

Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq

Deux méthodes ISO validées peuvent être utilisées :

Certification NF VALIDATION TRA 02/12-01/09

Certification MicroVal 2015LR50

Réf. : 71008-100 (100 tests)
71008-576 (576 tests)
71008-576ATM (576 tests)

Description générale

Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq est un système automatisé d'amplification des acides nucléiques permettant de détecter *Salmonella* dans tous les produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et dans les échantillons environnementaux. Les tests Assurance® GDS sont conçus pour être utilisés par du personnel de laboratoire qualifié conformément aux pratiques de laboratoire de microbiologie en vigueur.

Composants du kit

Chaque kit Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq (**100 tests** et **576 tests**) contient les éléments suivants :

- Tubes d'amplification Tq
- Réactif de concentration
- Tampon de remise en suspension Tq
- Solution de lavage

Chaque kit Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq **576ATM** contient les éléments suivants :

- Tubes d'amplification Tq
- Réactif de concentration

Les éléments suivants sont également nécessaires pour le kit **576ATM**, mais sont vendus séparément :

- 61031-100 Kit de solution de lavage
- 34724-100C Tampon de remise en suspension Tq

Équipement/matériel requis

Le matériel suivant est également nécessaire, mais non inclus :

- Milieux figurant dans l'Annexe A
- Thermocycleur Rotor-Gene® Assurance® GDS
- Rotor et anneau de verrouillage
- Ordinateur portable et logiciel v2.3.103
- Dispositif PickPen® et pointes PickPen®
- Agitateur vortex (IKA® MS3 ou équivalent)
- Bandelettes de film adhésif
- Puits d'échantillon et base pour puits d'échantillon
- Plaque de remise en suspension
- Bloc de refroidissement avec gel
- Homogénéiseur à palettes Stomacher® ou équivalent
- Sachets du type Stomacher® avec filtre ou équivalent
- Micropipette à 8 canaux capable de distribuer 30 µl
- Micropipette réglable capable de distribuer précisément 1 000 µl
- Pipette à répétition
- Pointes pour pipette à répétition (0,5 ml et 10 ml)

Pointes de micropipette à filtre barrière (50 µl et 1,0 ml)
Incubateur capable de maintenir une température de 37 ± 1 °C ou $41,5 \pm 1$ °C, suivant la méthode
Congélateur capable de maintenir une température de -20 ± 5 °C
Réfrigérateur capable de maintenir une température de 5 ± 3 °C

Le matériel supplémentaire pour le kit **576** inclut :

Support pour tubes d'amplification à espacement variable, 72 puits
Couvercle de support pour tubes d'amplification à espacement variable, 72 puits
Outil de fermeture de tube d'amplification
Portoir à bouchons pour tube d'amplification, 72 puits
Bloc de refroidissement en aluminium, 72 puits
Rotor à 72 puits et anneau de verrouillage

Préparation des échantillons

Certificat NF Validation N° TRA 02/12-01/09

Catégories approuvées : produits alimentaires (hormis les graines germées), préparations et céréales pour nourrissons, aliments pour animaux, échantillons environnementaux (hormis les échantillons de production primaire), cacao et chocolat (produits bruts et finis). Le cacao et le chocolat sont validés pour la procédure manuelle uniquement.

Voir les tableaux des méthodes d'enrichissement à l'Annexe B.

A. Préparation et enrichissement des prises d'essai

1. **Toutes les denrées alimentaires à l'exception des préparations pour nourrissons, des céréales pour nourrissons, du lait écrémé en poudre (NFDM)** - Pour la préparation des suspensions initiales, suivre les instructions des normes EN ISO 6579 et EN ISO 6887.

a) Échantillons sans repiquage dans du BHI

Pour les échantillons d'**aliment transformé**, ajouter 25 g d'échantillon à 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT, Annexe A). Homogénéiser ou mélanger les échantillons, puis les incuber pendant 18 à 24 h à $37^\circ\text{C} \pm 1$ °C.

b) Échantillons avec repiquage dans du BHI

Pour les échantillons **bruts** et **non transformés**, ajouter 25 g d'échantillon à 225 ml d'EPT (Annexe A). Homogénéiser ou mélanger les échantillons, puis les incuber pendant 18 à 24 h à 37 ± 1 °C. Transférer les échantillons enrichis dans du bouillon BHI et les placer pendant 2 à 4 h à 37 ± 1 °C, comme indiqué à l'étape **(B10)** de la section PROTOCOLE DE TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS.

2. **Échantillons environnementaux (hormis les échantillons de production primaire)**

a) Échantillons sans repiquage dans du BHI

Pour les **échantillons environnementaux : surfaces en contact avec des produits alimentaires (et non alimentaires), surfaces de travail et zones adjacentes (p. ex. mélangeurs, plans de travail, zones d'égouttage, locaux)** et **eau de procédé** : Pré-humidifier des éponges déshydratées stériles avec 10 ml d'EPT. Humidifier un écouvillon stérile en le trempant dans de l'EPT. Si une neutralisation est nécessaire, remplacer l'EPT par du bouillon D/E (Dey/Engley) ou du bouillon Letheen. Après avoir recueilli l'échantillon sur la **surface**, ajouter l'éponge ou l'écouvillon à respectivement 100 ml ou 10 ml d'EPT. Pour l'**eau de procédé**, prélever en conditions aseptiques une aliquote de 25 ml et la verser dans 225 ml d'EPT. Homogénéiser ou mélanger les échantillons, puis les incuber pendant 18 à 24 h à $37^\circ\text{C} \pm 1$ °C.

b) **Échantillons avec repiquage dans du BHI**

Pour les **échantillons environnementaux : surfaces n'entrant pas en contact avec les aliments et éloignées des surfaces de travail dédiées aux produits alimentaires (p. ex. systèmes d'évacuation des liquides, sols, murs, roulettes des chariots) et balayures** : Pré-humidifier des éponges déshydratées stériles avec 10 ml d'EPT. Humidifier un écouvillon stérile en le trempant dans de l'EPT. Si une neutralisation est nécessaire, remplacer l'EPT par du bouillon D/E (Dey/Engley) ou du bouillon Letheen. Après avoir recueilli l'échantillon sur la **surface**, ajouter l'éponge ou l'écouvillon à respectivement 100 ml ou 10 ml d'EPT. Pour les **balayures**, transférer en conditions aseptiques 25 g de balayures dans 225 ml d'EPT. Homogénéiser ou mélanger les échantillons, puis les incuber pendant 18 à 24 h à 37 ± 1 °C. Transférer les échantillons enrichis dans du bouillon BHI et les placer pendant 2 à 4 h à 37 ± 1 °C, comme indiqué à l'étape **(B10)** de la section PROTOCOLE DE TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS.

