



**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS  
OTTAWA**

**L'ESSAI GENEQUENCE<sup>®</sup> PAR MICROPUITS DE SALMONELLA POUR LA  
 DÉTECTION DES SALMONELLES DANS UNE VARIÉTÉ D'ALIMENTS**

**Don Warburton et Premalatha Himawan  
Division de l'évaluation  
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments  
Localisateur postal : 2204A1  
DGPSA, Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

**Don\_Warburton@hc-sc.gc.ca**

**1. APPLICATION**

Cette méthode est applicable à la détection de *Salmonella* spp. dans une grande variété d'aliments dont la viande, la volaille, le poisson et les fruits de mer, les fruits et les légumes, les oeufs, les noix, les farines, les produits de confiserie, les produits laitiers, les épices, les aliments pour animaux et divers aliments transformés.

**2. DESCRIPTION**

L'essai par micropuits de *Salmonella* GENEQUENCE<sup>®</sup> est un outil diagnostique par sonde d'ADN sous forme de trousse qui permet une détection rapide et précise de *Salmonella* spp. dans les aliments. Les résultats sont obtenus en 48 heures approximativement. Le test démontre une sensibilité équivalant à celle des procédures de culture de référence et peut détecter la présence d'une quantité aussi faible qu'une cellule de *Salmonella* dans un échantillon d'aliment de 25 g lorsque les protocoles d'enrichissement spécifiés sont utilisés. La méthode GENEQUENCE est conçue pour être utilisée par un personnel de laboratoire qualifié qui suit des pratiques microbiologiques normalisées.

**3. PRINCIPE**

Pour effectuer un essai GENEQUENCE par hybridation de l'ADN, on emploie des sondes d'ADN spécifiques aux salmonelles marquées à la peroxydase de raifort ainsi qu'un point de virage colorimétrique pour détecter la présence de *Salmonella* spp. dans des échantillons d'aliments à la suite de l'enrichissement dans un milieu de culture. Après le pré-enrichissement de l'échantillon, l'enrichissement sélectif et les périodes d'incubation suivant l'enrichissement, les bactéries ciblées sont lysées par un enzyme à 65 °C et les sondes d'oligonucléotides spécifiques aux salmonelles sont ajoutées pour une incubation par hybridation de 60 minutes à 45 °C. Si l'ARN ribosomique (ARNr) de *Salmonella* est présent dans l'échantillon d'essai, une sonde de détection marquée directement à la peroxydase de raifort (HRP) et une sonde de capture avec séquence d'acide polydéoxyadénylique (poly dA) hybrident des séquences d'ARNr de l'organisme cible. Simultanément, l'appariement des bases entre la sonde de capture avec séquence de poly dA et les micropuits de polystyrène enrobés d'acide

polydéoxythymidylique (poly dT) facilite une capture en phase solide des molécules hybrides ciblées par la sonde. Une sonde non liée est éliminée par lavage et un substrat chromogène est ajouté à chaque puits. La réaction du HRP avec le substrat chromogène produit une couleur bleue. La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique, qui change la couleur du substrat de bleue à jaune. Un lecteur de plaque à micropuits ou de bandelette de micropuits (A 450) mesure l'absorbance; l'absorbance excédant la valeur de seuil indique la présence de *Salmonella* spp. dans l'échantillon d'essai. Les résultats d'analyse positifs doivent être confirmés par les méthodes de culture normalisées.

#### 4. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

#### 5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

#### 6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

**Note :** Le superviseur de laboratoire doit s'assurer que l'analyse décrite dans la présente méthode est réalisée selon la norme internationale « ISO/IEC 17025:1999 (ou une version ultérieure) : Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. »

Les milieux énumérés ci-dessous sont disponibles dans le commerce et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 pour la formulation de chaque milieu.

