

DÉTECTION DES SALMONELLES DANS LES ALIMENTS ET L'EAU AU MOYEN DE L'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE (ACP)

1. AVERTISSEMENT ET PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

Les pratiques en matière de santé et sécurité rattachées à cette méthode sont conformes aux directives nationales sur la santé et aux mesures décrites au chapitre 3 du document 01-D-001 intitulé : « Manuel du programme d'assurance qualité du module de microbiologie ».

Une attention particulière doit être portée lors de la fabrication du bouillon Rappaport – Vassiliadis Soya (RVS) qui peut être irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires.

De plus, une attention spéciale doit être portée lors de la manipulation du bromure d'éthidium (EtBr), un mutagène puissant ; on doit utiliser des gants doubles ou de nitrile.

2. INTRODUCTION

Globalement, l'incidence des salmonelloses varie entre 25 et 45 cas par 100 000 habitants. Les salmonelles sont classifiées et identifiées par leur sérotype. Par exemple, il y a une dizaine d'années, le sérotype Typhimurium dominait dans tous les pays occidentaux. Maintenant, en Europe occidentale, le sérotype Enteritidis domine dans la majorité des pays. Au Québec, un phénomène similaire s'installe. La prévalence de ce sérotype a augmenté durant les dernières années et cause des éclosions dans toutes les régions.

Un facteur de risque important pour la *Salmonella* demeure l'alimentation et, plus précisément, la volaille, les œufs, les produits laitiers non pasteurisés, les germes de luzerne et autres germes et certains fruits frais (cantaloup, melon d'eau et autres). Les cas liés aux voyageurs, aux immigrants et aux animaux de compagnie se présentent généralement comme des éclosions limitées.

L'accroissement des infections humaines à salmonelles au cours des 25 dernières années est probablement lié à plusieurs causes telles que :

- Les changements dans l'alimentation et les techniques d'élevage, en particulier celle du poulet avec l'installation de poulailler de grande superficie;
- Les changements technologiques dans le processus de fabrication des aliments;
- Les modifications dans les méthodes de conservation et de distribution des aliments;
- Les changements démographiques comme l'augmentation du nombre de personnes âgées et des individus immunodéprimés.

3. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détection rapide des *Salmonella sp.* isolées dans les aliments, les ingrédients alimentaires et dans l'eau au moyen d'une technique classique d'enrichissement suivi d'une détection par amplification en chaîne par polymérase (ACP). Les échantillons environnementaux peuvent également être analysés avec cette méthode (éponges, écouvillons).

4. RÉFÉRENCES NORMATIVES

Cette méthode permet de déterminer s'il y a conformité à l'article 3 de la *Loi sur les produits alimentaires* (P-29). Il existe un critère d'absence pour ce micro-organisme dans les denrées alimentaires ciblées dans le document intitulé : « *Lignes directrices et normes pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire* » CQIASA/MAPAQ, 2006; <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/NR/rdonlyres/6B9A8992-396D-45CD-8841-1EFD19E3D7C8/0/recueil.pdf>

5. PRINCIPE

Cette méthode comporte trois étapes distinctes soit, une étape de pré-enrichissement en milieu non sélectif et une seconde d'enrichissement en milieu sélectif suivi d'une ACP.

5.1 Pré-enrichissement en milieu non sélectif

L'aliment estensemencé dans un milieu nutritif non inhibiteur. Cette étape permet la récupération des bactéries *Salmonella sp.* ayant subies des contraintes physiques ou chimiques (traitement de chaleur, congélation, déshydratation, agents de conservation).

5.2 Enrichissement en milieu sélectif

Les cultures de pré-enrichissement sontensemencées dans un milieu nutritif contenant des agents inhibiteurs actifs sur les germes qui font concurrence aux *Salmonella sp.*

5.3 Amplification en chaîne par polymérase (ACP)

Après un enrichissement sélectif, l'homogénat est soumis à une amplification génétique qui amplifie une séquence d'ADN spécifique des salmonelles. Les oligonucléotides servant d'amorces pour l'ACP sont hautement spécifiques aux *Salmonella sp.* et n'amplifient pas l'ADN présent chez les autres organismes. Le fragment amplifié d'un poids moléculaire défini par les amorces, est facilement identifié par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

Cette technique est rapide, hautement spécifique et sensible (serait de l'ordre de 1 ufc/25 g d'aliments selon les travaux de Trkov 1999) pour la détection de *Salmonella sp.* à partir d'un homogénat enrichi. Elle détecte la grande majorité des sérotypes qui circulent au Québec.

