques complémentaires.

8.5.4. Confirmation sérologique et sérotypage :**8.5.4.1. Généralités :**

La recherche de la présence des antigènes «O», «Vi», ou «H» des *Salmonella* est effectuée par une agglutination sur lame avec les sérums appropriés à partir de colonies pures (8.5.2) et après élimination des souches autoagglutinables.

8.5.4.2. Elimination des souches autoagglutinables :

Déposer une (1) goutte de la solution saline (4.1.13) sur une lame de verre parfaitement propre. À l'aide d'une anse bouclée (5.7), disperser dans cette goutte une fraction de la colonie à tester de manière à obtenir une suspension homogène et trouble.

NOTE 9 - Il est aussi possible de disperser une fraction de la colonie à tester dans une goutte d'eau, puis de mélanger cette solution à une goutte de solution saline (4.1.13).

Faire osciller la lame durant 30 s à 60 s. Observer le résultat sur un fond noir de préférence à l'aide d'une loupe.

Si les bactéries se sont rassemblées en masses plus ou moins distinctes, la souche est considérée comme autoagglutinable et ne doit pas être soumise aux essais suivants et ainsi la mise en évidence des antigènes devient impossible.

8.5.4.3. Mise en évidence des antigènes «O» :

A partir d'une colonie pure reconnue non autoagglutinable, opérer comme en (8.5.4.2), mais en utilisant une (1) goutte de l'antisérum «O» (4.2) au lieu de la solution saline (4.1.13).

S'il y a agglutination, la réaction est considérée comme positive.

Utiliser les sérums polyvalents et monovalents l'un après l'autre.

8.5.4.4. Mise en évidence des antigènes «Vi» :

Opérer comme en (8.5.4.2), mais en utilisant une (1) goutte de l'antisérum «Vi» (4.2) au lieu de la solution saline.

S'il y a agglutination, la réaction est considérée comme positive.

8.5.4.5. Mise en évidence des antigènes «H» :

Ensemencer la gélose nutritive semi-solide (4.1.12) avec une colonie pure non autoagglutinable. Incuber à 37 °C ± 1 °C durant 24 h ± 3 h.

Utiliser cette culture pour l'examen des antigènes «H» en opérant comme en (8.5.4.2), mais en utilisant une (1) goutte de l'antisérum «H» (4.2) au lieu de la solution saline.

S'il y a agglutination, la réaction est considérée comme positive.

8.5.5. Interprétation des réactions biochimiques et sérologiques :

Le Tableau 2 donne l'interprétation des essais de confirmation [(8.5.3) et (8.5.4)] effectués sur les colonies retenues (8.5.2).

8.5.6. Confirmation définitive :

Les souches considérées comme étant des *Salmonella* ou comme pouvant être des *Salmonella* (Tableau 2) doivent être envoyées à un centre agréé pour l'identification des *Salmonella* en vue d'une détermination définitive du sérotype, accompagnées de toutes les informations concernant ces souches.

