

**LA TROUSSE D'ESSAI ALERT 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'AOAC (8.1) ont démontré que cette méthode donne des résultats satisfaisants avec des aliments contaminés artificiellement et les eaux de rinçage de volaille, la dinde hachée crue et le tourteau de volaille fondu contaminés naturellement. Cette méthode peut servir à détecter la présence de *Salmonella* dans d'autres aliments et ingrédients alimentaires.

3. PRINCIPES

La trousse Alert pour la détection de *Salmonella* est une technique immuno-enzymatique en sandwich qui utilise les anticorps monoclonaux et polyclonaux d'un antigène de *Salmonella*. Après un enrichissement sélectif dans un bouillon de tétrathionate et un bouillon de Rappaport-Vasiliadis et un postenrichissement dans un bouillon M, on fait chauffer les cultures d'essai pour libérer l'antigène et on les ajoute ensuite à un micropuits contenant les anticorps polyclonaux fixés. Pendant cette première incubation, les anticorps fixés capturent l'antigène. Après un lavage, on ajoute un anticorps monoclonal anti-*Salmonella* conjugué à la peroxydase, qu'on laisse réagir avec l'antigène capturé. Après un deuxième lavage, on ajoute un substrat qui réagit avec le complexe de la peroxydase et produit une couleur bleue. Plus le bleu est prononcé, plus la culture de l'échantillon contient d'antigènes de *Salmonella*. On ajoute une solution d'arrêt et lit les micropuits au moyen de lecteur EIA à 450 nm.

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 2 à 11 sont disponibles sur le marché et il faut les préparer et les stériliser en suivant les instructions du fabricant.

- 1) Trousse d'essai Alert (Neogen Corporation, téléphone : (517) 372-9200; télécopieur : (517) 372-0108)**

- 2) Bouillon de lactose
- 3) Bouillon de trypticase soya
- 4) Bouillon de pré-enrichissement universel
- 5) Colorant vert brillant
- 6) Bouillon de Rappaport-Vasiliadis (RV)
- 7) Bouillon de tétrathionate (TT)
- 8) Bouillon M
- 9) Gélose au xylose, à la lysine et au désoxycholate (XLD)
- 10) Gélose hektoen (HE)
- 11) Gélose au sulfite de bismuth (BS)
- 12) Gélose sulfa au vert brillant (BGS)
- 13) Incubateur capable de maintenir une température de 35 °C
- 14) Incubateur capable de maintenir une température de 42 °C

NOTE : Il incombe à chaque laboratoire de veiller à ce que les températures des incubateurs ou des bains-marie soient maintenues au degré recommandé. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être réglé à 35 +/-1,0 °C. De même, une température plus basse de 30 ou 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 le micro-organisme que l'on cherche à isoler.

- 15) Cultures témoins (ATCC ou l'équivalent)
- 16) HCL 1N et NaOH 1N
- 17) pHmètre ou papier
- 18) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 19) Bain-marie (100 °C) ou système équivalent
- 20) Lecteur de micropuits EIA à 450 nm
- 21) 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 Faire dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, ou 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 Avoir à portée de la main du bouillon de lactose, du bouillon de trypticase soya ou du bouillon de pré-enrichissement universel (voir tableau 1).
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail au moyen d'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 1:10 de l'aliment en mélangeant de façon aseptique 25 g ou mL (l'unité d'analyse) dans 225 mL du bouillon de pré-enrichissement requis, 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 pré-enrichissement pendant 18 à 24 h à 36 °C.

7.4 Enrichissement sélectif de l'échantillon

Agiter doucement le mélange d'échantillon à incuber et en transférer 1 mL dans 10 mL de bouillon de tétrathionate (TT) à température moyenne (36-42 °C) et transférer 0,1 mL dans 10 mL de bouillon de Rappaport-Vasiliadis (RV). Incuber pendant 24 ± 2 h à 42 °C.

7.5 Postenrichissement de l'échantillon

- 7.5.1 Transférer 1,0 mL du bouillon TT dans une éprouvette contenant 10 mL de bouillon M.
- 7.5.2 Transférer 1,0 mL du bouillon RV dans une éprouvette contenant 10 mL de bouillon M.
- 7.5.3 Incuber pendant 6 à 8 h à 35 °C.

7.6 Préparation et inoculation de l'unité d'essai

- 7.6.1 Laisser la trousse d'essai parvenir à la température de la pièce avant d'ouvrir les puits des anticorps.
- 7.6.2 Agiter tous les réactifs pour les mélanger.