6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

6.1 Milieux de culture

- Eau peptonée tamponnée (EPT) (Annexe A-1)
- Bouillon Rappaport-Vassiliadis soya (RVS) (Annexe A-3)
- Bouillon au tétrathionate-vert brillant (TBG) (Annexe A-2)

6.2 Solutions et réactifs

- Mélange réactionnel pour l'ACP (Annexe A-4)
- Agarose LE
- Tampon TAE 50 X (Annexe A-5)
- Colorant de repérage (Annexe A-6)
- Bromure d'éthidium
- InstaGene Matrix (BioRad ou équivalent)
- Eau distillée stérile
- Eau de javel commerciale diluée 1:10
- Éliminase
- ADN de taille moléculaire déterminé (Annexe A-7)

Les tampons, l'eau distillée, les embouts de pipettes et autres matériaux qui viennent en contact avec les échantillons ou avec les réactifs de l'ACP doivent être stérilisés à l'autoclave avant usage afin d'éliminer toute DNase et autres contaminants. Les pipettes et les hottes sont désinfectées avec l'eau de javel commerciale diluée 1 :10 et/ou à l'Éliminase.

À titre de recommandation ; pour éviter les problèmes de contamination, tous les réactifs devraient être préparés dans une hotte à flux laminaire qui n'a jamais été exposée à *Salmonella* ou aux produits de l'ACP. Il est très important d'analyser les produits de l'ACP dans une autre pièce que celle servant à préparer l'amplification.

APPAREILLAGE

7.1 Appareils

- Appareil à dilution automatique – Dilumat 4 (AES Laboratoires) ou balance analytique de portée suffisante, avec précision de lecture de 0,1 g
- Homogénéisateur de type péristaltique (Stomacher)
- Étuves maintenues à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ et à $42,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$
- Microcentrifugeuse
- Agitateur Vortex
- Bain-marie ou bloc thermique à 56°C ¹
- Plaque chauffante
- Thermocycleur (PTC-200 de MJ Research ou autre)
- Four à micro-ondes
- Appareil d'alimentation pour l'électrophorèse
- Système de photodocumentation (facultatif, pour les archives photographiques), y compris un appareil photo Polaroid (portatif ou fixe), un dispositif paralumière et un film Polaroid 667 ou appareil photonumérique
- Stérilisateur à chaleur humide (autoclave)

7.2 Matériel et produits spéciaux

- Ustensiles de prélèvements stériles
- Sacs pour Stomacher
- Pipettes sérologiques stériles de 2,0 ml graduées en unités de 0,01 ml;
- Micropipettes de capacité réglable : 0,5-10 μl ; 10-100 μl ; 200-1 000 μl
- Embouts de micropipettes (avec filtre)
- Tubes à centrifuger de 1,5 ml ou l'équivalent
- Tubes à centrifuger de 500 μl ou l'équivalent (Thin Wall)
- Support de coulage de gel, peignes à 8 puits ou plus, et réservoir à tampon
- Table lumineuse à rayons UV à ondes courtes (transilluminateur) pour visualiser l'ADN coloré dans les gels d'agarose;
- Souche témoin de *Salmonella Matopeni* (isolée au laboratoire)
- Souche témoin de *Escherichia coli*

¹ Modification de la température (passe de 59°C à 56°C).

8. ÉCHANTILLONNAGE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les prélèvements d'échantillons pour l'analyse microbiologique des aliments doivent suivre les directives prescrites dans le document 01-D-540. Les échantillons sont analysés le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire. De façon générale se référer au document 01-D-550 pour la préparation des échantillons à analyser.

8.1 Préparation de l'échantillon

8.1.1 Prélever aseptiquement différentes parties du produit à analyser. Si l'échantillon est liquide, l'agiter vigoureusement (en inversant le contenant 25 fois) ou jusqu'à ce que le contenu soit homogène.

8.1.2 Peser 25 g d'aliments, à l'aide d'une balance ou de l'appareil à dilution automatique, et l'ajouter dans un sac de plastique (Stomacher) ou un contenant de verre préalablement taré.

