



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉTECTION DE *SALMONELLA* SPP
PAR LA MÉTHODE D'IMMUNO-ESSAI VISUEL (IEV) *SALMONELLA* TECRA®

Division de l'évaluation
Bureau des dangers microbiens
Direction des aliments, Santé Canada
Indice d'adresse : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Courriel : don_warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

La présente méthode s'applique à la détection de *Salmonella* dans les produits ou ingrédients alimentaires et les échantillons environnementaux, afin de déterminer le niveau d'observation des exigences stipulées aux articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*.

L'Immuno-essai visuel (IEV) *Salmonella* de Tecra® utilise une technique de dosage immunoenzymatique (ELISA) qui permet un dépistage *in vitro* rapide et spécifique servant à repérer, après enrichissement sélectif, la présence de *Salmonella* dans les produits alimentaires et les échantillons environnementaux. Les résultats sont déterminés de façon visuelle ou à l'aide d'un lecteur à plaque à microtitration.

Les résultats présumés positifs doivent être confirmés à l'aide d'une méthode acceptée d'ensemencement sur gélose. Ce point est particulièrement important dans les situations de retraits de produits du marché.

La méthode IEV *Salmonella* de Tecra® a été approuvée, à titre de méthode officielle, par la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) pour utilisation avec plusieurs milieux d'enrichissement (méthodes 989.14 et 998.09 de la AOAC). La méthode a aussi été approuvée dans plusieurs pays, notamment la France, l'Australie, la Nouvelle-Zélande, le Danemark et le Brésil.

1. PRINCIPE

L'Immuno-essai visuel (IEV) *Salmonella* de Tecra® utilise des anticorps à haute affinité dans sa technique immunoenzymatique en « sandwich ». Ces anticorps de « capture », spécifiques au *Salmonella*, ont été adsorbés sur la surface des cupules de microtitration. Les anticorps capturent les antigènes de *Salmonella* présents dans l'échantillon. Tout autre matériel présent dans l'échantillon est éliminé au lavage. L'ajout d'un conjugué anticorps-enzyme spécifique au *Salmonella* complète le « sandwich ». La présence du *Salmonella* dans les échantillons est

démontrée si le conjugué lié donne au substrat une couleur verte. Aucune couleur n'est développée en l'absence de *Salmonella*. La période totale de l'analyse, y compris les étapes d'enrichissement sélectif et de post-enrichissement dans un bouillon M, est de 42 à 50 heures.

Un résultat présumé positif pour le *Salmonella* obtenu par la technique IEV doit être confirmé par ensemencement du bouillon d'enrichissement sur des plaques à gélose sélective.

TECRA® est une marque de commerce enregistrée de TECRA International Pty Ltd. 13 Rodborough Rd, Frenchs Forest, NSW 2086, Australie.

3. DÉFINITIONS

Voir l'annexe A du volume 3.

3.1. Prélèvement des échantillons

Voir l'annexe B du volume 3.

3.2. Rigueur de l'échantillonnage

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

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

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

4. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

4.1 Trousse d'analyse :

Tous les réactifs nécessaires pour l'analyse **Immuno-essai visuel (IEV) *Salmonella* de Tecra®** font partie d'une seule trousse contenant le matériel nécessaire pour effectuer un maximum de 94 déterminations (la trousse compte 96 cupules, mais les témoins positif et négatif insérés dans la trousse doivent être utilisés pour chaque analyse). Les trousse sont disponibles en Amérique du Nord chez International Bioproducts Inc., 21312 30th Drive SE, Bothell WA 98021.

- Instructions, feuille de travail
- Porte-plaque
- Languette refermable
- Cupules de microtitration enrobées d'anticorps
- Réactif 1 – Concentré de lavage
- Réactif 2 – Témoin positif
- Réactif 3 – Diluant pour le témoin
- Réactif 4 - Conjugué
- Réactif 5 - Diluant pour le conjugué
- Réactif 6 - Substrat
- Réactif 7 - Diluant pour le substrat
- Réactif 8 - Solution d'arrêt de réaction

4.2 Matériel supplémentaire :

- Incubateur capable de maintenir des températures de 35 à 37 °C
- Incubateur capable de maintenir des températures de 41 à 43 °C
- Pipettes sérologiques
- Flacon pressable en plastique
- Pipettes (20 µL, 50 µL et 200 µL)
- Film étirable
- Bain-marie (100 °C)
- Bouteilles ou tubes à bouchon à vis capables de contenir un volume de 5 mL et pouvant supporter l'ébullition.
- Mélangeur à vortex
- Éprouvettes en verre (15 cm x 15 cm)
- Mélangeur/Stomacher/sacs adaptés au Stomacher

4.3 Milieux de culture (IEV)

Les milieux, disponibles sur le marché, doivent être préparés et stérilisés conformément aux instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 et la référence 8.2 pour la formule de composition de chaque milieu.

Nota : Si l'analyste utilise toute variation des milieux énumérés dans le présent document (produit disponible sur le marché ou préparé sur place), il incombe à l'analyste ou au surveillant du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

Bouillons d'enrichissement :

Différents protocoles d'enrichissement sont décrits dans le manuel des méthodes TECRA inséré dans chaque trousse.