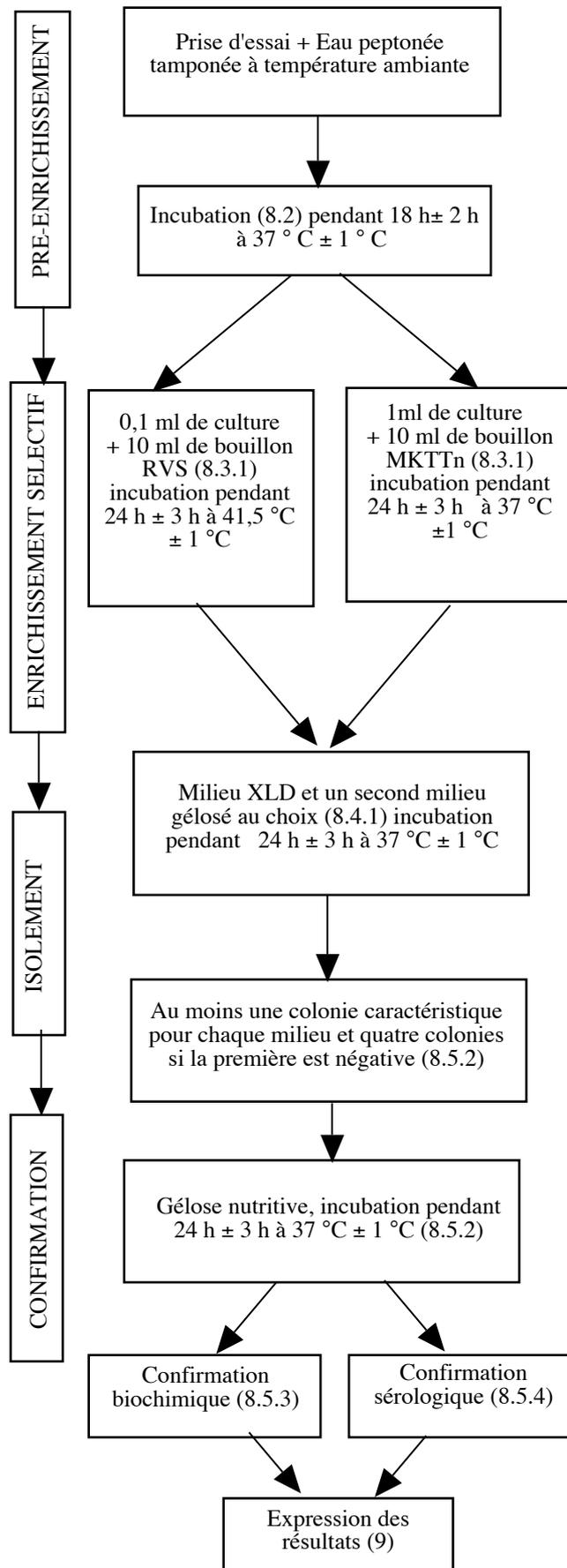
9. EXPRESSION DES RESULTATS :

Selon les résultats de l'interprétation, indiquer la présence ou l'absence de *Salmonella* dans une prise d'essai de x g ou x ml de produit.

Tableau 2 — Interprétation des essais de confirmation

Réactions biochimiques	Auto agglutination	Réactions sérologiques	Interprétation
Typiques	Non	Antigène «O», «Vi» ou «H» positives	Souches considérées comme étant des <i>Salmonella</i>
Typiques	Non	Toutes les réactions négatives	Peuvent être des <i>Salmonella</i>
Typiques	Oui	Non effectuées (9.5.4.2)	
Pas de réactions typiques	Non/Oui	Antigène «O», «Vi» ou «H» positives	Ne sont pas considérées comme étant des <i>Salmonella</i>
Pas de réactions typiques	Non/Oui	Toutes les réactions négatives	

A: Schéma du mode opératoire



B : Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs

B.1. Eau peptonée tamponnée :

B.1.1. Composition :

Digestat enzymatique de caséine.....	10 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Disodium hydrogénophosphate dodécahydraté (Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O).....	9 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄).....	1,5 g
Eau.....	1000 ml

B.1.2 Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau en chauffant, si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7 ± 0,2 à 25 °C.

Répartir le milieu par quantités nécessaires pour l'analyse, dans des flacons de capacité adéquate (5.9).

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.

B.2 Bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS)

B.2.1 Solution A :

B.2.1.1 Composition :

Digestat enzymatique de soja.....	5 g
Chlorure de sodium.....	8 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄).....	1,4 g
Dipotassium hydrogénophosphate (K ₂ HPO ₄).....	0,2 g
Eau.....	1000 ml

B.2.1.2 Préparation :

Si nécessaire, dissoudre les composants dans l'eau en chauffant à 70 °C environ.

Cette solution doit être préparée le jour même de la préparation du milieu RVS.

B.2.2 Solution B :

B.2.2.1 Composition :

Chlorure de magnésium hexahydraté (MgCl ₂ , 6h ₂ O).....	400 g
Eau.....	1000 ml

B.2.2.2. Préparation :

Dissoudre le chlorure de magnésium dans l'eau.

En raison de la forte hygroscopicité du sel, il est conseillé de dissoudre la totalité du $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ contenu dans un récipient récemment ouvert, conformément à la formule de composition citée ci-dessus. Par exemple, 250 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sont ajoutés à 625 ml d'eau pour donner une solution d'un volume final de 788 ml et d'une concentration massique d'environ 31,7 g pour 100 ml de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

Cette solution peut être conservée dans un flacon en verre brun, à la température ambiante pendant deux (2) ans au maximum.