Note 1 : Pour la recherche de *Salmonella* dans l'eau de consommation, un volume minimal de 4 litres doit être filtré sur membrane Millipore HA 0,45 µ. Par la suite, la membrane est déposée dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT). Incuber à (35 ± 1)°C pendant 18 à 24 heures.

Note 2: Pour les échantillons environnementaux, ajouter l'éponge ou l'écouvillon et son bouillon (après agitation) à 100 ml de EPT.

9. MODE OPÉRATOIRE

9.1 Pré-enrichissement en milieu non sélectif

9.1.1 Préparer une dilution 1:10 de l'aliment en ajoutant aseptiquement, manuellement ou à l'aide de l'appareil à dilution automatique, 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) à l'unité d'analyse préalablement pesée.

Note 1 : Dans le cas de produits laitiers en poudre, préparer une suspension en déposant 25 g de poudre dans 225 ml d'eau distillée. Ajouter 0,5 ml d'une solution de colorant vert brillant à 1 %. Agiter le tout pour obtenir une suspension uniforme.

Note 2 : Les épices et les assaisonnements sont généralement dissous avec du bouillon nutritif dans un rapport de 1:10. Cependant, certaines épices qui sont bactéricides ou qui absorbent une partie importante de bouillon doivent être dissoutes dans des rapports plus grands (voir annexe C).

9.1.2 Mélanger au Stomacher ou à l'homogénéisateur rotatif pendant environ 2 minutes ou jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Éviter tout chauffage excessif de l'homogénat.

9.1.3 En cas de doute, vérifier le pH du mélange en transférant, de façon aseptique, une goutte de suspension sur du papier indicateur de pH. Ajuster, si nécessaire, à un pH entre 6,0 et 7,0 avec du NaOH 1N ou HCl 1N.

9.1.4 Incuber à $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 heures.

9.1.5 Pour chaque série d'échantillons, un témoin positif et un blanc sont ajoutés. Le témoin positif est constitué d'une culture de *Salmonella matopeni* ensemencée dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée. Cette souche peu présente au Canada permet de détecter rapidement des problèmes de contamination, le cas échéant. Le blanc (contrôle négatif), est constitué de 225 ml d'eau peptonée stérile.

9.2 Enrichissement en milieu sélectif

9.2.1 À l'aide d'une pipette stérile, transférer 0,1 ml de bouillon de pré-enrichissement dans 10 ml de Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS), et 1,0 mL de la culture de pré-enrichissement dans 9 mL de tétrathionate additionné de vert brillant (TBG).

9.2.2 Incuber les bouillons RVS et TGB à $(42,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ pendant 24 ± 2 heures.

9.2.3 Conserver au réfrigérateur les bouillons RVS et TBG pour la recherche des salmonelles par isolement et culture bactérienne suite à des résultats positifs à l'ACP (voir méthode MFHPB-20).

9.3 Préparation des gabarits

9.3.1 Après incubation, 1 ml est prélevé à partir du bouillon RVS. Si l'extraction n'est pas effectuée dans les 72 heures, le prélèvement doit être congelé à -20°C . À cette étape, ajouter également un témoin d'extraction positif (1 ml de bouillon RVS ensemencé d'une souche de *Salmonella matopeni*), et un témoin négatif (1 ml de bouillon RVS ensemencé d'une souche de *E. coli*). Ces témoins peuvent être préparés à l'avance et conservés au congélateur.

9.3.2 Centrifuger l'homogénat 3 minutes à $9\ 000 \times g$ à $13\ 000 \times g$.

9.3.3 Jeter le surnageant et laver le culot avec 1 ml d'eau distillée stérile. Vortexer.

9.3.4 Répéter les étapes 9.3.2 et 9.3.3 deux fois en prenant soin de bien resuspendre le culot au Vortex à chaque fois.

9.3.5 Jeter le surnageant et ajouter 200 μl d'InstaGene Matrix.

9.3.6 Bien mélanger le culot et l'InstaGene Matrix au Vortex pendant 10 secondes ou jusqu'à homogénéité.

9.3.7 Incuber 20 à 30 minutes à 56°C^2 dans un bain-marie ou dans un bloc thermique.

9.3.8 Bien mélanger au Vortex pendant 10 secondes.

² Modification de la température (de 59 à 56°C).