**Note :** Si l'analyste utilise des variantes des milieux énumérés ci-après (un produit offert commercialement ou préparé à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au superviseur de laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 1) *Fournis avec la trousse* - (n° 6700; permettent d'effectuer 96 tests - Neogen Corporation, téléphone : (517) 372-9200, télécopieur : (517) 372-0108, Internet : [www.neogen.com](http://www.neogen.com)) (connu antérieurement sous le nom Gene-Trak)

1 microplaque, 96 puits enduits, en bandelettes divisibles  
 2 flacons Réactif de lyse concentré (Réactif 1A)  
 1 bouteille Tampon de réactif de lyse (Réactif 1B), 12 ml  
 1 bouteille Solution d'hybridation (Solution 2), 18 ml  
 1 bouteille Solution pour sonde à *Salmonella* (Solution 3), 6 ml  
 1 bouteille Solution de lavage concentrée 20X (Solution 4), 50 ml  
 1 bouteille Solution de substrat chromogène (Solution 5), 15 ml  
 1 bouteille Solution d'arrêt de réaction (Solution 6), 5 ml  
 1 bouteille Contrôle positif (5 ml)  
 1 bouteille Contrôle négatif (5 ml)  
 1 charte de mélange hybridation/sonde  
 1 feuillet d'information

Entreposer la microplaque, le contrôle positif, le contrôle négatif et les réactifs 1A, 2, 3 et 5 à 2 à 8 °C. Les autres réactifs peuvent être entreposés à 2 à 25 °C. Toute la trousse peut être entreposée à 2 à 8 °C. Une fois que le réactif 1A est reconstitué, il doit être entreposé à -20 °C et est stable pendant 60 jours sous cette forme.

**Mise en garde :** La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique 4,0 N. La solution d'hybridation contient du formamide. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. Consulter la fiche signalétique pour plus de renseignements.

- 2) *Bouillons d'enrichissement* - varient selon le type d'aliment (voir la méthode MFHPB-20)

Bouillon lactosé (ou autre milieu de pré-enrichissement tel qu'approprié pour le type d'échantillon)  
Bouillon de tétrathionate additionné de vert brillant  
Bouillon Rappaport-Vassiliadis  
Bouillon Gram négatif

3) Matériel

**Équipement**

Mélangeur ou homogénéisateur  
Incubateur à 35 °C  
Incubateur ou bain-marie à 42 °C  
Bain-marie ou bloc de chauffage à 65 °C  
Petit agitateur rotatif à plate-forme pouvant aller à 150 tr/min (facultatif)  
Bloc de chauffage (avec couvercle) ou incubateur à air à 45 °C  
Source de vide  
Appareil de lavage pour microplaque avec 8 puits par orientation de bandelette  
Micro pipette pour distribuer un volume de 150 µl  
Micropipette ou pipette à répétition pour distribuer un volume de 100 µl  
Pipette à 8 canaux (recommandé) ou pipette à répétition pour distribuer des volumes de 50 µl, de 125 µl et de 150 µl  
Lecteur de microplaque ou de bandelettes à 450 nm avec discrimination d'au moins 0,01 unité d'absorbance  
Cylindre gradué de 500 ml ou de 1 L  
Support à éprouvettes  
Minuterie

**Note :** Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que la température des incubateurs ou des bains-marie est maintenue aux températures recommandées. Quand une température de 35 °C est recommandée dans la procédure, l'incubateur peut être à 35 ± 1,0 °C. De façon similaire, des températures inférieures de 30 ou 25 °C peuvent être de ± 1,0 °C. Cependant, quand des températures supérieures sont recommandées, telles que 43 ou 45,5 °C, il est impératif que les incubateurs ou les bains-marie soient maintenus à ± 0,5 °C parce que des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

**Fournitures**

Bouteilles de culture pour le pré-enrichissement des échantillons  
Tubes à culture pour des volumes d'échantillon de 11 ml  
Éprouvettes, en verre, 12 x 75 mm  
Embouts de pipette  
Papier absorbant  
Pipettes de 10 ml ou de 25 ml

**7. MARCHE À SUIVRE**

**7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage**

7.1.1 Analyser les unités d'échantillonnage le plus rapidement possible, de préférence dans les 24 h suivant la réception. Pendant le transport, à l'exception des produits stables à la température de la pièce, garder les unités d'échantillonnage réfrigérées (0 à 5 °C) ou congelées, selon la nature du produit. Dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou dans des conditions de temps et de température qui empêchent la prolifération ou la mort microbienne. Les aliments qui sont partiellement dégelés devraient être entreposés dans un réfrigérateur.

**Note :** Utiliser des contenants appropriés pour s'assurer que les égouttements du produit ne contaminent pas l'environnement du laboratoire.

