



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

 DÉTECTION DES *SALMONELLA* SPP. DANS LES ALIMENTS, LES ALIMENTS POUR ANIMAUX ET LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX PAR LA MÉTHODE EIAFOSS *SALMONELLA*^{MD}

Stephen Shaw
Laboratoire des aliments, Laboratoire d'Ottawa (Carling)
Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA)
Ottawa (Ontario) K1A 0C6

Courriel : sshaw@inspection.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable à la détection des *Salmonella* spp. viables dans les aliments afin de déterminer s'il y a conformité avec les articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*. Lorsqu'une méthode officielle est prescrite pour certains aliments, il faut suivre cette méthode.

L'épreuve EiaFoss *Salmonella*^{MD} est une méthode automatisée d'analyse immunoenzymatique par fluorescence pour la détection des *Salmonella* dans les aliments, les aliments pour animaux et les échantillons environnementaux. Il faut confirmer par culture les résultats présumés positifs détectés par le système EiaFoss *Salmonella* en isolant et identifiant les *Salmonella* viables dans les cultures d'enrichissement sélectif et de postenrichissement qui ont servi à déterminer la présence présumée de *Salmonella* dans un échantillon contaminé.

En mai 2000, l'Association française de normalisation (AFNOR) a homologué la méthode EiaFoss *Salmonella* (référence : FOS 19/1-05/00) parce qu'on a démontré qu'elle équivaut à la méthode ISO 6579 de l'Organisation internationale de normalisation (8.1). La technique a aussi été évaluée en fonction de la méthode BAM/AOAC de la Food and Drug Administration américaine (8.2), de méthodes européennes classiques (8.3, 8.4, 8.5) et elle a été homologuée par l'Association of Official Analytical Chemists Research Institute (AOAC-RI, numéro de permis 980801).

2. PRINCIPE

Le système EiaFoss permet la détection automatisée par immunofluorescence enzymatique des *Salmonella* motiles. L'efficacité du système repose sur l'affinité et la spécificité des anticorps monoclonaux pour les antigènes flagellaires (H) de *Salmonella*. La surface des immunobilles (microbilles paramagnétiques (IMB) Dynabeads) est recouverte au préalable d'anticorps spécifiques pour *Salmonella* pour la capture des antigènes cibles contenus dans les échantillons analysés. La configuration de l'épreuve EiaFoss empêche les réactions non spécifiques avec les microbilles. Tous les réactifs de l'épreuve, y compris le substrat

enzymatique, le solvant conjugué et la solution d'arrêt, sont contenus dans des fioles scellées prêtes à utiliser. La solution de lavage est fournie dans une bouteille de concentré facile à diluer et le conjugué et l'étalon (témoin positif) sont lyophilisés et faciles à réhydrater et à utiliser.

L'appareil EiaFoss effectue toutes les étapes de l'épreuve de façon séquentielle et automatique. Après l'ajout, dans la fiole d'échantillon, d'une partie de la culture de postenrichissement de bouillon M bouilli, l'appareil ajoute les microbilles et lave ensuite à plusieurs reprises le contenu de la fiole pendant une période programmée tout en maintenant périodiquement les microbilles magnétiques sur la paroi intérieure de la fiole. Les antigènes de *Salmonella* présents dans un échantillon d'analyse se lient aux anticorps fixés aux microbilles et le matériel non fixé est éliminé par lavage. On ajoute ensuite dans la fiole des anticorps signaux conjugués avec de la B-galactosidase facilitant ainsi la réaction avec les complexes antigène – anticorps de *Salmonella* fixés sur les microbilles. Le conjugué non fixé est éliminé par lavage. Le substrat, soit le 4-méthylumbelliferyl-B-D-galactosidase, est ensuite ajouté à la fiole où le conjugué enzymatique le transforme en produit de réaction fluorescent, soit le 4-méthylumbelliferyl. L'intensité de la fluorescence émise est mesurée par un lecteur optique et le système produit un imprimé des résultats exprimés sous forme de valeurs de fluorescence relative (Rf). Les échantillons qui ont une Rf de $\geq 0,25$ indiquent la présence présomptive de *Salmonella* spp. Il faut confirmer par la méthode de culture standard (8.6) la présence présumée de *Salmonella* dans les échantillons.

EiaFoss *Salmonella*^{MD} est une marque de commerce déposée de Foss Electric Co., DK 3400 Hillerød.

3. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'Annexe A du volume 3.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

4.1 Échantillonnage

Voir l'Annexe B du volume 3.

4.2 Rigueur de l'échantillonnage

Voir la méthode MFHPB-20 et appliquer, le cas échéant.

4.3 Plans d'échantillonnage pour analyse « régulière » et pour analyse « à des fins d'enquête »

Voir la méthode MFHPB-20 et appliquer, le cas échéant.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux suivants (6-11) sont disponibles sur le marché et ils doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir également l'annexe G du volume 3 et la référence 8.11 pour la formulation des milieux individuels.