B.2.3. Solution C :**B.2.3.1. Composition :**

Oxalate de vert de malachite.....	0,4 g
Eau.....	100 ml

B.2.3.2. Préparation :

Dissoudre l'oxalate de vert de malachite dans l'eau.

Cette solution peut être conservée dans un flacon de verre brun, à la température ambiante pendant huit (8) mois au maximum.

B.2.4. Milieu complet :**B.2.4.1. Composition :**

Solution A (B.2.1).....	1000 ml
Solution B (B.2.2).....	100 ml
Solution C (B.2.3).....	10 ml

B.2.4.2 Préparation :

Ajouter à 1000 ml de solution A, 100 ml de solution B et 10 ml de solution C.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $5,2 \pm 0,2$.

Répartir dans des tubes à essai (5.9) par quantités de 10 ml avant utilisation.

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à $115 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 15 min.

Conserver le milieu ainsi préparé à $3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. L'utiliser le jour de la préparation.

La composition finale du milieu est la suivante :

Digestat enzymatique de soja.....	4,5 g/l
Chlorure de sodium.....	7,2 g/l
Dihydrogénophosphate de potassium ($KH_2PO_4 + KH_2PO_4$).....	1,44 g/l
Chlorure de magnésium anhydre ($MgCl_2$).....	13,4 g/l
ou Chlorure de magnésium hexahydraté ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$).....	28,6 g/l
Oxalate de vert de malachite.....	0,036 g/l

B.3. Bouillon Muller-Kauffmann au tétrahionate-novobiocine (MKTTn) :**B.3.1. Milieu de base :****B.3.1.1. Composition :**

Extrait de viande.....	4,3 g
Digestat enzymatique de caséine.....	8,6 g
Chlorure de sodium (NaCl).....	2,6 g
Carbonate de calcium ($CaCO_3$).....	38,7 g
Thiosulfate de sodium pentahydraté ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$).....	47,8 g
Sels biliaires à usage bactériologique.....	4,78 g
Vert brillant.....	9,6 mg
Eau.....	1000 ml

B.3.1.2. Préparation :

Dissoudre les composants de base déshydratés ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition durant 5 min.

Si nécessaire, ajuster le pH à $8 \pm 0,2$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et bien homogénéiser le milieu.

Le milieu de base se conserve 4 semaines à $3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

B.3.2. Solution iodo-iodurée :**B.3.2.1. Composition :**

Iode.....	20 g
Iodure de potassium (KI).....	25 g
Eau.....	100 ml

B.3.2.2. Préparation :

Dissoudre complètement l'iodure de potassium dans 10 ml d'eau, puis ajouter l'iode et compléter à 100 ml avec l'eau distillée. Ne pas chauffer.

Conserver la solution ainsi préparée à température ambiante dans un récipient étanche.

B.3.3. Solution de novobiocine :

B.3.3.1 Composition :

Sel monosodique de novobiocine.....	0,04 g
Eau.....	5 ml

B.3.3.2. Préparation :

Dissoudre le sel monosodique de novobiocine dans l'eau et stériliser par filtration.

Conservé cette solution jusqu'à quatre (4) semaines à 3 °C ± 2 °C.

B.3.4. Milieu complet :

B.3.4.1. Composition :

Milieu de base (B.3.1).....	1000 ml
Solution iodo-iodurée (B.3.2).....	20 ml
Solution de novobiocine (B.3.3).....	5 ml

B.3.4.2. Préparation :

Ajouter aseptiquement 5 ml de solution de novobiocine (B.3.3) à 1 000 ml de milieu de base (B.3.1), mélanger puis ajouter 20 ml de solution iodo-iodurée (B.3.2) et homogénéiser le tout.

Répartir stérilement le milieu dans des tubes stériles de capacité appropriée (5.9) en vue de l'analyse. Le milieu complet doit être utilisé le jour de sa préparation.

B.4 Gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD) :

B.4.1. Milieu de base :

B.4.1.1. Composition :

Extrait de levure en poudre.....	3 g
Chlorure de sodium (NaCl).....	5 g
Xylose.....	3,75 g
Lactose.....	7,5 g
Saccharose.....	7,5 g
Hydrochlorure de L-lysine.....	5 g
Thiosulfate de sodium.....	6,8 g
Citrate d'ammonium-fer(III).....	0,8 g
Rouge de phénol.....	0,08 g
Désoxycholate de sodium.....	1g
Gélose.....	9 g à 18 g ¹⁾
Eau.....	1000 ml

¹⁾ Selon le pouvoir gélifiant de la gélose

B.4.1.2. Préparation :

Dissoudre les composants de base déshydratés ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Éviter de surchauffer.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,4 ± 0,2 à 25 °C.