Protocole 1 : Méthode de la AOAC 998.09 Option 1 RV(R10)/TT

Bouillon lactosé ou tout autre bouillon non inhibiteur précisé par la FDA BAM (pré-enrichissement)
Bouillon de tétrathionate et bouillon Rappaport Vassiliadis (RV-R10) (enrichissement sélectif)
Bouillon M (post-enrichissement)

Protocole 2 : Méthode de la AOAC 998.09 Option 2 (RV/R10)

Tel que le protocole 1, mais en utilisant seulement le bouillon Rappaport Vassiliadis (RV/R10) - (enrichissement sélectif)

Protocole 3 : Méthode de la AOAC 998.09 Option 3 TT

Tel que le protocole 1, mais en utilisant seulement le bouillon de tétrathionate (enrichissement sélectif)

Protocole 4 : Méthode de la AOAC 989.14 TT/SC

Bouillon lactosé ou tout autre bouillon non inhibiteur précisé par la FDA BAM (pré-enrichissement)
Bouillon de tétrathionate et bouillon de Selenite Cystine (enrichissement sélectif)
Bouillon M (post-enrichissement)

Protocole 5 : Méthode approuvée par l'AFNOR

Eau peptonée tamponnée (pré-enrichissement)
Bouillon Rappaport Vassiliadis (RV/R10) et bouillon de Mannitol Selenite Cystine (MSC) ou bouillon de Selenite Cystine (SC) (enrichissement sélectif)
Bouillon M (post-enrichissement)

NOTA : Il incombe à chaque laboratoire de veiller au maintien de la température recommandée des incubateurs et des bains-marie.

5. PROCÉDURE

5.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 5.1.1 Analysez les échantillons aussitôt que possible. Si nécessaire, entreposez les échantillons dans des conditions de temps et de température qui empêchent la croissance ou la mort de la microflore endogène. Si les unités d'échantillonnage ont été mal entreposées en transit, il est préférable de prélever de nouveaux échantillons.
- a. Aliments congelés : les unités d'échantillonnage qui présentent aucun signe de dégel au moment de leur réception peuvent être entreposés au congélateur à des températures variant entre -10 °C et -20 °C .
 - b. Aliments secs et stables à température ambiante : entreposez les unités d'échantillonnage à la température ambiante.
 - c. Tous les autres aliments, y compris ceux qui sont reçus dans des conditions de dégel partiel : réfrigérez les unités d'échantillonnage et analysez-les aussitôt que possible, de préférence dans les 24 heures suivant leur réception.
- 5.1.2 Dégelez les échantillons gelés à la température ambiante dans les 60 minutes qui suivent; si cela est impossible, dégelez les échantillons dans un réfrigérateur dont la température est maintenue entre 2 °C et 8 °C .

Nota :

a) Les échantillons de taille importante (p. ex., une dinde entière) ne dégèlent pas facilement au réfrigérateur. Pour accélérer le processus, placez l'échantillon congelé dans un sac de papier à parois épaisses et dégelez l'échantillon à la température ambiante pendant la nuit. Cette technique garde froide la surface du produit durant le processus de dégel.

b) Utilisez les contenants recommandés pour éviter que l'exsudation du produit contamine le laboratoire.

5.1.3 Si le volume de l'unité d'échantillonnage reçue est inférieur à l'unité analytique recommandée, analysez toute l'unité et enregistrez le poids utilisé.

5.1.4 Le mélange des échantillons doit être limité à la période minimale requise pour produire une suspension homogène. Un mélange excessif peut physiquement endommager l'échantillon et avoir des effets néfastes sur la microflore endogène .

Pour ce qui est des unités d'échantillons reçus sous forme homogène, placez le volume de l'unité analytique dans le bouillon de pré-enrichissement.

5.1.5 Utilisez des techniques d'asepsie et du matériel stérile durant toutes les étapes de l'analyse. Durant l'étape de manipulation, il est crucial de confiner les produits pulvérulents pour éviter toute contamination croisée de l'aire de travail.

5.2 Enrichissement

Les échantillons doivent être enrichis selon le protocole d'enrichissement approprié décrit ans le manuel des méthodes d'immuno-essai visuel (IEV) *Salmonella* de Tecra®. La température des bouillons d'enrichissement doit se situer entre 20 °C et 25 °C avant d'y incorporer les échantillons. Pour les échantillons dont le volume d'analyse est supérieur à 225 mL, il faut préchauffer le bouillon avant d'ajouter l'échantillon.

5.3 Analyse

Suite au post-enrichissement dans un bouillon M, les échantillons doivent être détruits par la chaleur et analysés à l'aide de la trousse IEV, conformément au manuel d'instruction d'immuno-essai visuel de Tecra®. L'immuno-essai dure environ 2 heures et les réactions de chaque cupule peuvent être lues à l'oeil nu ou à l'aide d'un spectrophotomètre.

5.4 Confirmation par ensemencement sur gélose

Les échantillons qui présentent un résultat positif par immuno-essai visuel *Salmonella* de Tecra® doivent être confirmés. À partir du bouillon M ou d'un bouillon d'enrichissement sélectif, ensemencez une plaque de gélose sélective standard et effectuez les analyses biochimiques et sérologiques recommandées.

6. RÉFÉRENCES

6.1 Denise Hughes, Angela Daillianis et Louise Hill 1999. *Salmonella* in Foods – A New Enrichment Procedure for Use with the TECRA *Salmonella* Visual Immunoassay : Collaborative Study J.AOAC Int. 82 : 634 à 647

6.2 Commission internationale pour la définition des caractéristiques microbiologiques des aliments (ICMSF).1986. *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and Specific applications*. Deuxième édition. University of Toronto Press, Toronto (Ontario).

6.3 US Food and Drug Administration. 1995. *Bacteriological Analytical manual* (8^e éd.) AOAC International, Gaithersburg, Md.