- 7.1.2 Si l'unité d'échantillonnage reçue pour analyse est inférieure à l'unité analytique recommandée, analyser toute la quantité et enregistrer le poids utilisé. Ajuster le volume du bouillon d'enrichissement pour maintenir une dilution de 1 pour 10 de l'échantillon.
- 7.1.3 Utiliser des techniques aseptiques et de l'équipement stérile à toutes les étapes de l'analyse. Le confinement pendant la manipulation de produits en poudre est crucial si on veut éviter une contamination croisée de l'environnement de travail.

## **7.2 Préparation de l'analyse**

- 7.2.1 Avoir à sa disposition du bouillon d'enrichissement, d'autres milieux et des fournitures stériles.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail à l'aide d'un désinfectant approprié.

## **7.3 Préparation des échantillons**

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités analytiques peuvent être combinées. Effectuer le test conformément aux instructions suivantes :

- 7.3.1 Afin d'assurer que l'unité analytique est vraiment représentative, agiter les liquides ou les substances fluides jusqu'à ce qu'elles soient homogènes. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, constituer l'unité analytique en prélevant des portions à plusieurs endroits. Afin de réduire la charge de travail, les unités analytiques peuvent être regroupées pour l'analyse. Il est recommandé que l'échantillon composite ne contienne pas plus de cinq unités analytiques.

## **7.4 Pré-enrichissement et enrichissement**

- 7.4.1 Peser de façon aseptique 25 g ou ml (l'unité analytique) dans un sac à stomacher avec filtre et ajouter 225 ml de Bouillon nutritif. Voir la méthode MFHPB-20 (Volume 2) pour l'utilisation d'autres bouillons d'enrichissement. Incuber pendant  $22 \pm 2$  heures à 35 °C.

**NOTE :** Tout milieu d'enrichissement doit être préchauffé à la température ambiante avant l'inoculation.

- 7.4.2 Retirer la culture pré-enrichie de l'incubation et bien mélanger. Transférer 1 ml de culture pré-enrichie à 10 ml de bouillon de tétrathionate (TBG). Transférer 0,1 ml de culture pré-enrichie à 10 ml de bouillon Rappaport-Vassiliadis (RV). Incuber la culture TBG pendant 18 à 24 heures à 35 °C et la culture RV pendant 18 à 24 heures à 42 °C.
- 7.4.3 Retirer les cultures TBG et RV de l'incubation et bien mélanger. Transférer 1 ml de la culture TBG à 10 ml de bouillon Gram négatif (GN). Transférer 1 ml de la culture RV à un second 10 ml de GN. Incuber les cultures GN pendant 6 heures à 35 °C. Garder les cultures TBG et RV au réfrigérateur pour une confirmation possible.

**NOTE :** Les bouillons GN peuvent être réfrigérés pendant la nuit ou jusqu'à 48 heures avant l'essai GENEQUENCE.

- 7.4.3 Effectuer l'essai GENEQUENCE en utilisant un échantillon combiné contenant 0,2 ml de chaque culture GN. Garder les cultures GN au réfrigérateur pour une confirmation possible.

## **7.5 Méthode d'analyse**

**NOTE :** Tous les transferts à la pipette doivent être effectués en utilisant soit une pipette jetable et une poire à pipette ou une micropipette avec embouts jetables. Ne pas pipetter à la bouche. Cet essai doit être effectué dans des conditions normales d'essais en laboratoire quant à l'humidité, à l'éclairage, etc. Les étapes nécessitant une incubation à la température ambiante doivent être effectuées entre 18 et 30°C. Les réactifs de la trousse qui ont été réfrigérés doivent être équilibrés à la température ambiante avant utilisation, mais ne doivent pas être laissés non réfrigérés pendant de longues périodes.

### 7.5.1 Avant de commencer l'essai :

7.5.1.1 Allumer le bain-marie ou le bloc chauffant et en ajuster la température à 65 °C. Le bain-marie doit être rempli à un niveau d'environ 3,8 cm (1,5 pouce). Les puits du bloc de chauffage doivent être remplis environ au tiers avec de l'eau déionisée.

