



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉTECTION DE *SALMONELLA SPP.* DANS LES ALIMENTS PAR LA MÉTHODE VIDAS SLM^{MC}

Jean-Yves D'Aoust
Division de la recherche en microbiologie

Direction générale des produits de santé et des aliments (DGPSA)
Santé Canada, Repère postal : 22 04 A2
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Jean-Yves_D'Aoust@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détection de *Salmonella spp. viables* dans les aliments afin de déterminer la conformité des aliments avec les articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*. Lorsqu'une méthode officielle est prescrite pour certains aliments, la méthode officielle aura préséance sur la présente méthode.

2. DESCRIPTION

Le test immuno-enzymatique VIDAS SLM^{MC} (*Salmonella*), ci-après appelé test VIDAS, permet la détection de *Salmonella* dans les aliments et les produits agricoles. Les résultats présumément positifs avec le test VIDAS doivent être confirmés par le recouvrement de salmonelles viables à partir des cultures d'enrichissement et de post-enrichissement utilisées dans le test VIDAS.

En avril 1994, l'Association française de normalisation (AFNOR) homologuait le test VIDAS à la méthode ISO 6579 de l'Organisation internationale de normalisation (9.1). En mai 1996, l'Official Methods Board of the Association of Analytical Chemists (AOAC) adoptait le test Vidas comme méthode **996.08** en première instance (9.4) à la suite d'une étude collaborative démontrant une même sensibilité du test Vidas et de la méthode BAM / AOAC de la Food and Drug Administration américaine (9.2, 9.3). Une étude comparative menée par Santé Canada en 1996-1997 (D'Aoust *et coll.*, données non publiées) démontrait l'équivalence du test Vidas à la méthode MFHPB-20 (9.5) pour la détection de salmonelles dans des produits alimentaires et agricoles.

3. PRINCIPE

Le test VIDAS (Système d'analyse d'immunodiagnostique Vitek) permet la détection automatisée par immunofluorescence enzymatique de salmonelles mobiles et non-mobiles. L'efficacité du système repose sur l'affinité et la spécificité de ses anticorps pour les antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) de *Salmonella*. La surface interne du réceptacle en phase solide (RPS), cône jetable qui ressemble à un embout de pipette, est pourvue d'anticorps monoclonaux spécifiques pour la capture d'antigènes de *Salmonella* présents dans l'échantillon. La configuration du test VIDAS prévient toutes réactions non spécifiques à la surface interne du RPS. Tous les réactifs pour le test, y compris les solutions de lavage, le conjugué de la phosphatase alcaline et le substrat de la phosphatase se retrouvent dans des cartouches à chambres multiples scellées et prêtes à l'emploi.

L'appareil VIDAS effectue toutes les étapes de l'analyse de façon séquentielle et automatique. Après l'ajout manuel d'une portion du bouillon de post-enrichissement (bouillon M), préalablement porté à ébullition, dans la chambre échantillon de la cartouche, le RPS prélève et expulse de façon répétitive et pour une période programmée le contenu de la chambre. Cette opération permet aux anticorps déjà adsorbés à la paroi interne du RPS de fixer les antigènes de *Salmonella* dans l'échantillon. Les composants non fixés de l'échantillon sont éliminés par lavage. Les complexes [anticorps-antigène] nouvellement formés sur la paroi interne du RPS sont alors mis en présence d'anticorps polyclonaux conjugués à la phosphatase alcaline par l'aspiration répétitive et programmée du conjugué au niveau du RPS. Les conjugués non fixés sont éliminés par lavage. La mise en contact des complexes [anticorps-antigène-conjugué] sur la surface interne du RPS avec le substrat fluorogénique 4-méthyl-umbelliferyl phosphate engendre la conversion du substrat au 4-méthyl-umbellifère fluorescent. L'intensité de la fluorescence émise est mesurée par balayage optique et exprimée en terme de fluorescence relative (Rf). Les échantillons présentant une valeur $Rf \geq 0.23$ sont présumément positifs pour *Salmonella* spp.

VIDAS SLM^{MC} est une marque de commerce déposée de bioMérieux.

4. DÉFINITIONS

Voir l'annexe A du volume 2.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

5.1 Échantillonnage

Voir l'annexe B du volume 2.

5.2 Rigueur de l'échantillonnage

Les efforts de surveillance des aliments sont souvent axés sur des procédés et des types de produits qui présentent des risques importants pour la santé humaine. La Commission internationale pour les spécifications microbiologiques des aliments (CISMA) a classé les aliments selon le degré de risque associé à leur manipulation et à leur préparation. À chaque catégorie d'aliments correspond un plan d'échantillonnage assez rigoureux pour déterminer l'acceptabilité du produit (Tableau I).