3. **Préparations pour nourrissons, céréales pour nourrissons et lait écrémé en poudre** - Ne pas secouer les produits secs ou en poudre : procéder plutôt par humidification avec du milieu. Laisser reposer entre 18 °C et 27 °C (température du laboratoire) pendant 30 à 60 min. Si, après cela, la poudre n'est pas homogénéisée, mélanger le contenu jusqu'à dissolution complète.

Remarque : pré-chauffer le milieu à 37 ± 1 °C avant ajout à l'échantillon.

a) **Échantillons sans repiquage dans du BHI**

Pour les **préparations pour nourrissons sans probiotiques** : pour une taille d'échantillon de 10 à 375 g, verser l'échantillon dans de l'EPT selon un rapport échantillon/milieu de 1:10

Pour les **céréales pour nourrissons (sans probiotiques)** : pour une taille d'échantillon de 10 à 375 g, verser l'échantillon dans de l'EPT additionnée d'amylase (EPT+a, Annexe A) selon un rapport échantillon/milieu de 1:10. Homogénéiser ou mélanger l'échantillon. Incuber les échantillons de 10 à 25 g pendant 18 à 26 h à 37 ± 1 °C. Incuber les échantillons de 50 à 375 g avec du milieu pré-chauffé (37 ± 1 °C) pendant 18 à 29 h à 37 ± 1 °C.

b) **Échantillons avec repiquage dans du BHI**

Pour les échantillons de **lait écrémé en poudre (NFDM)** : pour une taille d'échantillon de 10 à 375 g, verser l'échantillon dans de la solution diluée de vert brillant (BGW, Annexe A) selon un rapport échantillon/milieu de 1:10. Pour les **préparations pour nourrissons avec probiotiques** : pour une taille d'échantillon de 10 à 375 g, verser l'échantillon dans de l'EPT additionnée de vancomycine (EPT+v, Annexe A) selon un rapport échantillon/milieu de 1:10. Pour les **céréales pour nourrissons (avec probiotiques)** : pour une taille d'échantillon de 10 à 375 g, verser l'échantillon dans de l'EPT additionnée de vancomycine et d'amylase (EPT+v+a, Annexe A) selon un rapport échantillon/milieu de 1:10. Pour **tous les aliments pour nourrissons, sauf le NFDM** : Homogénéiser ou mélanger l'échantillon. Incuber les échantillons de 10 à 25 g pendant 18 à 26 h à 37 ± 1 °C. Incuber les échantillons de 50 à 375 g avec du milieu pré-chauffé (37 ± 1 °C) pendant 18 à 29 h à 37 ± 1 °C. Pour les échantillons de **lait écrémé en poudre** : Incuber les échantillons de lait écrémé en poudre de 10 à 25 g pendant 20 à 28 h à 37 ± 1 °C. Incuber les échantillons de lait écrémé en poudre de 50 à 375 g avec du milieu pré-chauffé (37 ± 1 °C) pendant 20 à 29 h à 37 ± 1 °C. Transférer les échantillons enrichis dans du bouillon BHI pendant 2 à 4 h à 37 ± 1 °C, comme indiqué à l'étape **(B10)** de la section PROTOCOLE DE TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS.

4. **Cacao et chocolat (produits bruts et finis)**

Remarque : pré-chauffer le milieu à 37 ± 1 °C avant ajout à l'échantillon.

a) **Lait UHT + enrichissement avec du colorant vert brillant**

Ajouter 375 g d'échantillon à 3 375 ml de lait écrémé en poudre UHT ou reconstitué, puis ajouter 0,018 g/l de colorant vert brillant (Annexe A). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon, puis l'incuber pendant 24 à 32 h entre 34 et 38 °C. En cas d'analyse d'autres tailles de prise d'essai, ajuster en proportion le volume des milieux de façon à maintenir un rapport de 1:10.

b) **Enrichissement avec de l'EPT**

Ajouter 375 g d'échantillon à 3 375 ml d'eau peptonée tamponnée (Annexe A). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon, puis l'incuber pendant 24 à 32 h entre 34 et 38 °C. En cas d'analyse d'autres tailles de prise d'essai, ajuster en proportion le volume des milieux de façon à maintenir un rapport de 1:10.