7.5.1.2 À la bouteille de réactif 1A (réactif de lyse concentré), ajouter 6 ml de la solution 1B (tampon de réactif de lyse). Dissoudre le contenu en remuant doucement et placer la bouteille sur de la glace.

**NOTE :** Le réactif de lyse est stable sous forme reconstituée pendant 60 jours lorsque entreposé à -20 °C. Pour décongeler, placer la bouteille à la température ambiante. Lorsque décongelée, placer sur de la glace (une congélation-décongélation n'affecte pas de manière défavorable le réactif reconstitué).

7.5.1.3 Pour chaque échantillon à analyser, étiqueter une éprouvette en verre de 12 x 75 mm avec l'identification d'échantillon appropriée et la placer dans un support. Inclure des tubes pour 1 contrôle positif et 1 contrôle négatif par série d'essai expérimental.

7.5.1.4 Préparer la solution de lavage 1X. Diluer la solution 4 (solution de lavage concentrée 20X) en mélangeant le contenu d'une bouteille (50 ml) avec 950 ml d'eau distillée ou déionisée. Remplir le réservoir à tampon de l'appareil de lavage de plaques (voir les instructions du fabricant pour le réglage et l'utilisation).

**NOTE :** La solution de lavage 1X peut être entreposée jusqu'à 60 jours dans une bouteille fermée à la température ambiante.

7.5.1.5 Préparer un mélange des solutions 2 et 3 dans un contenant de plastique ou de verre de grosseur appropriée dans une proportion de 4 pour 1 afin d'obtenir une quantité suffisante pour le nombre d'échantillons à analyser. Utiliser la formule ci-dessous ou voir la charte de mélange incluse dans la trousse d'essais.

Volume de la solution 2 =  $[(N \times 0,1) + 1,6]$  ml

Volume de la solution 3 =  $[(N \times 0,025) + 0,4]$  ml

où N représente le nombre d'échantillons à analyser, y compris les contrôles

**NOTE :** La formule ci-dessus prévoit un excédent de volume de 2,0 ml; un excédent de volume différent peut être approprié selon le type de contenant utilisé pour préparer le mélange.

7.5.1.6 Placer le nombre approprié de micropuits enduits dans le cadre de la plaque, en remplissant le cadre de gauche à droite et de l'avant à l'arrière en rangées de 8. Inclure des puits pour le blanc de réactif, le contrôle négatif et le contrôle positif. Éviter de toucher le fond des puits. Si la dernière rangée compte moins de 8 puits, remplir la rangée comme nécessaire (des puits colorés spéciaux sont disponibles chez Neogen Corp. dans ce but).

### 7.5.2. Procédure d'essai

- 7.5.2.1 Mélanger les cultures d'échantillons (cultures GN). Ajouter 0,2 ml de chacune des deux cultures GN pour chaque échantillon aux tubes appropriés (0,2 ml de chacune des deux cultures GN pour chaque échantillon combiné dans un tube). Agiter les solutions de contrôle positif et de contrôle négatif et ajouter 0,4 ml de chaque contrôle aux tubes appropriés.
- 7.5.2.2 Ajouter 0,1 mL de la solution 1 (réactif de lyse reconstitué) à chaque tube. Agiter manuellement le support à tubes pendant 5 secondes. La solution résultante doit être de couleur bleue. Si l'un des tubes n'est pas bleu, vérifier pour l'ajout approprié du réactif. Incuber les tubes dans le bain-marie ou le bloc de chauffage à 65 °C pendant 5 minutes.
- 7.5.2.3 Retirer les tubes du bain-marie ou du bloc de chauffage à 65 °C. Transférer 0,150 ml de chaque échantillon lysé, y compris les contrôles, dans le micropuits désigné. Le premier puits doit être réservé pour le blanc de réactif et ne doit pas recevoir d'échantillon. Le deuxième puits doit être utilisé pour le contrôle négatif et le troisième, pour le contrôle positif.
- 7.5.2.4 Mélanger vigoureusement les solutions 2 et 3 (solution hybridation/sonde) préparées à l'étape 7.5.1.5 ci-dessus. Ajouter 0,125 ml à chaque puits sauf au puits du blanc de réactif. Dans le cas où une pipette multi-canaux est utilisée, mélanger le contenu des puits en aspirant et retournant le contenu dans les puits au moins 5 fois. Sinon, agiter la plaque sur un agitateur rotatif à la température ambiante pendant 2 minutes à 150 tr/min.
- 7.5.2.5 Incuber la plaque dans un bloc de chauffage recouvert ou un incubateur à air à 45 °C pendant 60 minutes.
- 7.5.2.6 Laver les puits 5 fois à la température ambiante en utilisant un appareil de lavage de bandelettes de micropuits. Pour chaque cycle de lavage, traiter une bandelette de 8 puits à la fois, en aspirant le liquide, en remplissant les puits et en passant ensuite à la bandelette suivante. Après le dernier lavage, aspirer le liquide des puits, enlever ensuite le liquide résiduel en inversant la plaque et en la secouant sur un papier absorbant. Tenir la plaque en pressant doucement les côtés du cadre pour garder les bandelettes en place.
- 7.5.2.7 Ajouter 0,15 ml de la solution 5 (solution de substrat chromogène) à chaque puits, y compris le puits du blanc de réactif. Incuber la plaque à la température ambiante pendant 20 minutes.
- 7.5.2.8 Ajouter 0,5 ml de la solution 6 (solution d'arrêt) à chaque puits, y compris le puits de blanc de réactif. Taper doucement le côté du cadre de la plaque à quelques reprises pour s'assurer que le tout est bien mélangé.
- 7.5.2.9 Lire l'absorbance à 450 nm en utilisant un lecteur de plaque ou de bandelette conformément aux instructions du fabricant. Faire le blanc en utilisant le premier puits contenant le substrat chromogène et la solution d'arrêt (ne pas faire le blanc avec de l'air).