5.3 Plans d'échantillonnage de « routine » et « à des fins d'enquête »

La présence de *Salmonella* dans les aliments et les ingrédients alimentaires comporte trois niveaux de risque (Tableau I). Les critères et circonstances justifiant un plan d'échantillonnage de « routine » et « à des fins d'enquête » figurent au Tableau II. Les plans d'échantillonnage de « routine » permettent de déceler des niveaux de contamination pouvant nécessiter une intervention réglementaire et/ou un examen plus approfondi du produit. Diverses circonstances peuvent justifier un échantillonnage « à des fins d'enquête ». Le choix du plan d'échantillonnage découle parfois d'un jugement subjectif en raison du nombre et de la nature des facteurs contribuant au degré de risque.

6. MATÉRIEL ET EQUIPEMENT

- 1) Un système VIDAS 30 de grande capacité ou un système miniVIDAS de capacité réduite.
- 2) Trousse d'essai VIDAS *Salmonella* SLM (réf. 30 702)
La trousse d'essai VIDAS contient les réactifs, les standards et les contrôles nécessaires à l'analyse de 60 échantillons. La trousse est disponible chez bioMérieux Canada Inc., 4535 Dobrin, Saint-Laurent (Québec) H4R 2L8. Téléphone : (514) 336-7321; Télécopieur : (514) 336-6450.

La trousse contient :

- 60 cartouches SLM prêtes à l'emploi
 - 60 RPS prêts à l'emploi
 - standard SLM S1 (1 x 6 mL)
 - Contrôle positif SLM C1 (1 x 6 mL)
 - Contrôle négatif SLM C2 (1 x 6 mL)
 - Carte MLE (fiche pour la calibration du test)
- 3) Pipette calibrée à embout jetable pour volume $\geq 500 \mu\text{L}$
 - 4) Étuve ou bain-marie capables de maintenir des températures de 35°C à $42,5^{\circ}\text{C}$.
 - 5) Bain-marie (100°C) ou système équivalent

NOTE: Il incombe à chaque laboratoire de veiller à ce que les étuves et les bains-marie maintiennent la température requise. Lorsque la méthode préconise une température de 35°C , l'étuve ou le bain-marie doivent maintenir $35 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Cependant, les variations de température à $42,5^{\circ}\text{C}$ ne peuvent dépasser $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ au risque d'engendrer des effets inhibiteurs à des températures plus élevées.

- 6) Bouillons de pré-enrichissement
 - Bouillon nutritif (NB)
 - Eau peptonée tamponnée (BPW)
 - Bouillon lactosé (LAC)
 - Solution aqueuse au vert brillant
 - Milieu au lait écrémé
 - Bouillon de trypticase (tryptic) soja avec K_2SO_3 à 0,5%
- 7) Bouillons d'enrichissement :
 - Tétrathionate vert brillant (TBG)
 - Sélénite cystine (SC)
- 8) Bouillon de post-enrichissement :
 - Bouillon M
- 9) Milieux d'ensemencement :
 - Sulfite de bismuth (BS)
 - Sulfapyridine au vert brillant (BGS)
- 10) Gélose de purification :
 - MacConkey
 - Nutritive (NA)

- 11) Dépistage biochimique :
 - Gélose aux trois sucres et fer (TSI)
 - Gélose lysine et fer (LIA)
 - Gélose à l'urée (Christensen)
 - Trousses commerciales d'analyse biochimique
- 12) Confirmation sérologique :
 - Antisérums polyvalents et monovalents somatiques (O) et flagellaires (H)
- 13) Mélangeur, Stomacher, sacs à Stomacher avec filtre
- 14) pH mètre ou papier d'une sensibilité de 0,3 à 0,5 unité dans la gamme de pH 5,0 - 8,0
- 15) 1N NaOH , 1N HCl
- 16) Solution saline physiologique

7. MARCHE À SUIVRE

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible. Au besoin, conserver ces dernières pendant une période et à une température qui ne favorisent pas la croissance ou la perte de la microflore indigène. Échantillonner le lot à nouveau si des unités d'échantillonnage ont été abusées lors de leur acheminement au laboratoire d'analyse.
 - a. Aliments surgelés : Conserver 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 secs et à conservation prolongée peuvent être entreposés à la température de la pièce.
 - c. Réfrigérer tous les autres aliments incluant ceux qui ont été reçus dans un état de décongélation. Analyser ces échantillons le plus rapidement possible, de préférence dans les 24 h suivant leur réception.
- 7.1.2 Décongeler les unités d'échantillonnage congelés en 60 minutes à la température de la pièce; sinon, laisser décongeler au réfrigérateur (4 – 10 °C).

- | | |
|----------------|---|
| Notes : | <ol style="list-style-type: none"> a) Les unités d'échantillonnage volumineux (dinde entière, par exemple) dégèlent très lentement au réfrigérateur. Pour accélérer la décongélation, placer l'unité d'échantillonnage congelé dans un sac de papier épais et la laisser décongeler toute la nuit à la température de la pièce. Cette technique garde la surface du produit froide durant la période de décongélation. b) Il faut prévoir des contenants appropriés pour recueillir les égouttures du produit évitant ainsi de contaminer le laboratoire. |
|----------------|---|

- 7.1.3 Si le poids de l'unité d'échantillonnage reçue est inférieur au poids requis pour l'unité d'analyse, analyser la quantité disponible et consigner le poids exact utilisé.
- 7.1.4 L'homogénéisation des unités d'analyse au moyen d'un mélangeur ou d'un appareil Stomacher doit se limiter au temps minimum nécessaire pour obtenir une suspension homogène. Sinon, on risque de porter atteinte à la viabilité et au recouvrement de *Salmonella* spp.
- Pour un produit déjà homogène, disperser l'unité d'analyse dans le bouillon de pré-enrichissement approprié.
- 7.1.5 Utiliser des techniques aseptiques et du matériel stérile à toutes les étapes de l'analyse. Une manipulation attentive des produits en poudre est de rigueur afin d'éviter la contamination croisée du milieu de travail.

