

**LA TROUSSE D'ESSAI REVEAL POUR LA DÉTECTION DE SALMONELLA****1. APPLICATION**

Cette méthode s'applique à la détection de *Salmonella* dans les provendes, les aliments crus et d'autres échantillons afin de déterminer s'ils sont conformes aux articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Lorsqu'il existe une méthode officielle et une méthode HPB, il faut les suivre.

2. DESCRIPTION

Des études de l'AFNOR ont démontré que la méthode donne des résultats satisfaisants avec des aliments contaminés artificiellement et contaminés naturellement (8.1).

3. PRINCIPE

À la suite d'un enrichissement sélectif dans un bouillon de Rappaport-Vasiliadis, on dépose une portion de l'échantillon enrichi dans le port d'échantillonnage de l'appareil Reveal pour déclencher l'écoulement. L'appareil Reveal contient des anticorps qui ont une grande spécificité pour les antigènes de *Salmonella*. Ces anticorps sont fixés à de l'or en suspension colloïdale et aussi, d'autre part, à une matrice de soutien solide. Tout antigène de *Salmonella* présent se fixera aux anticorps conjugués à l'or pour former un complexe antigène – anticorps – chromogène. Ce complexe traverse une membrane à évacuation latérale et est fixé ensuite par l'anticorps immobilisé sur la membrane. La fixation provoque la précipitation du conjugué d'or et forme une ligne visible, ce qui indique une réaction positive. Une ligne de contrôle qui se forme plus haut dans la fenêtre d'essai indique que le test s'est déroulé et s'est terminé comme il se doit et vérifie la validité du test. L'absence de ligne de contrôle rend le test non valide. On consigne les résultats après dix minutes d'incubation.

4. DÉFINITIONS

Voir l'annexe A du volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET PRODUITS SPÉCIAUX

Les milieux de 2 à 7 sont disponibles sur le marché et il faut les préparer et les stériliser en suivant les instructions du fabricant.

- 1) Appareil Reveal (Neogen Corporation, téléphone : (517) 372-9200; télécopieur : (517) 372-0108)
- 2) Bouillon REVIVE (Neogen Corp., Lansing, MI)

- 3) Bouillon de Rappaport-Vasiliadis à une concentration de 2X (Neogen Corps., Lansing, MI)
- 4) Gélose au xylose, à la lysine et au désoxycholate (XLD)
- 5) Gélose entérique Hektoen (HE)
- 6) Gélose au sulfite de bismuth (BS)
- 7) Gélose sulfa au vert brillant (BGS)
- 8) Incubateur capable de maintenir une température de 35 °C
- 9) Incubateur capable de maintenir une température de 42 °C

NOTE : Il incombe à chaque laboratoire de veiller à ce que la température des incubateurs ou des bains-marie soit maintenue au degré recommandé. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 35 +/-1,0 °C. De même, la température plus basse de 30 à 25 peut être à +/-1,0 °C. Lorsqu'on recommande des températures plus élevées, toutefois, comme 43 ou 45,5 °C, il est crucial de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à +/-0,5 °C de la température recommandée parce que des températures plus élevées peuvent être mortelles pour les micro-organismes que l'on cherche à isoler.
--

- 11) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 12) Sacs de stomacher et bocaux à couvercle qui visse
- 13) Micropipette et embouts stériles
- 14) Cultures témoins (ATCC ou l'équivalent)
- 15) papier pH
- 16) NaOH 1N et HCl 1N
- 17) Produits biochimiques et antisérums énumérés dans la méthode MFHPB-20

7. PROCÉDURE

On peut analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement ou regrouper les unités d'analyse. Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder les unités au réfrigérateur (0-5 °C) ou au congélateur : tout dépend de la nature du produit. Faire décongeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Préparer un bouillon REVIVE (voir tableau 1).

7.2.2 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié.