- 1) Analyseur EiaFoss, capacité de 29 fioles et carte de programme EiaFoss *Salmonella*;
- 2) Trousse d'analyse EiaFoss *Salmonella*;

La trousse d'analyse EiaFoss *Salmonella* contient les réactifs, y compris les étalons et les témoins, nécessaires pour analyser 29 échantillons. La trousse est disponible chez *Foss Electric, Co., Ltd.*, 69 Slangergade, DK 3400 Hillerød, site Web : www.foss.dk; courriel : info@foss-electric.dk; téléphone : +45 42 26 33 66; télécopieur : +45 42 26 93 22.

- 3) Pipettes étalonnées et embouts jetables pour distribuer 100-200 et ≥ 500 μ l;

- 4) Incubateur ou bain-marie capable de maintenir des températures de 35 °C et de 42,5 °C;
- 5) Bain-marie (100 °C) ou un système équivalent;

NOTE : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être réglé à 35 ±1,0 °C. De même, des températures plus basses de 30 ou 25 °C peuvent être à ±1,0 °C près. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à ±0,5 °C près de la température indiquée parce que des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

- 6) Milieux pour bouillon de pré-enrichissement :
 - Bouillon nutritif (NB)
 - Eau peptonée tamponnée (EPT)
 - Bouillon de lactose (LAC)
 - Solution aqueuse de vert brillant (BGW)
 - Milieu au lait écrémé
 - Bouillon de trypticase soja (peptone tryptique) avec K₂SO₃ à 0,5 %
- 7) Milieux pour bouillon d'enrichissement :
 - Tétrathionate additionné de vert brillant (TBG)
 - Sélénite additionnée de cystine (SC)
 - Rappaport-Vassiliadis (RV)
- 8) Milieu pour bouillon de postenrichissement :
 - Bouillon M
- 9) Milieux pour gélose d'ensemencement :
 - Gélose au sulfite de bismuth (BS)
 - Gélose à la sulfapyridine additionnée de vert brillant (BGS)
 - Autres géloses d'ensemencement pour *Salmonella* (facultatif)
- 10) Milieux pour gélose de purification :
 - MacConkey (Mac)
 - Gélose nutritive (NA)
- 11) Analyse biochimique :
 - Gélose aux trois sucres et au fer (TSI)
 - Gélose lysine-fer (LIA)
 - Gélose à l'urée (de Christensen)
 - Trousses commerciales d'analyse biochimique
- 12) Confirmation sérologique :
 - Antisérums polyvalents et monovalents somatiques (O) et flagellaires (H)
- 13) Mélangeur, stomacher et sacs à stomacher avec filtre

6. MARCHE À SUIVRE

6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 6.1.1 Analyser les échantillons le plus tôt possible. Au besoin, conserver les échantillons pendant une période et à une température qui empêcheront la croissance ou la destruction de la microflore endogène. Si des unités d'échantillonnage ont été maltraitées en transit, il faut échantillonner à nouveau le lot.

- a. Aliments surgelés : On peut garder au congélateur, à une température de -10 à -20 °C, les unités d'échantillonnage qui ne présentent aucun signe de décongélation à la réception.
 - b. Les aliments séchés et les aliments de longue conservation peuvent être gardés à la température ambiante.
 - c. Réfrigérer tous les autres aliments, y compris ceux qui arrivent partiellement décongelés: analyser ces échantillons le plus rapidement possible, mais de préférence dans les 24 heures suivant leur réception.
- 6.1.2 Faire dégeler les échantillons congelés en 60 minutes à la température ambiante. Si c'est impossible, décongeler les échantillons au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C).

Note : a) Il se peut que les échantillons volumineux (dinde entière, p. ex.) ne dégèlent pas facilement au réfrigérateur. Pour accélérer le processus, déposer l'échantillon congelé dans un sac de papier et le laisser décongeler toute la nuit à la température ambiante. Avec cette technique, la surface du produit demeure froide pendant la décongélation.

b) Il faut prévoir des contenants appropriés pour recueillir les égouttures du produit et éviter ainsi de contaminer l'environnement du laboratoire.

- 6.1.3 Si le poids de l'unité d'échantillonnage reçue pour analyse est inférieur au poids recommandé, analyser la quantité disponible et consigner le poids exact utilisé.
- 6.1.4 Lorsqu'il faut mélanger des échantillons avec un appareil, limiter le temps de traitement au minimum nécessaire pour obtenir une suspension homogène. Un temps de traitement excessif peut causer des dommages physiques qui peuvent nuire à la viabilité de la microflore endogène.
- Dans le cas des produits qui n'ont pas besoin d'être mélangés, disperser l'unité d'analyse dans le bouillon de pré-enrichissement approprié.
- 6.1.5 Utiliser des techniques aseptiques et du matériel stérile à toutes les étapes de l'analyse. Le confinement pendant la manipulation des produits en poudre est primordial si l'on veut éviter la contamination croisée du milieu de travail.