7.2 Enrichissement en milieu non sélectif (pré-enrichissement)

7.2.1 Groupement des unités d'analyse

Afin de réduire la charge de travail, un maximum de 15 unités d'analyse de 25 g (ml) chacun peuvent être réunies en un seul échantillon d'analyse de 375 g (ml).

Si une unité d'échantillonnage comporte plus d'un contenant, mélanger dans des conditions d'asepsie le contenu des contenants avant d'en retirer l'unité d'analyse. Si cette approche n'est pas possible ou pratique, l'unité d'analyse sera alors constituée de portions égales de chaque contenant.

7.2.2 Analyse de l'échantillon

7.2.2.1 Ajouter l'unité d'analyse (25g) au bouillon de pré-enrichissement approprié (Tableau III). Le bouillon nutritif (NB), l'eau peptonée tamponnée (BPW) et le bouillon lactosé (LAC) présentent la même fiabilité et peuvent servir, de façon interchangeable, de milieu général de pré-enrichissement (9.6, 9.7).

7.2.2.2 Si le pH de l'unité d'analyse en bouillon de pré-enrichissement ne se situe pas entre 6,0 et 7,0 , ajuster le pH au moyen de NaOH 1N ou de HCl 1N .

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

7.2.2.3 Un témoin positif *Salmonella* et un témoin négatif de milieux sont analysés en parallèle avec les unités d'analyse.

7.2.2.4 Incuber les bouillons de pré-enrichissement et les témoins positif et négatif à 35°C pendant 18 - 24 h.

NOTE : Les résultats de l'épreuve sont invalides s'il y a croissance dans le témoin négatif ou absence de croissance dans le témoin positif.

7.3 Enrichissement en milieu sélectif

7.3.1 Analyse de l'échantillon

7.3.1.1 Utiliser une pipette stérile pour transférer 1,0 ml de la culture de pré-enrichissement dans 9,0 ml de chacun des bouillons de sélénite cystine (SC) et de tétrathionate au vert brillant (TBG).

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

7.4 Post-enrichissement

7.4.1 Analyse de l'échantillon

7.4.1.1 Transférer 1,0 ml de chacune des cultures de SC et TBG dans des tubes distincts contenant 10 ml de bouillon M. Conserver les cultures SC et TBG restantes de viandes crues et autres produits contenant des taux élevés de microflore naturelle sous réfrigération (4 -10°C) pour les tests de confirmation (8.1). Par contre, réincuber les cultures d'enrichissement de 6 - 8h des aliments déshydratés et autres produits contenant de faibles taux de microflore naturelle pour une période totale de 18-24h; après incubation, conserver ces cultures d'enrichissement sous réfrigération (4 -10°C) pour les tests de confirmation (8.1).

7.4.1.2 Incuber à 42,5°C les bouillons Mensemencés pendant 6 - 8 h (viandes crues et produits contenant des taux élevés de microflore naturelle) ou pendant 16-18 h (aliments déshydratés et produits contenant de faibles taux de microflore naturelle).

7.4.1.3 Après incubation, homogénéiser le contenu des deux cultures M et combiner 1,0 ml de chacune dans un seul tube à essai Conserver les cultures M restantes sous réfrigération (4 -10°C) pour les tests de confirmation (8.1).

7.4.1.4 Chauffer le tube contenant le mélange de cultures M pendant 15 minutes dans un bain-marie à 100°C

7.4.1.5 Effectuer le test VIDAS SLM (7.5) sur une portion de l'échantillon chauffé (7.4.1.4).

7.5 Mode opératoire VIDAS SLM

7.5.1 Retirer la trousse VIDAS SLM du réfrigérateur afin de permettre à ces composants d'atteindre la température de la pièce (minimum de 30 minutes). Tous les composants non utilisés doivent être réfrigérés (2 - 8°C).

7.5.2 Identifier les cartouches SLM en inscrivant les numéros d'identification appropriés de l'échantillon dans l'espace prévu à cette fin.