Répartir le milieu de base dans des tubes ou des flacons de capacité appropriée (5.9).

Chauffer en agitant fréquemment jusqu'à ébullition du milieu et dissolution de la gélose. Ne pas surchauffer.

B.4.2. Préparation des boîtes de milieu gélosé :

Transférer immédiatement le milieu dans un bain d'eau (5.5) réglé de 44 °C à 47 °C, agiter et verser dans des boîtes et le 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 l'étuve (5.2) réglée entre 37 °C et 55 °C jusqu'à séchage de la surface de la gélose.

Stocké les boîtes de gélose jusqu'à cinq (5) jours à 3 °C ± 2 °C

B.5. Gélose nutritive :

B.5.1. Composition :

Extrait de viande.....	3 g
Peptone.....	5 g
Gélose.....	9 g à 18 g ¹⁾
Eau.....	1 000 ml

¹⁾ Selon le pouvoir gélifiant de la gélose.

B.5.2. Préparation :

Dissoudre les composants déshydratés ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7 ± 0,2 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des flacons de capacité appropriée (5.9).

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.

B.5.3. Préparation des boîtes de milieu gélosé nutritif :

Couler environ 15 ml du milieu fondu dans des petites boîtes de Petri stériles (5.11) et opérer comme en B.4.2.

B.6. Gélose au citrate de fer et aux trois sucres (gélose TSI) :**B.6.1. Composition :**

Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3 g
Peptone.....	20 g
Chlorure de sodium (NaCl).....	5 g
Lactose.....	10 g
Saccharose.....	10 g
Glucose.....	1g
Citrate de fer (III).....	0,3 g
Thiosulfate de sodium.....	0,3 g
Rouge de phénol.....	0,024 g
Gélose.....	9 g à 18 g ¹⁾
Eau.....	1 000 ml

¹⁾ Selon le pouvoir gélifiant de la gélose.

B.6.2. Préparation :

Dissoudre les composants ou le milieu de base complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,4 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu, par quantités de 10 ml, dans des tubes à essai.

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121°C pendant 15 min.

Laisser reposer en position inclinée de façon à obtenir un culot de 2,5 cm à environ 5 cm de profondeur.

B.7. Gélose à l'urée (Christensen) :**B.7.1. Milieu de base :****B.7.1.1. Composition :**

Peptone	1g
Glucose.....	1g
Chlorure de sodium (NaCl).....	5 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄).....	2 g
Rouge de phénol.....	0,012 g
Gélose.....	9 g à 18 g ¹⁾
Eau.....	1 000 ml

¹⁾ Selon le pouvoir gélifiant de la gélose.

B.7.1.2. Préparation :

Dissoudre les composants ou le milieu de base complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $6,8 \pm 0,2$ à 25°C .

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121°C pendant 15 min.

B.7.2. Solution d'urée :**B.7.2.1. Composition :**

Urée.....	400 g
Eau, quantité suffisante pour un volume final de.....	1000 ml

B.7.2.2. Préparation :

Dissoudre l'urée dans l'eau. Stériliser par filtration et contrôler la stérilité.

B.7.3. Milieu complet :**B.7.3.1. Composition :**

Milieu de base (B.7.1).....	950 ml
Solution d'urée (B.7.2).....	50 ml

B.7.3.2. Préparation :

Ajouter stérilement la solution d'urée au milieu de base préalablement fondu et ramené entre 44°C et 47°C .

Répartir le milieu complet, par quantités de 10 ml, dans des tubes stériles (5.9).

Laisser reposer en position inclinée.

B.8. Milieu pour décarboxylation de la L-lysine :**B.8.1. Composition :**

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

B.8.2. Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $6,8 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu, par quantités de 2 ml à 5 ml, dans des tubes de culture étroits (5.9) munis de capsules filetés.

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121°C pendant 15 min.