6.2 Enrichissement en milieu non sélectif (pré-enrichissement)

- 6.2.1 Groupement des unités d'analyse
Afin de réduire la charge de travail, on peut réunir jusqu'à 15 unités d'analyse de 25 g (ml) en un seul échantillon d'analyse (p. ex., de 375 g ou ml).

Si une unité d'échantillonnage comporte plus d'un contenant, mélanger dans des conditions d'asepsie le contenu des contenants avant d'en tirer l'unité d'analyse. Si ce n'est pas possible ou pratique, il faut alors constituer l'unité d'analyse de portions égales de chaque contenant.

6.2.2 Analyse des échantillons

6.2.2.1 Ajouter l'unité d'analyse requise à un bouillon d'enrichissement non sélectif approprié (voir la méthode MFHPB-20). Le bouillon nutritif (NB), l'eau peptonée tamponnée (EPT) et le bouillon de lactose (LAC) sont aussi fiables l'un que l'autre et peuvent servir, de façon interchangeable, de milieu général de pré-enrichissement (8.7, 8.8).

6.2.2.2 Si le pH du mélange de pré-enrichissement ne se situe pas entre 6,0 et 7,0, il faut le rajuster avec du NaOH 1N ou du HCl 1N stériles.

NOTE : Si l'unité d'échantillonnage est un contenant qui ne renferme qu'une très faible quantité d'aliments, rincer soigneusement l'intérieur du contenant avec le bouillon de pré-enrichissement approprié et incuber le liquide de rinçage dans un flacon stérile. Cette éventualité se rencontre plus souvent dans les cas de plaintes de consommateurs ou d'enquêtes sur des intoxications alimentaires.

6.2.2.3 Préparer un témoin positif de *Salmonella* et un témoin négatif de milieu en même temps que les échantillons d'analyse.

6.2.2.4 Incuber le milieu de pré-enrichissement et les témoins positif et négatif à 35 °C pendant 18 à 24 h.

NOTE : Il ne devrait y avoir aucun signe de croissance après l'incubation du témoin négatif de milieu. De même, s'il y a absence de croissance dans le témoin positif, les résultats de l'épreuve ne sont pas valables.

6.3 Enrichissement sélectif

6.3.1 Analyse de l'échantillon

6.3.1.1 Utiliser une pipette stérile pour transférer des portions identiques de 1,0 ml d'une culture de pré-enrichissement dans deux éprouvettes contenant respectivement 9,0 ml de bouillon de tétrathionate (TBG) et 9,0 ml de bouillon de sélénite cystine (SC), ou 0,1 ml dans 9,9 ml de bouillon de Rappaport-Vassiliadis (RV). Le bouillon RV est une alternative acceptable au bouillon SC.

6.3.1.2 Incuber le bouillon TBG à 42,5 °C et le bouillon SC à 35-37 °C pendant 6 à 8 heures (aliments secs et autres produits contenant de faibles taux de microflore endogène) ou 18 à 24 h (viandes crues ou autres produits contenant des taux élevés de microflore endogène).

6.4 Postenrichissement

6.4.1 Analyse de l'échantillon

6.4.1.1 Transférer 1,0 ml des cultures de bouillon SC ou RV, et 1,0 ml de bouillon TBG dans des éprouvettes distinctes qui contiennent chacune 10 ml de bouillon M. Conserver les cultures restantes de bouillon SC, RV et TBG à une température de 2 à 8 °C pour utilisation au cours des épreuves de confirmation (section 7.1).

6.4.1.2 Incuber les éprouvettes de bouillon M inoculées pendant 6 à 8 h (viandes crues et produits contenant des taux élevés de microflore endogène) ou 16 à 18 h (aliments secs et produits contenant de faible taux de microflore endogène) à 42,5 °C.

6.4.1.3 Après incubation, mélanger en faisant tourbillonner chaque culture de bouillon M et combiner 1,0 ml de chaque culture de bouillon M dans une seule éprouvette. Conserver les cultures originales de bouillon M à une température de 2 à 8 °C pour utilisation au cours des épreuves de confirmation (section 7.1).

6.4.1.4 Chauffer l'éprouvette contenant le mélange de cultures de bouillon M pendant 15 minutes dans un bain-marie à 100 °C et laisser ensuite refroidir à la température de la pièce.

6.4.1.5 Effectuer l'épreuve EiaFoss *Salmonella* (section 6.5) sur une portion de la culture qui a été chauffée (6.4.1.4).