B. Protocole de traitement des échantillons

Changer de gants avant de manipuler les réactifs

1. Vortexer le **réactif de concentration**. Transférer immédiatement 20 µl dans chacun des puits d'échantillon Assurance® GDS requis (1 puits/échantillon) à l'aide d'une pipette à répétition et de pointes de pipette de 0,5 ml. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
2. Pour les échantillons d'**aliments transformés, les échantillons environnementaux de surfaces proches en contact avec les aliments, l'eau de procédé** et les **préparations et céréales pour nourrissons (sans probiotiques)**, transférer 1,0 ml de **solution de lavage** dans des puits d'échantillon supplémentaires (1 puits/échantillon) sur une base pour puits d'échantillon à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 10 ml. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
3. Pour les échantillons d'**aliments crus et non transformés**, les échantillons **environnementaux de surfaces éloignées n'entrant pas en contact avec les aliments**, les **balayures**, le **lait écrémé en poudre** et les échantillons de **préparations et céréales pour nourrissons (avec probiotiques)**, distribuer 0,5 ml de bouillon cœur-cerveau (BHI) stérile (et non de solution de lavage) dans des puits d'échantillon (1 puits/échantillon) à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 10 ml. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
4. Pour les **produits à base de cacao et de chocolat bruts et finis (prise d'essai de grand volume)**, transférer 700 µl (dans le cas du protocole UHT+BG) ou 900 µl (pour le protocole d'enrichissement à l'EPT) de solution de lavage dans les mêmes puits d'échantillon contenant le réactif de concentration à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 10 ml. Transférer 1,0 ml de **solution de lavage** dans des puits d'échantillon supplémentaires (1 puits/échantillon) sur une base pour puits d'échantillon à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 10 ml. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
5. Transférer 45 µl de **tampon de remise en suspension Tq** dans les puits de la plaque de remise en suspension à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 0,5 ml. Couvrir la plaque de remise en suspension avec des bandelettes de film adhésif.
6. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette de puits d'échantillon. Ajouter 1,0 ml d'échantillon incubé dans chaque puits contenant du réactif de concentration. Pour les produits à base de cacao et de chocolat bruts et finis (prise d'essai de grand volume), ajouter 300 µl (dans le cas du protocole UHT+BG) ou 100 µl (pour le protocole d'enrichissement à l'EPT) d'échantillon incubé à chaque puits d'échantillon contenant le réactif de concentration. Éviter de transférer des particules alimentaires. Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque échantillon. Couvrir chaque barrette de puits d'échantillon avec un nouveau film adhésif avant d'ajouter des échantillons à une nouvelle barrette. **Replacer immédiatement les échantillons dans l'incubateur jusqu'à l'obtention des résultats GDS (maximum 24 h d'incubation) en vue d'une confirmation, si nécessaire.**
7. Placer les puits d'échantillons scellés contenant le Réactif de concentration pour *Salmonella* et l'échantillon sur l'agitateur vortex et le vortexer à environ 900 tours/minute pendant 10 à 20 minutes. Si nécessaire, ajuster le régime pour veiller à ce que le liquide n'entre pas en contact avec le film adhésif.
8. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette d'échantillons et le jeter. Retirer le film adhésif correspondant d'une barrette de puits d'échantillon contenant de la solution de lavage ou du BHI.
9. Charger des pointes sur le PickPen® en veillant à ce qu'elles soient bien fixées sur l'outil PickPen®. Déployer les aimants PickPen® et insérer les pointes dans la première barrette de puits d'échantillon. Agiter doucement pendant 30 s en effectuant un mouvement continu de haut en bas (de la surface vers le fond

du puits). Tapoter doucement les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de milieu.

10. Pour les échantillons d'**aliments transformés, les échantillons environnementaux de surfaces proches en contact avec les aliments, l'eau de procédé, les préparations et céréales pour nourrissons (sans probiotiques)** et les **produits bruts et finis à base de cacao et de chocolat**, transférer les pointes PickPen® dans les puits d'échantillon correspondants contenant la solution de lavage et agiter doucement pendant 10 s (ne pas libérer les particules dans la solution). Transférer les pointes PickPen® sur la rangée correspondante de la plaque de remise en suspension préparée. Avec les pointes immergées, rétracter les aimants PickPen® et tapoter doucement les pointes pour libérer les particules dans le tampon de remise en suspension. Couvrir la plaque de remise en suspension avec des bandelettes de film adhésif et passer à l'étape 13.
11. Pour les **échantillons bruts, les échantillons d'aliments non transformés, les échantillons environnementaux de surfaces éloignées n'entrant pas en contact avec les aliments, les balayures, le NFDM et les échantillons de préparation et de céréales pour nourrissons (avec probiotiques)**, transférer les pointes PickPen® dans les puits d'échantillon correspondants contenant du BHI. Avec les pointes immergées, rétracter les aimants PickPen® et tapoter doucement pour libérer les particules dans le BHI. Couvrir chaque barrette de puits d'échantillon contenant du BHI avec un nouveau film adhésif avant d'ajouter la prochaine série de particules aux puits d'échantillon contenant du BHI. Incuber les puits d'échantillon contenant du BHI et des particules pendant 2 à 4 h à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
12. Après incubation, transférer les particules des puits d'échantillon avec BHI (voir étape 8) jusqu'à la colonne correspondante de la plaque de remise en suspension préparée à l'aide des pointes PickPen®. Avec les pointes immergées, rétracter les aimants PickPen® et tapoter doucement les pointes pour libérer les particules dans le tampon de remise en suspension. Couvrir la plaque de remise en suspension avec du film adhésif et passer à l'étape 13.
13. Répéter les étapes (8) à (12) pour tous les échantillons en utilisant de nouvelles pointes pour chaque barrette d'échantillons.

PASSER A LA SECTION PROCEDURE DE TEST

Certificat MicroVal N° 2015LR50

Catégories approuvées : Viande de bœuf crue, produits de charcuterie et de viande traités thermiquement, viande de volaille crue, produits de charcuterie et de volaille traités thermiquement, aliments multi-composants et aliments composant un repas, produits laitiers, fruits et légumes et échantillons environnementaux.

Préparation et enrichissement des prises d'essai

A. Préparation du milieu d'enrichissement

1. Pour un échantillon de 25 g (ml), pré-chauffer 225 ml d'eau désionisée stérile toute une nuit à $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Le jour de l'utilisation, transférer en conditions aseptiques 7,1 g de milieu mEHEC® dans l'eau stérile pré-chauffée. Mélanger doucement pour dissoudre la poudre. Utiliser le milieu ainsi préparé dans les 6 h qui suivent.
2. Pour un échantillon de 375 g, pré-chauffer 1 500 ml d'eau désionisée stérile toute une nuit à $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Le jour de l'utilisation, transférer en conditions aseptiques 47,3 g de milieu mEHEC® dans l'eau stérile pré-chauffée. Mélanger doucement pour dissoudre la poudre. Utiliser le milieu ainsi préparé dans les 6 h qui suivent.
3. Il est également possible de préparer à l'avance le milieu mEHEC® et de l'autoclaver. Ajouter 31,6 g de milieu par litre d'eau désionisée. Agiter pour dissoudre la poudre, prélever le volume souhaité et autoclaver à 121°C pendant 15 min. Le milieu doit être pré-chauffé toute une nuit à $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ avant ajout à l'échantillon.