- 7.5.3 Créer une liste de travail en inscrivant le code du test « SLM » et le nombre d'épreuves à effectuer.
- 7.5.4 Si un standard doit être testé, entrer « S1 » pour l'identification de l'échantillon. Il faut inscrire un standard au début de la liste de travail et l'analyser en double pour le mémoriser. Si un échantillon doit être testé sur un système miniVIDAS, entrer « S » puis « 1 » pour l'identification de l'échantillon.
- 7.5.5 Bien homogénéiser les standards, les contrôles et les échantillons traités à lachaleur avec un appareil Vortex ou autre homogénéisateur.
- 7.5.6 Ajouter 500 µL de standard, de contrôle ou d'échantillon dans les puits d'échantillonnage d'une cartouche de réactif SLM.
- 7.5.7 Placer les RPS et les cartouches aux emplacements indiqués à l'écran et commencer l'épreuve de la façon décrite dans le manuel d'utilisation. Le test s'effectue en 45minutes.

8. INTERPRÉTATION

Les tests VIDAS SLM produisant une fluorescence relative (R_f) $\geq 0,23$ indiquent la présence présumée de *Salmonella* dans l'échantillon. Confirmer par culture tous les résultats présumément positifs.

8.1 Confirmation par culture des résultats VIDAS présumément positifs

- 8.1.1 Ensemencer à l'aide d'uneanse (4 mm) les cultures SC, TBG et M préalablement réfrigérés (7.4.1.1 et 7.4.1.3) sur des géloses BS et BGS selon la méthode MFHPB-20 (9.5).
- 8.1.2 Ensemencer jusqu'à trois colonies suspectes provenant de chaque gélose présumément positive sur gélose MacConkey pour purification. Soumettre les isolats à une analyse biochimique (Tableau 4) et confirmer les résultats par sérologie selon la méthode MFHPB-20 (9.5).

Avertissement :	Des cultures non-agglutinantes aux caractéristiques évocatrices de la présence de <i>Salmonella</i> spp. ne doivent pas être écartées mais plutôt transmises à un laboratoire de référence pour une identification complète.
------------------------	--

9. RÉFÉRENCES

- 9.1 Organisation internationale de normalisation (ISO).1993.Microbiologie-Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*. Norme internationale ISO 6579. Genève.
- 9.2 U.S. Food and Drug Administration . 1995. *Salmonella* (Chapter 5). *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), 8^eédition. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- 9.3 Curiale, M.S., V. Gangar, et C. Cravens. 1997. VIDAS enzyme-linked immunofluorescent assay for detection of *Salmonella* in food: collaborative study. J. AOAC Intern. **80**:491-504.

- 9.4 Association of Official Analytical Chemists. 1996. For your information. Methods adopted First Action. J. AOAC Intern. **79**: 76a.
- 9.5 D'Aoust, J.-Y. et U. Purvis. 1998. Isolement et identification des *Salmonella* dans les aliments MFHPB-20. (Vol. 2). *Compendium de méthodes*. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.
- 9.6 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.
- 9.7 D'Aoust, J.-Y. 2000. *Salmonella* (Chapter 45; Vol. II). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. B.M. Lund, A.C. Baird-Parker and G.W. Gould (éds). Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Md.
- 9.8 D'Aoust, J.-Y. 1977. Effect of storage conditions on the performance of bismuth sulfite agar. J. Clin. Microbiol. **5**: 122-124.
- 9.9 Commission internationale pour les spécifications microbiologiques des aliments (CISMA). 1986. *Microorganisms in Foods 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications*. Second edition. University of Toronto Press, Toronto , ON.

10. MILIEUX ET RÉACTIFS

10.1 Antisérums, *Salmonella*

- a. Antisérums somatiques polyvalents
- b. Antisérums somatiques monovalents

Préparer les antisérums en suivant les instructions du fabricant. Vérifier périodiquement la fiabilité des réactifs au moyen de cultures témoins de *Salmonella*.

10.2 Gélose au sulfite de bismuth (BS)

Peptone	10,0 g
Extrait de boeuf	5,0 g
Dextrose	5,0 g
Phosphate disodique	4,0 g
Sulfate ferreux	0,3 g
Indicateur de sulfite de bismuth	8,0 g
Vert brillant	0,025 g
Gélose	20,0 g

Mettre les ingrédients en suspension dans un litre d'eau distillée et bien mélanger. Chauffer uniformément le milieu jusqu'à ébullition à l'aide d'une plaque chauffante plutôt qu'au-dessus d'une flamme nue. Agiter souvent le milieu pendant le chauffage. Ne pas stériliser à l'autoclave. Refroidir à 45 - 50°C et agiter le milieu pour disperser le précipité lourd juste avant de couler la gélose dans les boîtes.

NOTE : La gélose au sulfite de bismuth peut inhiber la croissance de *Salmonella* spp. à moins que les boîtes ne soient réfrigérées à 4-10°C pendant 24h avant l'ensemencement. S'il n'y a aucune croissance après 24h, réincuber les boîtes pendant 24 h. Pour un milieu fraîchement préparé, incuber les boîtes ensemencées pendant 48h (8.8).

10.3 Gélose à la sulfapyridine additionnée de vert brillant

Extrait de levure	3,0 g
Peptone	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sucrose	10,0 g
Rouge de phénol	0,08 g
Vert brillant	12,5 mg
Sulfapyridine	1,0 g
Gélose	20,0 g
pH final	6,9 ± 0,2

Mettre les ingrédients en suspension dans un litre d'eau distillée. Chauffer jusqu'à ébullition en agitant fréquemment. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et laisser refroidir à 45-50°C. Couler la gélose dans les boîtes et laisser sécher en retirant partiellement les couvercles.