- 9.3.9 Placer 8 minutes dans un bain d'eau bouillante.
- 9.3.10 Refroidir les échantillons en les incubant dans un bain d'eau et de glace pendant au moins 5 minutes.
- 9.3.11 Bien mélanger au Vortex pendant 10 secondes.
- 9.3.12 Centrifuger 3 minutes à 9 000 x g à 13 000 x g.
- 9.3.13 Utiliser le surnageant contenant l'ADN pour l'amplification.
- 9.3.14 Les extraits d'ADN peuvent être conservés à -20 °C, si non utilisés dans un délai de 2 jours à 4 °C.

9.4 Amplification en chaîne par polymérase (ACP)

- 9.4.1 Ajouter 10 µl de la suspension d'ADN à 40 µl de mélange réactionnel pour l'ACP dans un tube à paroi mince de 500 µl et bien agiter. Ajouter à chaque série d'échantillons un blanc où l'ADN est remplacé par de l'eau ainsi qu'un témoin positif d'ADN extrait. Placer dans le thermocycleur, démarrer le programme de cycle de température tel que décrit à la section 9.6.
- 9.4.2 Lorsque l'amplification est terminée, retirer chaque tube et les conserver à 4°C jusqu'à l'analyse par électrophorèse. Si l'analyse des résultats de l'amplification (amplicons) ne peut être effectuée dans les 2 jours suivants, il est préférable de placer les tubes à -20°C.

9.5 Amorces d'ACP

Le choix des oligonucléotides servant d'amorces pour l'ACP repose sur les séquences de nucléotides publiées par Trkov et al. (1999) et Aabo et al. (1993). Pour l'amplification d'un fragment d'ADN de 429 pb spécifique aux Salmonelles compris dans le fragment JEO 402-1 du chromosome, les séquences des amorces requises sont les suivantes;

Amorce ST11 = 5' AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA 3'

Amorce ST15 = 5' GGTAGAAATTCAGCGGGTACTG 3'

Note : La synthèse des oligonucléotides peut être confiée en sous-traitance à une université locale. De nombreuses entreprises de biotechnologies offrent des services de synthèse sur commande.

9.6 Programme des cycles de température

La Hot Star Taq DNA Polymerase est fournie sous forme inactive n'ayant aucune activité de polymérisation à température ambiante. Ceci prévient le mauvais appariement des amorces et la formation de « primer dimer » à basse température. La Hot Star Taq DNA Polymérase est activée dans le mélange réactionnel par une étape d'incubation à 95°C pendant 15 minutes. Par conséquent, le programme des cycles de température doit reposer sur la séquence suivante (appareil PTC-200 de MJ Research) :

Étape 1	Activation	15 minutes à 95°C
Étape 2	30 cycles de :	Dénaturation 30 secondes à 95°C Attachement 30 secondes à 57°C Extension 45 secondes à 72°C
Étape 3	Élongation finale	10 minutes à 72°C

Note : L'usage de thermocycleurs autres que le modèle précédemment mentionné peut altérer la performance de l'ACP; il peut être nécessaire d'optimiser les paramètres des cycles pour des modèles différents. Le programme peut contenir une plage de 72 h à 4°C à la fin de l'amplification. Ainsi, les amplifications peuvent débuter le vendredi et elles se maintiendront à 4°C pour la fin de semaine. Idéalement, minimiser le temps où le thermocycleur devra fonctionner à 4°C puisque la réfrigération diminue la durée de vie de l'appareil.