B. Préparation et enrichissement des prises d'essai

1. **Produits carnés, charcuterie et produits carnés traités thermiquement** – Peser en conditions aseptiques 375 g de prise d'essai et les introduire dans 1 500 ml de milieu mEHEC® pré-chauffé (à $41,5 \pm 1$ °C). Pour 25 g d'échantillon, utiliser 225 ml de milieu mEHEC® pré-chauffé (à $41,5 \pm 1$ °C). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon. Incuber pendant 10 à 18 h à $41,5 \pm 1$ °C.
2. **Volaille crue, charcuterie et produits à base de volaille traités thermiquement** – Peser en conditions aseptiques 25 g de prise d'essai et les introduire dans 225 ml de milieu mEHEC® pré-chauffé (à $41,5 \pm 1$ °C). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon. Incuber pendant 10 à 18 h à $41,5 \pm 1$ °C.
3. **Fruits et légumes** – Peser en conditions aseptiques 25 g (ml) de prise d'essai et les introduire dans 225 ml de milieu mEHEC® pré-chauffé (à $41,5 \pm 1$ °C). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon. Incuber pendant 10 à 14 h à $41,5 \pm 1$ °C.
4. **Aliments multi-composants et aliments composant un repas** – Peser en conditions aseptiques 25 g (ml) de prise d'essai et les introduire dans 225 ml de milieu mEHEC® pré-chauffé (à $41,5 \pm 1$ °C). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon. Incuber pendant 18 à 24 h à $41,5 \pm 1$ °C.
5. **Produits laitiers** – Peser en conditions aseptiques 25 g (ml) de prise d'essai et les introduire dans 225 ml de milieu mEHEC® pré-chauffé (à $41,5 \pm 1$ °C). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon. Incuber pendant 10 à 18 h à $41,5 \pm 1$ °C. Transférer dans 0,5 ml de bouillon cœur-cerveille (BHI) et incuber pendant 2 à 4 h à 37 ± 1 °C, comme indiqué à l'étape C8 ci-dessous.
6. **Échantillons environnementaux** – Peser en conditions aseptiques 25 g de balayures ou 25 ml d'eau de procédé et les introduire dans 225 ml de milieu mEHEC® pré-chauffé (à $41,5 \pm 1$ °C). Pour le contrôle environnemental, pré-humidifier des éponges déshydratées stériles avec 10 ml de bouillon D/E (Dey/Engley) ou de bouillon Letheen. Humidifier un écouvillon stérile en le trempant dans du bouillon D/E ou Letheen. Après avoir recueilli l'échantillon, ajouter l'éponge ou l'écouvillon à respectivement 100 ml ou 10 ml de milieu mEHEC®. Incuber pendant 10 à 18 h à $41,5 \pm 1$ °C.

Remarque : ne pas utiliser avec Assurance® GDS avec les éponges ou les écouvillons humidifiés avec un tampon neutralisant, car ils peuvent interférer avec la réaction de PCR.

C. Protocole de traitement des échantillons

Changer de gants avant de manipuler les réactifs.

Remarque : les échantillons enrichis peuvent être conservés entre 2 °C et 8 °C (au réfrigérateur) jusqu'à 72 h avant analyse avec Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq.

1. Vortexer le **réactif de concentration**. Transférer immédiatement 20 µl dans chacun des puits d'échantillon Assurance® GDS requis (1 puits/échantillon) à l'aide d'une pipette à répétition et de pointes de pipette de 0,5 ml. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
2. Transférer 1,0 ml de **solution de lavage** dans des puits d'échantillon supplémentaires (1 puits/échantillon) sur une base pour puits d'échantillon à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 10 ml. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.

Pour les **produits laitiers**, distribuer 0,5 ml de bouillon BHI stérile dans les puits d'échantillon (1 puits/échantillon) à la place de la solution de lavage. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
3. Transférer 45 µl de **tampon de remise en suspension Tq** dans les puits de la plaque de remise en suspension à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 0,5 ml. Couvrir la plaque de remise en suspension avec des bandelettes de film adhésif.
4. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette de puits d'échantillon. Ajouter 1,0 ml d'échantillon incubé dans chaque puits d'échantillon contenant du réactif de concentration.

Éviter de transférer des particules alimentaires. Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque échantillon. Couvrir chaque barrette de puits d'échantillon avec un nouveau film adhésif avant d'ajouter des échantillons à une nouvelle barrette. **Replacer immédiatement les échantillons dans l'incubateur pour une durée d'incubation de 18 h en vue d'une confirmation, si nécessaire.**

5. Placer les puits d'échantillons scellés sur l'agitateur vortex et le vortexer à environ 900 tours/minute pendant 10 à 20 minutes. Si nécessaire, ajuster le régime pour veiller à ce que le liquide n'entre pas en contact avec le film adhésif.
6. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette d'échantillons et le jeter. Retirer le film adhésif correspondant d'une barrette de puits d'échantillon contenant de la solution de lavage ou du BHI.
7. Charger des pointes sur le PickPen® en veillant à ce qu'elles soient bien fixées sur l'outil PickPen®. Déployer les aimants PickPen® et insérer les pointes dans la première barrette de puits d'échantillon. Agiter doucement pendant 30 s en effectuant un mouvement continu de haut en bas (de la surface vers le fond du puits). Tapoter doucement les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de milieu.
8. Transférer les pointes PickPen® dans les puits d'échantillon correspondants contenant de la solution de lavage et agiter doucement pendant 5 à 10 s (ne pas libérer les particules dans la solution). Transférer les pointes PickPen® sur la colonne correspondante de la plaque de remise en suspension préparée. Avec les pointes immergées, rétracter les aimants PickPen® et tapoter doucement les pointes pour libérer les particules dans le tampon de remise en suspension Tq. Couvrir la plaque de remise en suspension avec du film adhésif et passer à l'étape 10.

Pour les **produits laitiers**, transférer les pointes PickPen® dans les puits d'échantillon correspondants contenant du BHI. Avec les pointes immergées, rétracter les aimants PickPen® et tapoter doucement pour libérer les particules dans le BHI. Couvrir chaque barrette de puits d'échantillon contenant du BHI avec un nouveau film adhésif avant d'ajouter la prochaine série de particules aux puits d'échantillon contenant du BHI. Incuber les puits d'échantillon contenant du BHI et des particules pendant 2 à 4 h à 37 ± 1 °C.