## **7.6 Interprétation des résultats**

### **7.6.1 Valeurs des contrôles**

La valeur d'absorbance pour le contrôle négatif doit être  $\leq 0,15$ . Sinon, l'essai est erroné et doit être répété.

La valeur d'absorbance pour le contrôle positif doit être  $\geq 1,00$ . Sinon, l'essai est erroné et doit être répété.

### **7.6.2 Critère négatif**

Les analyses produisant une valeur d'absorbance  $< 0,10$  indiquent l'absence de *Salmonella* spp.

dans l'échantillon d'essai.

#### 7.6.3 Critère positif

Les analyses produisant une valeur d'absorbance de  $\geq 0,10$  indiquent la présence de *Salmonella* spp. dans l'échantillon d'essai. Ces échantillons doivent être confirmés par des procédures de cultures normalisées.

#### 7.7 **Confirmation des résultats positifs**

Les échantillons positifs doivent être confirmés par des cultures de la façon décrite dans la méthode MFHPB-20. Ensemencer des plaques des géloses sélectives spécifiées et confirmer à l'aide de procédures biochimiques et sérologiques.

#### 7.8 **Limitations**

Les sondes d'ADN utilisées dans cette trousse ne réagissent pas avec les sérotypes de l'espèce *Salmonella bongori*.

### 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 D'Aoust et Purvis. 1998. Isolement et identification de *Salmonella* dans les aliments. Volume 2. Compendium de méthodes. Santé Canada.  
[http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume\\_2/f\\_mfhp2001.html](http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_2/f_mfhp2001.html)
- 8.2 Comité technique 34. Microbiologie des aliments et moulée animale-- *Méthode horizontale pour la recherche de Salmonella spp.* Organisation internationale de normalisation. (ISO 6579:2002, 4<sup>e</sup> édition). Organisation internationale des normes : Genève. Ce document est disponible à l'adresse suivante : <http://www.iso.ch/iso/fr/CatalogueDetailPage.CatalogueDetail?CSNUMBER=29315&ICS1=7&ICS2=100&ICS3=30>
- 8.3 US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Microbiology Laboratory Guidebook [Internet]. Washington : The Dept; c1998 [rev 2001 January 10; cited 2003 June]. Chapitre 4, Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, and Egg Products [environ 14 écrans]. Ce document est disponible à l'adresse suivante : <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgchp4.pdf>
- 8.4 US Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual Online [Internet]. Washington : The Admin; c1998 [rev 2001 October; cited 2003 June]. Chapitre 5, *Salmonella* [environ 12 écrans]. Ce document est disponible à l'adresse suivante : <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>