9.7 Électrophorèse sur gel d'agarose

- 9.7.1 Préparer un gel d'agarose à 2,0 % (p/v) dans du tampon TAE 1X (annexe B-1). Dissoudre l'agarose en mélangeant la solution sur une plaque chauffante ou en la plaçant au four à micro-ondes pendant 1 à 2 minutes à puissance élevée. S'assurer que l'agarose est entièrement dissoute (c.-à-d., liquide limpide, exempt de particules en suspension). En cas d'évaporation, ajouter du tampon pour ramener le volume au niveau voulu.
- 9.7.2 Laisser l'agarose refroidir à 50°C (environ 5 minutes), ajouter la solution de bromure d'éthidium afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 µg/ml (50 µl d'une solution 1 mg/ml par 100 ml de gel) (annexe B-1) puis verser dans un support à gel dont les deux extrémités ont été scellées avec du ruban gommé ou des supports en caoutchouc. Ajouter des peignes pour la formation des puits et laisser le gel solidifier jusqu'à opacification homogène (environ 15 minutes).
- 9.7.3 Préparer les échantillons pour l'électrophorèse en ajoutant 10 µl de colorant marqueur 5X aux 50 µl d'amplicons.
- 9.7.4 Une fois le gel d'agarose solidifié, enlever les peignes et le scellant aux extrémités, puis placer le support à gel dans l'appareil d'électrophorèse. Remplir le réservoir avec du tampon TAE 1X en quantité suffisante pour immerger le gel. Pipeter doucement le mélange colorant-amplicon (annexe B-2) dans les puits du gel submergé. Pour chaque rangée de puits, pipeter un ou deux échantillons d'ADN de taille moléculaire déterminée (1 kb plus DNA Ladder ou équivalent), ce qui constitue le standard de référence (annexe B-3).

9.7.5 Brancher l'appareil à la source d'alimentation. Appliquer de 100 à 150 volts au gel et laisser fonctionner l'appareil jusqu'à ce que le colorant de repérage arrive à environ 2 cm du bas du gel, ou de la rangée de puits suivante. Le voltage et le temps sont à ajuster selon le type d'appareil. Retirer le gel du support avec précaution.

Note : L'EtBr est un mutagène puissant, utiliser des gants doubles pour le manipuler.

9.7.6 Examiner les bandes d'ADN en exposant le gel à une source de lumière ultraviolette (de courte longueur d'onde) au moyen d'un transilluminateur. Photographier les gels pour faciliter l'analyse et aux fins d'archivage.

10. EXPRESSION DES RÉSULTATS

10.1 Interprétation des résultats

L'amplicon (produit d'ACP) est un fragment d'ADN spécifique de 429 pb de longueur. Par conséquent, une épreuve ACP positive donnera un fragment d'ADN de 429 pb qui apparaîtra sous forme d'une bande nette sur le gel d'agarose coloré à l'EtBr. La taille moléculaire de la bande peut être vérifiée en comparant sa migration à celle de l'ADN de taille moléculaire prédéterminée ayant parcouru la même distance. Normalement, une épreuve ACP négative ne donnera pas de bande visible sur le gel d'agarose coloré à l'EtBr. Dans les cas extrêmement rares où un échantillon a donné des bandes qui ne correspondent pas à un amplicon de 429 pb, (produits d'amplification non spécifiques), l'échantillon est considéré comme étant négatif. Toute bande correspondant à l'amplicon 429 pb produit par le témoin négatif indique une contamination provenant de l'eau distillée stérile, ou du mélange à réaction ACP ou de l'environnement. Toutes les analyses sont alors considérées suspectes et doivent être rejetées; les échantillons doivent être réanalysés avec du nouveau matériel.

10.2 Confirmation des résultats

Tout échantillon montrant une bande distincte d'une longueur de 429 pb est positif. Une confirmation doit alors être réalisée par la recherche de la bactérie présente dans le bouillon d'enrichissement à l'aide d'une méthode d'isolement et de culture bactérienne (voir méthode MFHPB-20).

11. ANNEXES

ANNEXE A

MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Note : Sauf avis contraire, le pH final des milieux peut varier de $\pm 0,2$.

A-1 Eau peptonée tamponnée (EPT)

Peptone	10,0	g
Chlorure de sodium	5,0	g
Phosphate disodique (Na_2HPO_4)	3,5	g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)	1,5	g
Eau distillée	1000,0	ml

Suivre les instructions du fabricant pour la préparation du milieu lorsque l'on emploie une poudre commerciale.

Ajouter les ingrédients à l'eau distillée ou déminéralisée. Mélanger bien pour dissoudre. Distribuer, de façon stérile, en quantités de 225 ml dans des contenants appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

pH = $7,2 \pm 0,2$ après la stérilisation.

A-2 Bouillon de tétrathionate au vert brillant (TBG)

Bouillon au tétrathionate

Proteose peptone	2,5	g
Pancreatic Digest of casein	2,5	g
Oxgall	1,0	g
Sodium Thiosulfate	30,0	g
Calcium Carbonate	10,0	g

Solution au vert brillant

Vert brillant	1,0	g
Eau distillée ou déionisée	100,0	ml

Dissoudre le vert brillant dans l'eau distillée ou déionisée. Bien mélanger. Chauffer en agitant et faire bouillir tranquillement de 10 à 30 minutes. Conserver cette solution à l'obscurité.