6.5 EiaFoss *Salmonella* – Marche à suivre

- 6.5.1 Sortir la trousse EiaFoss *Salmonella* du réfrigérateur et laisser les composantes de la trousse atteindre la température ambiante (minimum 30 minutes). Conserver les réactifs inutilisés à une température de 2 à 8 °C.
- 6.5.2 Indiquer sur les fioles d'échantillon les numéros d'identification appropriés.
- 6.5.3 Suivre les instructions qui figurent sur la carte du programme EiaFoss *Salmonella* pour créer une liste de travail en entrant le code d'identification de l'échantillon et l'information du programme.
- 6.5.4 Il faut entrer au début de la liste de travail un étalon (blanc), un témoin positif et un témoin négatif qu'il faut analyser avec chaque nouvelle série de 29 épreuves.
- 6.5.5 Mélanger l'étalon, les témoins et les échantillons chauffés en les faisant tourbillonner.
- 6.5.6 Distribuer 500 µl d'étalon, de témoin ou d'échantillon chauffé dans les fioles d'échantillon préalablement étiquetées.
- 6.5.7 Placer le plateau d'échantillonnage de fioles EiaFoss *Salmonella* dans la chambre d'analyse de la façon indiquée par la position de la première fiole (étalon ou puits vide). Lancer le programme *Salmonella* pour commencer l'analyse de la façon déterminée précédemment (6.5.3).

7. INTERPRÉTATION

Les analyses EiaFoss *Salmonella* qui donnent une fluorescence relative(Rf) de 0,25 ou plus indiquent la présence présumée de *Salmonella* dans l'échantillon. Il faut confirmer par culture tous les résultats positifs présumés.

7.1 Confirmation par culture des résultats positifs présumés de la méthode EiaFoss

- 7.1.1 Déposer en stries, sur des géloses BS et BGS, des anses des cultures de bouillon SC (ou RV), TBG et M préalablement réfrigérées d'un échantillon analysé (section 6.4.1.1 et 6.4.1.3). Des géloses d'ensemencement additionnelles pour *Salmonella* (telles que les géloses Rambach) peuvent également être utilisées.
- 7.1.2 Incuber les géloses et purifier les colonies suspectes sur une gélose MacConkey. Les isolats sont soumis à une analyse biochimique et à une confirmation sérologique de la façon décrite dans la méthode MFHPB-20 (sections 6.6 et 6.7).

Attention : Il ne faut pas jeter les cultures qui ne forment pas d'agglutination et qui ont des caractéristiques biochimiques indiquant la présence possible de *Salmonella* spp.: il faut plutôt les envoyer à un centre de sérotypage de référence pour identification complète.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Organisation internationale de normalisation (ISO). 1993. Microbiologie – Directives générales concernant les méthodes de recherche des Salmonella. Norme internationale ISO 6579. Genève.
- 8.2 Food and Drug Administration américaine. 1995. Salmonella (Chapitre 5). Dans : Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8^eédition. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- 8.3 Fierens, H. et A. Huyghebaert. 1996. Screening for Salmonella in naturally contaminated feeds with rapid methods. Int'l J. of Food Microbiology. 31 (1996):301-309.

- 8.4 Krusell, L. et Niels Skovgaard. 1993. Evaluation of a semi-automated screening method for the detection of Salmonella in foods within 24h. *Int'l J. of Food Microbiology*. 20 (1993): 123-130.
- 8.5 Wegener, H.C. et Dorte Lau Baggesen. 1997. Comparison of conventional culture methods and two commercial enzyme immunoassays for detection of Salmonella in porcine fecal samples and cecal contents. *J. of Vet. Diagn. Invest.* 9 (1997): 352-356.
- 8.6 D'Aoust, J.-Y. et U. Purvis. 1998. MFHPB-20 Isolement et identification des Salmonella dans les aliments. Dans le Volume 2. *Le Compendium des Méthodes*. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>
- 8.7 D'Aoust, J.-Y. et C. Maishment. 1979. Preenrichment conditions for effective recovery of Salmonella in foods and feed ingredients. *J. Food Prot.*, 42: 153-157.
- 8.8 D'Aoust, J.-Y. 2000. Salmonella (Chapitre 45). Dans : B.M. Lund, A.C. Baird-Parker et G.W. Gould (éds), *The Microbiological Safety and Quality of Food (Volume II)*, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Md
- 8.9 D'Aoust, J.-Y. 1977. Effect of storage conditions on the performance of bismuth sulfite agar. *J. Clin. Microbiol.* 5: 122-124.
- 8.10 Commission internationale pour la définition des caractéristiques microbiologiques des aliments (CIDCMA) 1986. *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. Deuxième édition. Presses de l'Université de Toronto, Toronto (Ont.).
- 8.11 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Deuxième édition. L.C. Parks (éditeur). CRC Press.