7.3 Préparation de l'échantillon

7.3.1 Pour obtenir une unité d'analyse vraiment représentative, agiter les liquides ou les matières qui s'écoulent librement jusqu'à homogénéité. Si une unité d'échantillonnage est un solide, obtenir l'unité d'analyse en prélevant une portion dans plusieurs endroits de l'unité d'échantillonnage. Pour réduire la charge de travail, on peut regrouper des unités d'analyse. Il est recommandé que l'échantillon composite ne contienne pas plus de 500 g.

7.3.2 Préparer une dilution de 1:9 de l'aliment en mélangeant ou faisant digérer au stomacher, de façon aseptique, 25 g ou mL (unité d'analyse) dans 200 mL de bouillon REVIVE de la façon indiquée au tableau 1.

7.3.3 Ajuster au besoin le pH du mélange à $6,8 \pm 0,2$ avec du NaOH 1N ou du HCl 1N.

7.3.4 Incuber le mélange de préenrichissement pendant quatre heures à 35 °C.

7.4 Enrichissement sélectif de l'échantillon

Agiter doucement le mélange de l'échantillon à incuber et ajouter 200 mL de bouillon de Rappaport-Vasiliadis (RV) 2X. Incuber pendant 18 - 24 h à 42 °C.

7.5 Préparation et inoculation de l'unité d'essai

7.5.1 Laisser l'appareil d'essai parvenir à la température de la pièce avant d'ouvrir le sac.

7.5.2 Ouvrir le sac et déposer l'appareil sur une surface plate et au niveau.

7.6 Inoculation

Pipetter de façon aseptique 120 µL de la culture d'échantillon sur le port d'échantillon de l'appareil.

7.7 Incubation

Laisser l'appareil reposer sans bouger à la température de la pièce pendant 15 minutes.

7.8 Lecture des résultats

Examiner l'appareil immédiatement après l'incubation de 15 minutes. La présence de deux lignes distinctes dans la fenêtre de visualisation – la présence d'une ligne dans la zone inférieure à proximité du « T » (ligne de test) et d'une ligne dans la zone supérieure à proximité du « C » (ligne de contrôle) – indique un résultat positif. Les lignes seront foncées sur fond blanc. La présence d'une seule ligne dans la zone supérieure (contrôle) de la fenêtre de visualisation indique un résultat négatif. L'absence de ligne dans la zone supérieure (contrôle) de la fenêtre de visualisation, qu'il y ait ou non une ligne dans la zone inférieure (essai), indique un résultat non valide.

7.9 Isolement sélectif

- 7.9.1 Mélanger la culture et ensemercer avec une anse de 10 µL au moins deux géloses sélectives (BS plus une de XLD, HE ou BGS). Incuber toutes les plaques pendant 24 ± 2 h à 35 °C.
- 7.9.2 Examiner les plaques pour y déceler la présence de colonies qui peuvent être *Salmonella*. Les isolats sont examinés par analyse biochimique et l'on en confirme la présence par analyse sérologique de la façon décrite à la méthode MFHPB-20, sections 6.5, 6.6 et 6.7.
- 7.9.3 Entreposer toutes les plaques à 4 °C jusqu'à ce que la confirmation soit terminée.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Études de validation de l'AFNOR. Devraient être terminées en janvier 2001.
- 8.2 D'Aoust, J.-Y. et U. Purvis. 1998. Isolation et identification de *Salmonella* dans les aliments. Volume 2. Compendium de méthodes. Santé Canada, Ottawa. Publié sur le site Web de la Direction des aliments (Santé Canada) à l'adresse <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.

Tableau 1. Procédures d'enrichissement

Type d'échantillon	Unité d'échantillonnage (minimum)	Préparation de l'unité d'analyse
Tous les aliments et les provendes	25 g	Peser 25 g dans un sac à stomacher stérile, ajouter 200 mL de bouillon REVIVE et mélanger à la main pendant deux minutes. Incuber pendant 4 h à 35 °C.