10.4 Solution aqueuse au vert brillant

Vert brillant	0,02 g
Eau stérile	1 L

Dissoudre 1,0 g de vert brillant dans 100 ml d'eau stérile (1% p/v). Ajouter 2,0 ml de la solution au vert brillant à 1 % à un litre d'eau stérile (concentration finale de 0,002 % p/v).

10.5 Eau peptonée tamponnée (BPW)

Peptone	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	3,5 g
Phosphate diacide de potassium	1,5 g
pH final	7,2 ± 0,2

Dissoudre 20,0 g dans 1 litre d'eau distillée. Verser dans des contenants de verre appropriés et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

10.6 Bouillon lactosé (LAC)

Extrait de boeuf	3,0 g
Peptone	5,0 g
Lactose	5,0 g
pH final	6,9 ± 0,2

Dissoudre 13,0 g dans 1 litre d'eau distillée. Verser dans des contenants de verre appropriés et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

10.7 Gélose lysine-fer (LIA)

Peptone	5,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Dextrose	1,0 g
L-lysine	10,0 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Thiosulfate de sodium	0,04 g
Pourpre de bromocrésol	0,02 g
Gélose	15,0 g
pH final	6,7 ± 0,2

Mettre les ingrédients en suspension dans un litre d'eau distillée et faire chauffer jusqu'à ébullition en agitant fréquemment. Répartir le volume approprié de gélose dans des tubes et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Laisser refroidir en position inclinée pour former des culots profonds.

10.8 **Bouillon M**

Extrait de levure	5,0 g
Tryptone	12,5 g
D-Mannose	2,0 g
Citrate de sodium	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	5,0 g
Chlorure de manganèse	0,14 g
Sulfate de magnésium	0,8 g
Sulfate ferreux	0,04 g
Tween ^R 80	0,75 g
pH final	7,0 ± 0,2

Mettre les ingrédients en suspension dans un litre d'eau distillée et faire chauffer jusqu'à ébullition en agitant pendant 1-2 minutes. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Laisser refroidir et distribuer au besoin.

10.9 **Gélose MacConkey**

Peptone	17,0 g
Protéose peptone	3,0 g
Lactose	10,0 g
Mélange de sels biliaires	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	0,03 g
Violet de gentiane	0,001 g
Gélose	13,5 g
pH final	7,1 ± 0,2

Mettre les ingrédients en suspension dans un litre d'eau distillée et faire chauffer jusqu'à ébullition en agitant fréquemment. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et laisser refroidir à 45 - 50°C. Couler la gélose dans les boîtes et laisser sécher en retirant partiellement les couvercles.

10.10 **Gélose nutritive**

Peptone	5,0 g
Extrait de boeuf	3,0 g
Gélose	15,0 g

pH final 6,8 ± 0,2

Mettre les ingrédients en suspension dans un litre d'eau distillée et faire chauffer jusqu'à ébullition en agitant fréquemment. Verser la gélose dans des tubes et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Laisser refroidir les tubes en position inclinée.

10.11 Bouillon nutritif (NB)

Peptone	5,0 g
Extrait de boeuf	3,0 g
pH final	6,8 ± 0,2

Dissoudre les ingrédients dans un litre d'eau distillée. Verser dans des contenants de verre appropriés et stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

10.12 Solution physiologique

Chlorure de sodium	8,5 g
--------------------	-------

Dissoudre l'ingrédient dans un litre d'eau distillée. Verser dans des contenants de verre appropriés et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

10.13 Bouillon sélénite cystine (SC)

Tryptone ou peptone	5,0 g
Lactose	4,0 g
Phosphate disodique	10,0 g
Sélénite mono-acide de sodium	4,0 g
L-cystine	0,01 g
pH final	7,0 ± 0,2

Mettre les ingrédients en suspension dans un litre d'eau distillée et chauffer pendant 10 minutes sous vapeur libre ou jusqu'à ébullition sur une plaque chauffante en agitant fréquemment. Ne pas stériliser à l'autoclave. Refroidir à 45- 50°C et répartir le milieu dans des contenants de verre appropriés. Utiliser le milieu le jour de sa préparation.

NOTE : Les sels de sélénium peuvent être tératogènes et doivent être manipulés sous une hotte.