B.9. Réactif pour la recherche de la β -Galactosidase :

B.9.1. Solution tampon :

B.9.1.1. Composition :

Dihydrogénophosphate de sodium	
NaH ₂ PO ₄	6,9 g
Hydroxyde de sodium, solution à 10 mol/l.....	environ 3 ml
Eau, quantité suffisante pour un volume final de.....	50 ml

B.9.1.2. Préparation :

Dissoudre le dihydrogénophosphate de sodium dans environ 45 ml d'eau dans une fiole jaugée.

Ajuster le pH à $7 \pm 0,2$ à 25 °C avec la solution d'hydroxyde de sodium.

Compléter à 50 ml avec de l'eau.

B.9.2. Solution d'ONPG :

B.9.2.1. Composition :

o-Nitrophényl β -D-galactopyranoside (ONPG).....	0,08 g
Eau.....	15 ml

B.9.2.2. Préparation :

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

Refroidir la solution.

B.9.3. Réactif complet :

B.9.3.1. Composition :

Solution tampon (B.9.1).....	5 ml
Solution d'ONPG (B.9.2).....	15 ml

B.9.3.2 Préparation :

Ajouter la solution tampon à la solution d'ONPG.

B.10. Réactifs pour la réaction de Voges-Proskauer (VP) :

B.10.1 Milieu VP :

B.10.1.1. Composition :

Peptone.....	7 g
Glucose.....	5 g
Dipotassium hydrogénophosphate (K ₂ HPO ₄).....	5g
Eau.....	1000 ml

B.10.1.2. Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $6,9 \pm 0,2$ à 25 °C.

Transférer le milieu dans des tubes à raison de 3 ml par tube (5.9).

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.

B.10.2 Solution de créatine (N- amidinosarcosine) :

B.10.2.1. Composition :

Créatine monohydratée.....	0,5 g
Eau.....	100 ml

B.10.2.2. Préparation :

Dissoudre la créatine monohydratée dans l'eau.

B.10.3. Solution éthanolique de naphthol-1 :

B.10.3.1. Composition :

Naphthol-1.....	6 g
Ethanol à 96 % (fraction volumique).....	100 ml

B.10.3.2 Préparation :

Dissoudre le naphthol-1 dans l'éthanol.

B.10.4. Solution d'hydroxyde de potassium :

B.10.4.1. Composition :

Hydroxyde de potassium.....	40 g
Eau.....	100 ml

B.10.4.2. Préparation :

Dissoudre l'hydroxyde de potassium dans l'eau.

B.11. Réactifs pour la recherche de l'indole :

B.11.1 Milieu tryptone/tryptophane :

B.11.1.1. Composition :

Tryptone.....	10 g
Chlorure de sodium (NaCl).....	5 g
DL-Tryptophane.....	1 g
Eau	1000 ml

B.11.1.2. Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau bouillante.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,5 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu, par quantités de 5 ml, dans des tubes (5.9).

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121°C pendant 15 min.

B.11.2. Réactif de Kovacs :**B.11.2.1. Composition :**

Diméthylamino-4 benzaldéhyde.....	5 g
Acide chlorhydrique,	
$\rho = 1,18 \text{ g/ml}$ à $1,19 \text{ g/ml}$	25 ml
Méthyl-2 butanol-2.....	75 ml

B.11.2.2 Préparation :

Mélanger les composants.

B.12. Gélose nutritive semi-solide :**B.12.1. Composition :**

Extrait de viande.....	3 g
Peptone.....	5 g
Gélose.....	4 g à 9 g ¹⁾
Eau.....	1 000 ml

¹⁾ Selon le pouvoir gélifiant de la gélose.

B.12.2 Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu dans des flacons de capacité appropriée (5.9).

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121°C pendant 15 min.

B.12.3 Préparation des boîtes de milieu gélosé :

Répartir le milieu récemment préparé, par quantités d'environ 15 ml, dans des petites boîtes de Petri stériles (5.11). Les boîtes de milieu gélosé ne doivent pas être séchées.

B.13 Solution saline physiologique :**B.13.1. Composition :**

Chlorure de sodium (NaCl).....	8,5 g
Eau.....	1000 ml

B.13.2. Préparation :

Dissoudre le chlorure de sodium dans l'eau.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu dans des flacons ou dans des tubes (5.9), de sorte qu'après stérilisation ils contiennent 90 ml à 100 ml de solution.

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121°C pendant 15 min.