9. Après incubation, transférer les particules des puits d'échantillon avec BHI (voir étape 7) jusqu'à la colonne correspondante de la plaque de remise en suspension préparée à l'aide des pointes PickPen®. Avec les pointes immergées, rétracter les aimants PickPen® et tapoter doucement les pointes pour libérer les particules dans le tampon de remise en suspension. Couvrir la plaque de remise en suspension avec du film adhésif et passer à l'étape 10.
10. Répéter les étapes (6) à (9) pour tous les échantillons en utilisant de nouvelles pointes pour chaque barrette d'échantillons.

PASSER A LA SECTION PROCEDURE DE TEST

Procédure de test (amplification et détection)

Changer de gants avant de manipuler les réactifs

A. Préparation du bloc de refroidissement avec gel

1. Avant la première utilisation, le bloc de refroidissement avec gel doit être stocké au congélateur (à -20 ± 5 °C) pendant au moins 6 h. Lorsqu'il est congelé, le bloc de refroidissement avec gel change de couleur et passe du rose au violet. Lorsqu'il n'est pas utilisé, le bloc de refroidissement avec gel doit continuer à être stocké -20 ± 5 °C.
2. Entre deux utilisations, replacer le bloc de refroidissement avec gel au congélateur jusqu'à ce qu'il soit complètement violet, ce qui indique qu'il est prêt à être utilisé. Cela peut prendre jusqu'à 2 h.
3. Le bloc de refroidissement en aluminium à 72 puits est destiné au kit de test **576** et doit être conservé au réfrigérateur (5 ± 3 °C).

B. Préparation des tubes d'amplification Tq

1. La configuration du Rotor-Gene® Assurance® GDS et la saisie des données doivent être terminées avant de transférer les échantillons de la plaque de remise en suspension vers les tubes d'amplification Tq.
2. Retirer les **tubes d'amplification Tq** du sachet en aluminium et les placer dans le bloc de refroidissement avec gel congelé. Refermer le sachet.
3. Pour le kit de test **576**, utiliser le support pour tubes d'amplification à espacement variable afin de séparer par rotation les tubes d'amplification. Placer le couvercle au-dessus du support.
4. Ouvrir les tubes d'amplification. Transférer 30 µl d'échantillon du puits de la plaque de remise en suspension vers chaque tube d'amplification à l'aide d'une pipette multicanaux et de pointes à filtre barrière. Appuyer fermement sur le couvercle de chaque tube d'amplification pour le fermer.
5. Pour le kit de test **576**, retirer le couvercle du support et, à l'aide du support, regrouper les tubes d'amplification en les faisant tourner. Boucher les tubes d'amplification Tq à l'aide de l'outil de fermeture de tube d'amplification.
6. Transférer les tubes d'amplification sur le bloc en aluminium. Inspecter visuellement chaque tube pour s'assurer que le bouchon est bien scellé. **Conserver la plaque de remise en suspension scellée au réfrigérateur (5 ±3 °C).**
7. Placer les tubes d'amplification dans le Rotor-Gene® Assurance® GDS dans l'ordre séquentiel, en commençant par la position 1. Pour les kits de test **100** et **576ATM**, utiliser le rotor à 36 puits et l'anneau de verrouillage ; pour le kit de test **576**, utiliser le rotor à 72 puits et l'anneau de verrouillage.

Remarque : pour le kit de test **576**, après avoir chargé les tubes d'amplification sur le rotor et les avoir solidement arrimés à l'aide d'un anneau de verrouillage, mélanger soigneusement leur contenu en les secouant avec un mouvement énergique. Voir la **Note d'application 2060 / MK_AN4551EN / MS_AN4551EN** pour plus de précisions.

8. Démarrer le cycle du Rotor-Gene®. Se reporter au Manuel d'utilisation Assurance® GDS (Réf. 55342 / 20516474) pour des instructions détaillées sur l'utilisation du Rotor-Gene®.

Remarque : le Rotor-Gene® Assurance® doit être démarré dans les 20 min suivant l'ajout des échantillons aux tubes d'amplification.

Résultats

Une fois l'analyse terminée, le logiciel du Rotor-Gene® Assurance® GDS fournit un tableau de résultats. Chaque échantillon est identifié comme **positif**, **négatif**, or **pas d'amp.**

Positif : les échantillons sont positifs pour *Salmonella*

Négatif : les échantillons sont négatifs pour *Salmonella*

Pas d'amp. : l'amplification ne s'est pas produite – répéter l'analyse à partir de C. Protocole de traitement des échantillons. Si le résultat "Pas d'amp." se répète, contacter votre service technique local.

N°	Couleur	Nom	Résultat	Description	Numéro de lot du kit
1	■	Échantillon 1	Positif	Salmonella	1234567
2	■	Échantillon 2	Négatif	Salmonella	1234567
3	■	Échantillon 3	Pas d'amp.	Salmonella	1234567

Remarque : les échantillons enrichis peuvent être conservés à 5 ± 3 °C jusqu'à 72 h avant analyse avec Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq.

Confirmation

Méthode certifiée NF Validation par AFNOR Certification :

Les échantillons enrichis dans les milieux d'enrichissement Assurance® GDS spécifiés doivent être incubés jusqu'à l'obtention des résultats GDS (maximum 24 h d'enrichissement) à 37 ± 1 °C.

Remarque : les échantillons enrichis peuvent être maintenus à 5 ± 3 °C jusqu'à 72 h avant confirmation. Pour les produits laitiers, conserver le bouillon mEHEC® (et non le repiquage dans du BHI) à 5 ± 3 °C.