10.14 Milieu au lait écrémé

Poudre de lait écrémé	100,0 g
Vert brillant	0,02 g

Dissoudre la poudre de lait écrémé dans un litre d'eau distillée et ajouter 20 ml de solution au vert brillant à 0,1 % (p/v) (concentration finale de 0,002 % p/v). Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

10.15 Bouillon au tétrathionate additionné de vert brillant (TBG)

a. **Milieu de base**

Peptone ou protéose peptone	5,0 g
Sels biliaires	1,0 g
Carbonate de calcium	10,0 g
Thiosulfate de sodium	30,0 g
pH final	8,4 ± 0,2

Mettre les ingrédients du milieu de base en suspension dans un litre d'eau distillée et chauffer jusqu'à ébullition. Laisser refroidir à 45- 50°C.

b. Solution aqueuse au vert brillant (1 % p/v)

Dissoudre 1,0 g de vert brillant dans 100 mL d'eau distillée.

c. Solution d'iode

Iodure de potassium	25,0 g
Iode	30,0 g
Eau distillée	100,0 mL

Mettre les ingrédients en suspension dans 100 ml d'eau distillée. Ne pas chauffer. Il faut préparer la solution d'iode longtemps d'avance parce que l'iode se dissout très lentement.

Pour préparer le milieu complet le jour où il doit être utilisé, ajouter, dans des conditions d'asepsie, 1,0 ml de la solution aqueuse au vert brillant à 1% et 20 ml de solution d'iode à un litre de milieu de base. Ne pas faire chauffer le milieu après avoir ajouté l'iode.

10.16 Gélose aux trois sucres et fer (TSI)

Extrait de boeuf	3,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Peptone	15,0 g
Protéose-peptone	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sucrose	10,0 g
Dextrose	1,0 g
Sulfate ferreux	0,2 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Gélose	12,0 g
Rouge de phénol	0,024 g
pH final	7,4 ± 0,2

Mettre les ingrédients en suspension dans un litre d'eau distillée et chauffer jusqu'à ébullition en agitant à l'occasion. Répartir le volume approprié de gélose dans les tubes et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Laisser refroidir les tubes en position inclinée pour former des culots profonds.

10.17 Bouillon de trypticase (peptone trypsique, tryptone) soja

Tryptone	17,0 g
Peptone de soja	3,0 g
Dextrose	2,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,5 g

pH final

7,3 ± 0,2

Dissoudre les ingrédients dans un litre d'eau distillée. Verser dans des contenants de verre appropriés et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

10.18 Gélose à l'urée (Christensen)

a. **Base de gélose**

Peptone	1,0 g
Dextrose	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate acide de potassium	2,0 g
Rouge de phénol	0,012 g
Gélose	15,0 g
pH final	6,8 ± 0,2

Dissoudre les ingrédients du milieu de base dans 900 ml d'eau distillée. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes et laisser refroidir à 45- 50°C.

b. **Solution d'urée**

Dissoudre 20 g d'urée dans 100 mL d'eau distillée et stériliser par filtration.

Pour préparer le milieu complet, ajouter 100 ml de la solution d'urée à 900ml de la base de gélose refroidie à 45- 50°C. Répartir des volumes appropriés du milieu complet dans des tubes et laisser refroidir en position inclinée pour obtenir des culots profonds.

TABLEAU I Plans d'échantillonnage de la CISMA pour la détection de *Salmonella* dans les aliments^a

CISMA			BAM ^e		
Risque lié à la consommation ^a	Cas ^b	Nombre d'unités d'échantillonnage (n)		Niveau de risque	Unités d'échantillonnage (n)
		Analyse/Routin ^c	Analyse / Enquête ^c		
Réduit	10	5	15	III	15
Inchangé	11	10	30	II	30
Accru	12	20	60	I	60

a Indique le niveau de risque associé aux conditions dans lesquelles on prévoit que le produit alimentaire sera manipulé et consommé après l'échantillonnage. Voir tableaux 6 (p. 43) et 7 (p. 48) dans la référence 9.9.

b Les cas sont des terminologies de la CISMA portant sur le degré de préoccupation suscitée par les aliments et les ingrédients alimentaires qui peuvent contenir des *Salmonella* spp. et qui pourraient être impliqués dans des incidents de salmonellose humaine. La rigueur de l'échantillonnage des aliments augmente avec la valeur numérique du cas.

c Voir Tableaux 10 (p. 74) et 11 (p. 77) dans la référence 9.9. Ce sont tous des plans d'échantillonnage à 2 classes (c = 0).

d S'applique aux aliments distribués aux consommateurs présentant un risque élevé d'infection (Tableau 8, p. 55 dans la référence 9.9) ou aux aliments analysés à des fins d'enquête (Tableau 11, p. 77). Ce sont tous des plans d'échantillonnage à 2 classes (c = 0).

e FDA Bacteriological Analytical Manual (9.2), chapitre 1.

TABLEAU II. Circonstances régissant le choix du plan d'échantillonnage de routine ou d'enquête ^a

Échantillonnage de routine	Échantillonnage à des fins d'enquête ^b
A L'ALIMENT	
Tests antérieurs satisfaisants.	Tests antérieurs souvent insatisfaisants.
Les tests indicateurs démontrent l'absence de contamination grave.	Les tests de routine démontrent une contamination grave.
Une cause peu fréquente de toxi-infections .	Une cause fréquente de toxi -infections.
N'est pas soupçonné comme source de toxi-infections .	Aliment provenant du même fabricant est actuellement mis en cause dans la survenue de cas de toxi-infections .
	Aliment probablement porteur de nouveaux sérotypes pathogènes.
	Implication épidémiologique de l'aliment dans des cas de toxi-infections.
Aliment qui n'est pas destiné particulièrement à une population à risque	Aliment suspect et destiné à une population à risque.
	Nouveau type d'aliment ou nouvelle composition qui peut présenter un risque.
	Résultats d'analyse contradictoires provenant de laboratoires différents.
B LE FABRICANT	
Les dossiers sont satisfaisants.	Absence de dossiers.
Les mesures d'hygiène sont habituellement adéquates.	L'absence de mesures hygiéniques adéquates est connue ou soupçonnée.
	Des conditions à risques temporaires ont été identifiées dans l'établissement.

