

## Tp N°1

### Salmonellose

#### Prélèvement, isolement et identification des salmonelles

##### Echantillonnage

Un prélèvement de gésiers (cuits ou non cuits).

Une fois collectés, les échantillons sont transportés immédiatement au laboratoire (environ 20 minutes) dans des sachets plastiques stériles pris individuellement.

Dix grammes sont prélevés à partir de chaque gésier pour ainsi constituer l'unité d'analyse ou la prise d'essai.

Le gésier est manipulé avec du matériel stérile.

Entre deux dissections les mains sont soigneusement lavées avec de l'eau de Javel à 12° diluée au dixième et abondamment rincées avec de l'eau de robinet, tandis que les couteaux sont stérilisés par flambage à l'alcool.

Le support utilisé comme tare au niveau de la balance (papier aluminium) est utilisé une seule fois par pesée. Les mains, ne rentrent jamais en contact avec l'unité d'analyse pour éviter toute contamination par le manipulateur.

##### Méthode de recherche de *Salmonella*

La recherche de *Salmonella* a été faite en 4 étapes selon la norme ISO 6579: le pré-enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et enfin l'identification.

##### Le pré-enrichissement

La prise d'essai (10g) de gésier cuit est directement mise dans 90 ml d'eau peptonée tamponnée, puis placée à l'étuve à 37°C pendant 20 heures. Ceci permet aux salmonelles (éventuellement présentes) de se multiplier en abondance ; elles deviennent ainsi facilement détectables par la suite.

##### Enrichissement

Dans 10 ml de bouillon de Rappaport de Vassiliadis contenus dans chaque tube à vis stérile, nous mettons 0,1 ml de subculture à l'aide d'une pipette stérile. Les bouillons sont ensuite incubés à l'étuve à 42°C pendant un temps de 18 à 24 heures. La sélectivité du bouillon et la température d'incubation relativement élevée entraînent l'élimination d'une grande partie de la flore d'accompagnement et favorisent la croissance des salmonelles.

### **Isolement**

Deux géloses sélectives ont été utilisées : les géloses SS et Hektoen. Elles sontensemencées par technique de stries d'épuisement à partir d'un même bouillon d'enrichissement et mis en incubation à l'étuve 37°C.

Après 24 heures, les colonies isolées sur les géloses présentant les caractéristiques macroscopiques des salmonelles (colonies incolores à centre noir sur SS et colonies verdâtre ou bleuâtres à centre noir sur Hektoen) sont repiquées sur gélose ordinaire pour être soumises à une identification plus fine. Pour chacune des deux géloses cinq colonies caractéristiques sont prélevées pour l'identification.

### **L'identification**

L'identification des souches de salmonelles fait appel à une sélection biochimiques des isolats analysés, en fonction de réactions biochimiques déterminantes; et à une identification sérologique.

### **Identification de la famille des Entérobactéries**

Cette identification est rendue possible, après avoir vérifié que les souches en question sont réellement des Entérobactéries.

Pour cela, nous avons réalisé un repiquage de cinq colonies suspectes, sur de lagélose sélective (gélose Hektoen), dans le but d'obtenir des souches pures.

Ces souches sont cultivées sur gélose ordinaire (gélose PCA) que nous avons mis à incuber 24 heures à 37°C.

Nous avons par la suite effectué la coloration de Gram et l'observation de l'état frais en vue d'obtenir les caractères majeurs des Entérobactéries.

### **La coloration de Gram**

La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les caractères morphologiques (forme et taille) des bactéries.