7.7 Marche à suivre

- 7.7.1 Après l'incubation, mélanger ou faire tourbillonner chaque culture de postenrichissement (RV/M et TT/M) et combiner 1,0 mL de chaque culture de bouillon M dans une seule éprouvette.
- 7.7.2 Plonger l'éprouvette dans un bain d'eau à 100 °C pendant 10 minutes.
- 7.7.3 Laisser refroidir à la température de la pièce.
- 7.7.4 Distribuer 100 µL de témoin négatif dans le puits d'anticorps n° 1.
- 7.7.5 Distribuer 100 µL de témoin négatif dans le puits d'anticorps n° 2.
- 7.7.6 Distribuer 100 µL de chaque échantillon dans un puits d'anticorps individuel.
- 7.7.7 Incuber pendant 30 minutes à la température de la pièce.
- 7.7.8 Laver les puits au moyen de la solution tampon de lavage fournie, en les remplissant et les vidant à cinq reprises.
- 7.7.9 Ajouter deux gouttes de solution conjuguée à chaque puits et mélanger.
- 7.7.10 Incuber pendant 15 minutes à la température de la pièce.
- 7.7.11 Laver les puits en utilisant la solution tampon de lavage fournie, en les remplissant et les vidant à cinq reprises.
- 7.7.12 Ajouter deux gouttes de substrat à chaque puits et mélanger.
- 7.7.13 Incuber pendant cinq minutes à la température de la pièce.
- 7.7.14 Ajouter deux gouttes de solution d'arrêt à chaque puits et mélanger.

7.8 Lecture des résultats

- 7.8.1 Lire les puits d'essai au moyen d'un lecteur de micropuits EIA à 450 nm.
- 7.8.2 Consigner toutes les densités optiques (DO).
- 7.8.3 Déterminer le seuil positif en ajoutant 0,150 à la DO du témoin négatif.
- 7.8.4 Si la DO de l'échantillon est \geq seuil, l'échantillon contient alors du *Salmonella*. Si la DO de l'échantillon est $<$ seuil, l'échantillon n'en contient alors pas.

7.9 Isolation sélective et identification

- 7.9.1 Mélanger des cultures et ensemercer avec une anse 10 µL de chaque culture (TT et RV) sur au moins deux géloses sélectives (XLD, HE, BS ou BGS). Incuber toutes les plaques pendant 24 ± 2 h à 35 °C. S'il n'y a pas de croissante type sur la gélose BS, incuber 24 heures de plus et examiner.

7.9.2 Examiner les plaques pour y détecter la présence de colonies qui peuvent être *Salmonella*. On soumet les isolats à une analyse biochimique et à une confirmation 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 Bird, C.B., C.C. Cooper, M.E. Wendorf et R.J. Hoerner. 2000. Pre-Collaborative Validation Study to Demonstrate the Equivalence of Alert for Salmonella for the Detection of Salmonella in Foods to BAM Culture Method. JAOAC. Présenté pour publication.
- 8.2 D'Aoust, J.-Y. et U. Purvis. 1998. Isolation et identification de *Salmonella* dans les aliments. Volume 2. *Compendium des 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
Mélange à gâteau, cantaloupe, laitue iceberg, ravioli, eau de rinçage de volaille et provendes pour volaille	25 g	Peser 25 g dans un sac de stomacher stérile, ajouter 225 mL de bouillon de lactose et laisser digérer pendant deux minutes. Laisser reposer 60 minutes à la température de la pièce. Ajuster le pH à $6,8 \pm 0,2$ au besoin.
Poivre noir	25 g	Peser 25 g dans un sac de stomacher stérile, ajouter 225 mL de bouillon de trypticase soya et laisser digérer. Laisser reposer pendant 60 minutes à la température de la pièce. Ajuster le pH à $6,8 \pm 0,2$ au besoin.
Crevettes étêtées crues, saumon fumé, bœuf haché cru, cubes de bœuf cru, dinde hachée crue, saucisses de porc cru et tourteau de volaille	25 g	Peser 25 g dans un mélangeur stérile, ajouter 225 mL de bouillon de lactose et mélanger pendant deux minutes. Transférer de façon aseptique le mélange dans un sac de stomacher et laisser reposer 60 minutes à la température de la pièce. Ajouter (sauf dans le cas des crevettes crues) jusqu'à 2,25 mL de triton à la vapeur x-100 pour déclencher le moussage.
Jus d'orange non pasteurisé	25 mL	Ajouter de façon aseptique 25 mL dans 225 mL de bouillon de pré-enrichissement universel dans un bocal de 500 mL à large ouverture et à couvercle qui visse. Mélanger et laisser reposer pendant 60 minutes à la température de la pièce. Ne pas ajuster le pH.
Eau d'irrigation de germes de luzerne	375 mL	Transférer de façon aseptique 375 mL de sous-échantillon directement dans un Erlenmeyer de 6 L contenant 3,375 mL de bouillon de lactose. Laisser l'Erlenmeyer reposer pendant 60 minutes à la température de la pièce. Ajuster le pH à

Type d'échantillon	Unité d'échantillonnage (minimum)	Préparation de l'unité d'analyse
		6,8 ± 0,2 au besoin.