C LE PAYS D'ORIGINE

Surveillance avec compétence les opérations industrielles.

Systèmes rudimentaires de surveillance des opérations industrielles.

Le pathogène n'est pas endémique ou présentement impliqué dans des épidémies de salmonellose d'origine alimentaire .

Situation endémique ou épidémique prévaut.
Taux élevé de porteurs .
Contamination importante des eaux usées.

a Tiré de « Microorganisms in Foods » Vol. 2, Tableau 11, p. 77 (9.9).

b À évaluer en fonction de tous les renseignements disponibles. L'existence d'un seul critère ne justifierait pas nécessairement un échantillonnage à des fins d'enquête.

TABLEAU III. Protocole d'enrichissement en milieu non sélectif (pré-enrichissement)

Type de produit	Niveau de risque ^a (nombre d'unités d'échantillonnage)	Unité d'échantillonnage ^c	Préparation de l'unité d'analyse
Pâtes alimentaires ex. spaghetti, nouilles			
a. Prêtes à consommer	Inchangé (10)	100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC et mélanger. On peut également broyer en fines particules un produit sec à l'aide d'un mélangeur à lames rotatives.
b. À faire cuire	Réduit (5)	100 g	
Noix de coco	Inchangé (10)	100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC et mélanger.
Confiseries			
a. Chocolat et cacao ^b	Inchangé (10)	100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de milieu au lait écrémé et mélanger.
b. Friandises	Inchangé (10)	100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de milieu au lait écrémé et mélanger.
Produits laitiers			
a. Fromage	Inchangé (10)	100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC et mélanger.
b. Lait de consommation	Accru (20)	100 ml	Ajouter 25 mL à 225 ml de solution aqueuse au vert brillant.
c. Crème glacée	Inchangé (10)	100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de solution aqueuse au vert brillant.
d. Produits en poudre ex. petit lait, babeurre	Accru (20)	100 g	Ajouter lentement 25 g à 225 ml de solution aqueuse au vert brillant et laisser la poudre s'imbiber graduellement ^d .
e. Lait écrémé en poudre ^b	Accru (20)	100 g	Ajouter lentement 25 g à 225 ml de solution aqueuse au vert brillant et laisser la poudre s'imbiber graduellement ^d .
Ovoproduits liquides^b	Inchangé (10)	100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC et mélanger.
Cuisses de grenouille^b	Réduit (5)	≥ 25 g	Déposer 25 g dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC.
Viande			
a. Crue	Réduit (5)	format de ≥ 100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon

Type de produit	Niveau de risque ^a (nombre d'unités d'échantillonnage)	Unité d'échantillonnage ^c	Préparation de l'unité d'analyse
b. Cuite	Inchangé (10)	format de ≥ 100 g	nutritif, de BPW ou de LAC et mélanger. Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC et mélanger.
Volaille			
a. Crue	Réduit (5)	i) Volaille entière	Placer la volaille décongelée ou fraîche, les égouttures et les abats (le cas échéant) dans un sac de plastique stérile résistant. Ajouter 1,0 litre de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC et agiter vigoureusement pour que toutes les surfaces de l'échantillon viennent en contact avec le bouillon.
		ii) Morceaux : format de ≥ 100 g	Suivre la méthode décrite ci-dessus pour la volaille entière.
		iii) Abats: format de ≥ 100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC et mélanger.
b. Cuite	Inchangé (10)	100 g	
Aliments préparés ex. pâtés à la viande, repas rapides congelés	Inchangé (10)	format de ≥ 100 g	Combiner 25 g de chaque aliment composant le mets (le cas échéant) en une seule unité d'analyse. Ajouter 9 volumes de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC et mélanger.
Épices et assaisonnements			
a. À faire cuire	Réduit (5)	format de ≥ 100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC et bien mélanger. Le rapport [épice : milieu] devrait être de 1:10 (p/v). Cependant, il faut prévoir un rapport plus élevé pour les épices bactéricides et pour celles qui absorbent une importante quantité de bouillon (Tableau V). Pour les oignons et l'ail, utiliser le bouillon trypticase (tryptic)-soja contenant du K_2SO_3 à 0,5 % (p/v).
b. Prêts à consommer ^e	Inchangé (10)	format de ≥ 100 g	
Levure	Inchangé (10)	Format de ≥ 100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon

Type de produit	Niveau de risque ^a (nombre d'unités d'échantillonnage)	Unité d'échantillonnage ^c	Préparation de l'unité d'analyse
			nutritif , de BPW ou de LAC et bien mélanger.
Autres aliments			
a. Crus	Réduit (5)	Format de ≥ 100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC. Broyer ou mélanger selon le cas.
b. Prêts à consommer	Inchangé (10)	Format de ≥ 100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif, de BPW ou de LAC. Broyer ou mélanger selon le cas.

a Consulter le Tableau I au sujet de la rigueur de l'échantillonnage et du niveau de risque associé à la consommation.

b Méthode Officielle disponible.

c Lorsque le format de consommation est inférieur à 100 g , l'unité d'échantillonnage réunira plus d'un emballage.

d S'assurer que l'échantillon se réhydrate complètement par imbibition. Cette dernière méthode est inadéquate pour l'hydratation de poudre de lait de faible solubilité

e Condiments ajoutés aux aliments préparés avant la consommation : ex. poivre (noir, blanc, de Cayenne, au citron), paprika, piment rouge, persil, cannelle).

TABLEAU IV. Épreuves biochimiques déterminantes

Milieu	Réaction	Observation	Réaction typique de <i>Salmonella</i>
Gélose aux trois sucres et fer (TSI)	Utilisation du lactose et/ou du sucrose	<u>Réaction positive</u> : Pente vire au jaune <u>Réaction négative</u> : Couleur de la pente inchangée	Négative (certaines souches utilisent le lactose et/ou le sucrose)
	Utilisation du dextrose	<u>Réaction positive</u> : Culot jaune avec / sans poches de gaz <u>Réaction négative</u> : Couleur du culot inchangée	Positive
	Production de H ₂ S	<u>Réaction positive</u> : Noircissement du culot et/ou de la pente <u>Réaction négative</u> : Aucun noircissement	Positive (certaines souches produisent peu de H ₂ S. Le noircissement peut être absent avec une souche qui utilise le lactose et/ou le sucrose)
	Formation de gaz	<u>Réaction positive</u> : Poches de gaz dans la gélose <u>Réaction négative</u> : Aucune poche de gaz	Positive
Gélose lysine et fer (LIA)	Production de H ₂ S	<u>Réaction positive</u> : Noircissement du culot et/ou de la pente <u>Réaction négative</u> : Aucun noircissement	Positive
	Lysine décarboxylase	<u>Réaction positive</u> : Le culot demeure pourpre <u>Réaction négative</u> : Le culot vire au jaune	Positive

Milieu	Réaction	Observation	Réaction typique de <i>Salmonella</i>
	Lysine désaminase	<u>Réaction positive</u> : La pente vire au rouge vin. <u>Réaction négative</u> : Couleur de la pente inchangée	Négative
Gélose à l'urée de Christensen	Production d'uréase	<u>Réaction positive</u> : La pente vire au rose/rouge <u>Réaction négative</u> : Couleur de la pente inchangée	Négative

TABLEAU V. Rapport recommandé entre les épices/assaisonnements et le bouillon de pré-enrichissement (p/v)

Aneth (graine)	1 :10
Anis (graine)	1 :10
Assaisonnement à l'italienne	1 :20
Basilic (feuilles)	1 :20
Cannelle (bâtonnets)	1 :10 et 1:100
Cardamome (graine)	1 :10
Cari (poudre)	1 :10
Carvi (graine)	1 :10
Casse (gousse)	1 :10
Casse (poudre)	1 :50
Céleri (flocons)	1 :20
Céleri (graine)	1 :10
Cerfeuil (feuilles)	1 :20
Champignons (tranches)	1 :20
Ciboulette (hachée)	1 :20
Citron (écorce)	1 :10
Clous de girofle	1 :50 et 1 :1000
Coriandre (graine)	1 :10
Crème de tartare	1 :10
Cumim (graine)	1 :10
Curcuma (poudre)	1 :10
Epices pour tarte à la citrouille	1 :50
Estragon	1 :20
Fenouil (graine)	1 :10
Fines herbes pour salade	1 :20
Gingembre (racine)	1 :10
Laurier (feuilles)	1 :20
Légumes (flocons)	1 :20
Macis (poudre)	1 :10
Marante (poudre)	1 :10
Marjolaine	1 :10
	1 :20
Menthe (moulu)	1 :10
Moutarde (grain)	1 :10
Noix de muscade	1 :10
Onion (poudre)	1 :10
Orange (morceaux)	1 :10
Origan (feuilles)	1 :50
Paprika	1 :10
Pavot (graine)	1 :10
Persil (flocons)	1 :20
Piment de la Jamaïque	1 :10 et 1:100
Piment de la Jamaïque (poudre)	1 :20 et 1:100
Piments entiers	1 :10
Poivre au citron	1 :50
Poivre (grain)	1 :10
Poivre noir	1 :10
Poivre blanc	1 :10
Poivre de cayenne	1 :10
Romarin (feuilles)	1 :10

Safran	1 :20
Salade supreme	1 :10
Sarriette (moulue)	1 :50
Sauge (feuilles)	1 :20
Sésame (graine)	1 :10
Thym (poudre)	1 :50