Mélanger 46,0 g de poudre pour bouillon au tétrathionate dans un litre d'eau distillée ou déionisée, et ajouter de façon stérile 1 ml de solution au vert brillant 1%.

Ajuster le pH en ajoutant quelques gouttes de NaOH 5N si nécessaire.

Chauffer jusqu'à ébullition. Refroidir à 60°C ou moins et distribuer dans les tubes de façon stérile en s'assurant que le précipité est réparti également.
Au moment de l'utilisation, 0,2 ml de solution iodo-iodurée doit être ajouté à chaque tube.

pH final: $8,4 \pm 0,2$ avant l'ajout de l'iode.

Solution iodo-iodurée

Iodure de potassium	25,0	g
Iode ressublimé	30,0	g
Eau distillée ou déionisée	100,0	ml

Dissoudre d'abord l'iode de potassium dans 50 ml d'eau et ajouter ensuite l'iode ressublimé. Agiter jusqu'à dissolution complète. Ajouter le volume restant de l'eau. Ne pas chauffer. Il peut être nécessaire de laisser brasser toute la nuit. **Prendre garde de ne pas respirer les vapeurs d'iode ressublimé.** Il est préférable de préparer la solution un mois à l'avance afin de permettre la dissolution complète des composantes.

A-3 Bouillon Rappaport – Vassiliadis Soya (RVS)

Peptone de soya	4,5	g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,26	g
Di-potassium hydrogen phosphate	0,18	g
Chlorure de magnésium, 6H ₂ O	13,58	g
Chlorure de sodium	7,2	g
Vert de malachite	0,036	g

Mélanger 26,75 g de Rappaport-Vassiliadis (bouillon) dans un litre d'eau distillée ou déionisée. Chauffer légèrement jusqu'à dissolution complète. Distribuer et stériliser à l'autoclave 15 minutes à 115 °C.

ATTENTION ! Irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires.

pH final : $5,2 \pm 0,2$

A-4 Mélange réactionnel pour l'ACP

Les mélanges à réaction de l'ACP peuvent être préparés en grande quantité et des aliquots de 40 µl sont alors distribués dans des tubes à centrifuger de 500 µl bien à l'avance et stockés à -20 °C jusqu'au moment de leur utilisation (peuvent se conserver jusqu'à un an). Les solutions mères peuvent également être stockées à -20 °C jusqu'au moment de l'emploi. La recette suivante sert à préparer des tubes simples de réactifs, bien que pratique, il soit plus utile de préparer une grande quantité équivalant à 100 amplifications bien à l'avance, puis de préparer des aliquots de 40 µl dans des tubes individuels.

Solutions mères par tube d'amplification

H ₂ O déminéralisée (stérile)	29,5 µl
Tampon d'ACP 10 X (contient 15 mM MgCl ₂)	5,0 µl
MgCl ₂ , 25 mM	3,0 µl
Amorce ST 11, 50 µM	0,5 µl
Amorce ST 15, 50 µM	0,5 µl
dNTPs, (dCTP, dATP, dTTP, dGTP) 2,5 mM	1,0 µl
Hot Star Taq polymérase 5U/µl	0,5 µl
Volume final	40,0 µl

Le tampon d'ACP 10 X et la solution de MgCl₂ 25 mM sont habituellement fournis à l'achat de Hot Star Taq DNA polymérase 5 U/µl de QIAGEN.

A-5 Tampon TAE 50 X

TRIS base	242	g/l
Acide acétique glaciale	57,1	ml/l
EDTA 0,5 M	100	ml/l

Utiliser une concentration 1 X dans les gels et comme tampon d'électrophorèse ou acheter le tampon TAE 10 X et le diluer à 1X.

A-6 Colorant de repérage (pour l'électrophorèse) 5X

Glycérol	2,5 ml
SDS 10 %	0,5 ml
EDTA 0,5 M	1,0 ml
Bleu de bromophénol 1%	0,5 ml
Eau distillée stérile	5,5 ml

Bien mélanger tous les ingrédients.