Dans le cadre de la certification NF VALIDATION, tous les échantillons identifiés comme positifs par Assurance® GDS *Salmonella* Tq doivent être confirmés par l'un des tests suivants :

- A. Suivre la norme ISO 6579-1 :
1. Transférer 0,1 ml d'échantillon enrichi dans 10 ml de bouillon de Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) et de bouillon de Muller-Kauffmann au tétrathionate avec novobiocine (MKTTn).
 2. Incuber le bouillon RVS dans un bain-marie ou un incubateur à $41,5 \pm 1$ °C pendant 18 à 24h. Incuber le bouillon MKTTn à 37 ± 1 °C pendant 18 à 24 h.
 3. Une fois l'incubation terminée, ensemer en stries le tube de bouillon en vue d'un isolement sur une gélose sélective appropriée (p. ex. XLD) et procéder à une confirmation conformément aux techniques normalisées décrites dans la méthode de référence du CEN ou de l'ISO.
- B. *Salmonella* peut être isolée à partir des échantillons positifs au test *Salmonella* en ensemençant le réactif de concentration pour *Salmonella* qui reste dans la plaque de remise en suspension. Ensemer les billes d'IMS sur des plaques de gélose chromogène. Ensemer les plaques en vue d'un isolement. Incuber les plaques pendant 20 à 24 h à 36 ± 1 °C.

Isolement de *Salmonella* à l'aide du réactif de concentration restant dans la plaque de remise en suspension

Équipement/matériel requis

Matériel nécessaire en plus de celui demandé pour le PROTOCOLE DE DÉPISTAGE SECONDAIRE :

Solution de lavage

Étaleurs stériles et jetables pour plaque de gélose

Incubateur capable de maintenir une température de 36 ± 1 °C (pour l'incubation des plaques)

1. Ajouter 100 µl de solution de lavage, en utilisant une pipette à répétition et une pointe de pipette de 0,5 ml, dans le nombre requis de puits de la plaque de remise en suspension (1 puits/échantillon). Couvrir les puits de la plaque de remise en suspension contenant la solution de lavage avec des bandelettes de film adhésif.
2. À partir de la plaque de remise en suspension de l'échantillon précédemment utilisée pour l'analyse GDS *Salmonella* (Étape B4, Procédure de test), pipeter brièvement de haut en bas les billes d'IMS dans la plaque de remise en suspension pour bien mélanger (volume d'environ 15 µl), car les billes d'IMS tomberont au fond des puits durant le stockage.
3. Retirer une bandelette de film adhésif de la plaque de remise en suspension contenant la solution de lavage de l'étape 1. Transférer 15 µl de billes d'IMS en suspension dans un puits de la plaque de remise en suspension contenant de la solution de lavage.
4. Pipeter brièvement la solution de lavage vers le haut puis vers le bas pour mélanger les billes dans le puits. Transférer 50 µl de billes d'IMS depuis la plaque de remise en suspension de la solution de lavage vers la plaque chromogène de votre choix : Gélose ChromoSelect *Salmonella* (réf. Sigma 05538) ou gélose *Salmonella* CHROMID (réf. bioMérieux 43621) ou encore gélose RAPID'*Salmonella* (réf. Bio-Rad 3563961). Ensemer les billes en vue d'un isolement. Incuber les plaques pendant 22 ± 2 h à 36 ± 1 °C (conformément aux instructions du fabricant).

5. Confirmer les colonies typiques par un test d'agglutination de particules de latex pour *Salmonella* (kit de test Oxoid™ *Salmonella*, réf. DR1108A).

Remarque : la plaque de tampon de remise en suspension GDS *Salmonella* originale peut être conservée à 5 ± 3 °C (réfrigération) jusqu'à 24 h avant la confirmation.

- C. *Salmonella* peut être isolée par culture à partir d'échantillons positifs pour *Salmonella* en utilisant le Réactif de concentration des *Salmonella* (inclus dans le kit Assurance® GDS pour *Salmonella*), qui contient un mélange de particules d'IMS contenant tous les sérogroupes de *Salmonella*. Cette méthode utilise le dispositif PickPen® Assurance® GDS pour l'isolement à l'aide du Réactif de concentration pour *Salmonella*. Ensemencer les billes d'IMS sur des plaques de gélose chromogène. Ensemencer les plaques en vue d'un isolement. Incuber les plaques pendant 20 à 24 h à 36 ± 1 °C.

Isolement de *Salmonella* à l'aide du réactif de concentration et du dispositif PickPen® Équipement/matériel requis

Matériel nécessaire en plus de celui demandé pour le PROTOCOLE DE DÉPISTAGE SECONDAIRE :

Réactif de concentration pour *Salmonella*

Solution de lavage

Étaleurs stériles et jetables pour plaque de gélose

Incubateur capable de maintenir une température de 36 ± 1 °C (pour l'incubation des plaques)

Remarque : pour les **produits laitiers**, n'effectuer aucun repiquage dans du BHI pour la confirmation ; à la place, procéder par séparation immunomagnétique (IMS) comme pour les échantillons non laitiers.

1. Aliquoter 20 µl de réactif de concentration pour *Salmonella* homogénéisé dans les puits d'échantillon GDS (1 puits/échantillon), à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 0,5 ml . Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
2. Ajouter 1 ml de solution de lavage dans un autre jeu de puits d'échantillon GDS (1 puits/échantillon), à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de 10 ml. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
3. Ajouter 100 µl de solution de lavage, en utilisant une pipette à répétition et une pointe de pipette de 0,5 ml, dans le nombre requis de puits de la plaque de remise en suspension (2 puits/échantillon). Couvrir les puits de la plaque de remise en suspension contenant la solution de lavage avec des bandelettes de film adhésif.
4. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette de puits d'échantillon GDS contenant le réactif de concentration. Après incubation, mélanger doucement à la main les échantillons enrichis présumés positifs pour garantir leur homogénéité. Ajouter 1 ml d'échantillon enrichi à chaque puits d'échantillon. Éviter de transférer des particules alimentaires. Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque échantillon. Sceller chaque rangée de puits d'échantillon avec une nouvelle bandelette de film adhésif.
5. Placer les puits d'échantillons scellés contenant le Réactif de concentration pour *Salmonella* et les enrichissements sur l'agitateur vortex pour plaques à environ 900 tours/minute pendant 10 à 20 min.

Remarque : si nécessaire, ajuster le régime pour veiller à ce que le liquide n'entre pas en contact avec le film adhésif.

6. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette d'échantillons et le jeter. Retirer le film adhésif correspondant des puits d'échantillon contenant la solution de lavage.
7. Charger des pointes sur le PickPen® en veillant à ce qu'elles soient bien fixées sur l'outil PickPen®. Déployer les aimants PickPen® et insérer les pointes dans la première barrette de puits d'échantillon. Agiter doucement les pointes pendant au moins 30 s en effectuant un mouvement continu de haut en bas (de la surface vers le fond des puits). Tapoter doucement les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de milieu.
8. Transférer les pointes PickPen® dans les puits d'échantillon correspondants contenant de la solution de lavage et agiter doucement pendant au moins 10 s. Ne pas libérer les particules dans la solution. Tapoter

doucement les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de solution de lavage.

9. Transférer les pointes PickPen® sur la rangée correspondante de la plaque de remise en suspension préparée. Avec les pointes immergées, rétracter les aimants PickPen® et tapoter doucement les pointes pour libérer les particules dans la solution de lavage.
10. Préparer une dilution au 1/10e supplémentaire du réactif de concentration pour *Salmonella* (billes d'IMS) dans de la solution de lavage. Réaliser les dilutions dans les puits de la plaque de remise en suspension.
11. Pipeter brièvement la solution de lavage vers le haut puis vers le bas pour remettre les billes en suspension. Transférer 50 µl de billes diluées à un rapport 1:10 depuis la plaque de remise en suspension vers la plaque chromogène de votre choix : Gélose ChromoSelect *Salmonella* (réf. Sigma 05538) ou gélose *Salmonella* CHROMID (réf. bioMérieux 43621) ou encore gélose RAPID'*Salmonella* (réf. Bio-Rad 3563961). Ensemencer les billes en vue d'un isolement. Incuber les plaques pendant 22 ± 2 h à 36 ± 1 °C (conformément aux instructions du fabricant).
12. Confirmer les colonies typiques par un test d'agglutination de particules de latex pour *Salmonella* (kit de test Oxoid™ *Salmonella*, réf. DR1108A).

Remarque : dans l'éventualité de résultats discordants (présumés positifs avec la méthode alternative, non confirmés par l'un des moyens ci-dessus), le laboratoire doit prendre les mesures nécessaires pour s'assurer de la validité des résultats obtenus.

Méthode certifiée par MicroVal

Les échantillons enrichis dans le milieu d'enrichissement mEHEC® doivent être incubés jusqu'à l'obtention des résultats GDS (maximum 24 h d'enrichissement) à 41,5 ± 1 °C.

Remarque : les échantillons enrichis peuvent être maintenus à 5 ± 3 °C jusqu'à 72 h avant confirmation. Pour les produits laitiers, conserver le bouillon mEHEC® (et non le repiquage dans du BHI) à 5 ± 3 °C.

Confirmer les échantillons par un transfert dans du bouillon d'enrichissement sélectif (A) ou une méthode de confirmation alternative (B ou C ci-dessous).

A. Suivre la norme ISO 6579-1 :

1. Transférer 0,1 ml d'échantillon enrichi dans 10 ml de bouillon de Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) et de bouillon de Muller-Kauffmann au tétrathionate avec novobiocine (MKTTn).
2. Incuber le bouillon RVS dans un bain-marie ou un incubateur à 41,5 ± 1 °C pendant 18 à 24h. Incuber le bouillon MKTTn à 37 ± 1 °C pendant 18 à 24 h.
3. Une fois l'incubation terminée, ensemencer en stries le tube de bouillon en vue d'un isolement sur une gélose sélective appropriée (p. ex. XLD) et procéder à une confirmation conformément aux techniques normalisées décrites dans la méthode de référence du CEN ou de l'ISO.

B. Confirmer en ensemencant directement en stries 10 µl de l'enrichissement sur une plaque chromogène de votre choix :

1. CHROMID® *Salmonella* (bioMérieux, réf. 43621), gélose RAPID'*Salmonella* (Bio-Rad, réf. 3563961), gélose *Salmonella* ChromoSelect (Sigma, réf. 05538). Ensemencer la boîte avec des stries en vue d'un isolement. Incuber les plaques pendant 20 à 24 h entre 35 et 37 °C (conformément aux instructions du fabricant).
2. Confirmer jusqu'à 5 colonies typiques par un test d'agglutination de particules de latex pour *Salmonella* (kit de test Oxoid™ *Salmonella*, réf. DR1108A).

Stockage

Stocker les composants du kit Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq à 5 ±3 °C. La date de péremption du kit est indiquée sur l'étiquette de la boîte du produit.

Précautions

Respecter les Bonnes pratiques de laboratoire (voir la norme EN ISO 7218)

Ne pas utiliser le kit de test au-delà de la date de péremption figurant sur l'étiquette de la boîte du produit.

SÉCURITÉ

Kit Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq — Ce produit n'est pas destiné à un usage humain ou vétérinaire. Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq doit être utilisé comme décrit dans la notice. Le contenu du test peut être nocif en cas d'ingestion. L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations relatives à la sécurité figurant dans les instructions du kit Assurance® GDS pour *Salmonella* Tq. Conserver les consignes de sécurité pour pouvoir les consulter ultérieurement.

Ne pas ouvrir ou autoclaver les tubes d'amplification usagés. Une fois l'analyse terminée, placer les tubes d'amplification usagés dans un récipient scellé contenant suffisamment de solution d'eau de Javel à 10 % pour recouvrir les tubes pendant au moins 15 min, ou dans un double sachet et les éliminer à l'extérieur du laboratoire. Suivre toutes les réglementations locales, des États/des provinces, et/ou nationales en vigueur relatives à l'élimination des déchets. En cas de suspicion d'une contamination, humidifier une serviette en papier avec une solution d'eau de Javel à 10 % et essuyer toutes les paillasses de laboratoire et les surfaces de l'équipement. Éviter de vaporiser la solution d'eau de Javel directement sur les surfaces. Laisser la solution d'eau de Javel agir sur les surfaces pendant au moins 15 min avant de l'essuyer avec une solution d'alcool isopropylique à 70 %.

Pour préparer une solution d'eau de Javel à 10 %, ajouter 10 ml d'eau de Javel du commerce contenant au moins 5 % d'hypochlorite de sodium à 90 ml d'eau désionisée. La concentration finale d'hypochlorite de sodium dans la solution d'eau de Javel doit être de 0,5 % minimum. La solution d'eau de Javel est stable pendant 7 jours à compter de la préparation. Pour préparer une solution d'alcool isopropylique à 70 %, ajouter 70 ml d'alcool isopropylique pur à 30 ml d'eau désionisée ou acheter de l'alcool isopropylique à 70 % du commerce.