A-7 ADN de taille moléculaire déterminée

Standard de poids moléculaire 1Kb Plus	100 µl
Eau distillée stérile	900 µl
Colorant de repérage 5X	200 µl

ANNEXE B

B-1 Tableau de préparation des gels pour l'électrophorèse

Gel	Agarose	Tampon TAE 1X	Bromure d'éthidium
Petit	0,8 g	40 ml	20 µl
Grand	4,0 g	200 ml	100 µl

B-2 Tableau de préparation et d'injection des échantillons pour l'électrophorèse

Préparation du mélange	Mélange à injecter
Colorant marqueur 5 X : 10 µl Amplicons : 50 µl	Petit puits : 8 µl Grand puits : 12 µl

B-3 Tableau des répartitions dans les gels d'électrophorèse

Répartition par rangée		
Gel	Standard	Témoin +
Petit	1	1 ou +
Grand	2	1 ou +

ANNEXE C

Rapport recommandé (autre que 1 : 10) entre les épices et les assaisonnements et le bouillon d'enrichissement (pds/vol)

(tiré de la méthode MFHPB-20)

Aneth, graines	1:10	Macis, poudre	1:10
Anis vert	1:10	Marjolaine	1:10
Arrow-root, poudre	1:10	Menthe, flocons	1:20
Assaisonnement à l'italienne	1:20	Menthe, poudre	1:10
Assaisonnement (suprême) pour salade	1:10	Moutarde, graines	1:10
		Muscade (noix entières)	1:10
Basilic, feuilles	1:20	Oignon, poudre	1:10
		Orange, morceaux	1:10
Cannelier, fleurs	1:20	Origan, feuilles	1:50
Cannelle, bâtons	1:10 et 1:100		
Cardamome, graines	1:10	Paprika	1:10
Cari, poudre	1:10	Pavot, graines	1:10
Carvi, graines	1:10	Persil, flocons	1:20
Casse, bourgeons		Piment de la Jamaïque	1:10 et 1:100
Casse, poudre	1:50	Piment de la Jamaïque, poudre	1:20 et 1:100
Céleri, flocons	1:20	Piment du Chili, entier	1:10
Céleri, graines	1:10	Poivre au citron	1:50
Cerfeuil, feuilles	1:20	Poivre blanc	1:10
Champignons, tranches	1:20	Poivre de Cayenne	1:10
Ciboulette hachée	1:20	Poivre, grains	1:10
Clou de girofle	1:50 et 1:1000	Poivre noir	1:10
Coriandre, graines	1:10		
Crème de tartre	1:10	Romarin, feuilles	1:10
Cumin, graines	1:10		
Curcuma, poudre	1:10	Safran	1:20
		Sarriette moulue	1:50
Estragon	1:20	Sauge, feuilles	1:20
Épices pour tarte à la citrouille	1:50	Sésame, graines	1:10
Fenouil, graines	1;10	Thym, poudre	1:50
Fines herbes pour salade	1:10		
		Zeste de citron	1:10
Gingembre, racine	1:10		
Laurier, feuilles	1:20		
Légumes, flocons	1:20		

Pour les poudres ou les flocons d'ail ou d'oignons, utiliser du bouillon trypticase renfermant 0,5 % de K₂SO₃ (rapport 1 : 10).

12. BIBLIOGRAPHIE

1. Trkov, M. et al., 1999, Detection of *Salmonella* in food over 30h using enrichment and polymerase chain reaction, *Food microbiology*, 16 :393-99.
2. Aabo, S. et al., 1993, Salmonella identification by the polymerase chain reaction, *Molecular and Cellular Probes*, 7 : 171-178.
3. DGPS, méthode MFHPB-20 : Isolement et identification des *Salmonella* dans les aliments.
4. DLEAA/MAPAQ. Manuel du programme d'assurance qualité. Module de microbiologie. Document 01-D-001.
5. DLEAA/MAPAQ. Techniques de prélèvements des échantillons pour l'analyse microbiologique des aliments et de l'eau. Document 01-D-540.
6. DLEAA/MAPAQ. Préparation des échantillons pour l'analyse microbiologique. Document 01-D-550.

13. APPROBATION

Ginette Laperrière, microbiologiste au service de microbiologie

Kim Weaver, technicienne qualité technique au service de microbiologie

Daniel Tremblay, chef du service de microbiologie