Thermocycleur Rotor-Gene® Assurance® GDS — Une utilisation incorrecte du Rotor-Gene® Assurance® GDS peut provoquer des blessures ou endommager l'appareil. S'ils ne sont pas manipulés correctement, certains composants peuvent présenter un risque de blessure du fait de leur forte chaleur. Pour un usage en toute sécurité, l'appareil ne doit être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié dûment formé. L'entretien de l'appareil ne doit être réalisé que par des techniciens de maintenance de MilliporeSigma/Merck KGaA.

Enrichissement des échantillons — Pour réduire les risques liés à une exposition aux produits chimiques et aux produits biologiques à risque infectieux, effectuer les analyses de pathogènes dans un laboratoire correctement équipé sous la supervision d'un personnel formé. Toujours suivre les consignes de sécurité standard de laboratoire, notamment le port de vêtements de protection personnelle et d'une protection des yeux adaptés, lors de la manipulation des réactifs et des échantillons contaminés. Éviter tout contact avec les constituants des milieux d'enrichissement et les tubes de réactifs après l'amplification. Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes actuellement en vigueur dans le secteur. Décontaminer et éliminer les produits conformément aux bonnes pratiques de laboratoire et aux réglementations locales, nationales et fédérales.

Précautions concernant *Salmonella* — Les *Salmonellae* sont des organismes présentant un degré de sécurité de niveau 2. Les échantillons biologiques, tels que les enrichissements, ont la capacité de transmettre des maladies infectieuses. Suivre toutes les réglementations locales, des États/des provinces, et/ou nationales en vigueur relatives à l'élimination des déchets biologiques. Porter un équipement de protection approprié comprenant, sans toutefois s'y limiter : des lunettes de protection, un masque facial, une blouse de laboratoire et des gants. Toutes les tâches doivent être réalisées dans des installations correctement équipées, contenant du matériel de sécurité adapté (systèmes de confinement physique, etc.). Le personnel doit être formé conformément aux exigences de la réglementation et de l'entreprise/institution applicables avant de travailler avec des produits potentiellement infectieux. Tous les bouillons d'enrichissement doivent être stérilisés après toute étape de confirmation basée sur une culture. Nettoyer les postes de travail et le matériel de laboratoire avec le désinfectant de son choix avant et après chaque activité de laboratoire (solution d'hypochlorite de sodium, solution de phénol, solution d'ammonium quaternaire, etc.).

Annexe A – Recettes des milieux d'enrichissement

Eau peptonée tamponnée (EPT)

Suivre les instructions du fabricant pour la préparation du milieu.

Eau peptonée tamponnée avec vancomycine (EPT+v)

Préparer l'EPT comme indiqué ci-dessus. Le jour de l'utilisation, ajouter 0,675 ml d'une solution de vancomycine à 0,2 % dans 225 ml d'EPT (10,1 ml de solution de vancomycine dans 3 375 ml d'EPT).

Eau peptonée tamponnée avec amylase (EPT+a)

Préparer l'EPT comme indiqué ci-dessus. Le jour de l'utilisation, ajouter 2,25 ml d'une solution d'amylase à 1 % dans 225 ml d'EPT (33,8 ml de solution d'amylase dans 3 375 ml d'EPT).

Eau peptonée tamponnée avec vancomycine et amylase (EPT+v+a)

Préparer l'EPT comme indiqué ci-dessus. Le jour de l'utilisation, ajouter 0,675 ml d'une solution de vancomycine à 0,2 % et 2,25 ml d'une solution d'amylase à 1 % dans 225 ml d'EPT (10,1 ml de solution de vancomycine et 33,8 ml de solution d'amylase dans 3 375 ml d'EPT).

Solution de vancomycine à 0,2 %

Dissoudre 0,2 g de chlorhydrate de vancomycine dans 100 ml d'eau désionisée stérile. Conserver dans l'obscurité entre 2 °C et 8 °C.

Solution d'amylase à 1 %

Dissoudre 1,0 g d'alpha-amylase (environ 50 U/mg) dans 100 ml d'eau désionisée stérile. Conserver dans l'obscurité entre 2 °C et 8 °C.

Remarque : vérifier auprès du fabricant que la source d'amylase ne contient pas également de la dextrine. S'assurer que l'amylase est bien d'origine bactérienne. Nous recommandons les références Sigma 10070 ou MP Biologics 0210044725.

Bouillon BHI

Suspendre 37 g de bouillon cœur-cerveille dans 1 l d'eau désionisée. Bien mélanger et séparer en aliquotes de la taille souhaitée. Autoclaver à 121 °C pendant 15 min.

Solution concentrée de vert brillant (colorant) à 1 %

Préparer une solution mère de vert brillant à 1 % en dissolvant 1 g de colorant vert brillant dans 100 ml d'eau désionisée stérile. Ne pas autoclaver.

Solution diluée de vert brillant (BGW)

Pour préparer la solution diluée de vert brillant, ajouter 2 ml de solution concentrée de vert brillant à 1 % dans 1 l d'eau désionisée stérile.

Lait UHT + Vert brillant (UHT+BG)

Pour préparer le mélange Lait UHT + vert brillant, ajouter 2 ml de solution de vert brillant à 1 % dans 1 l de lait UHT ou de lait écrémé en poudre reconstitué.

Annexe B – Méthodes d'enrichissement

Tableau 1 : Types d'échantillon et méthodes d'enrichissement pour *Salmonella* dans tous les aliments (hormis préparations pour nourrissons, céréales pour nourrissons et NFDM) et les échantillons environnementaux de surfaces – NF Validation (TRA 02/12-01/09)

Catégorie de denrées alimentaires	Milieu	Taille de l'échantillon	Rapport échantillon/milieu (volume de milieu)	Durée d'enrichissement	Température d'enrichissement
Sans repiquage dans du BHI					
Types d'aliments transformés (voir exceptions ci-dessous)	EPT	25 g	1/10 (225 ml)	18–24 h	37 ±1 °C
Échantillons environnementaux (surfaces en contact avec les aliments*)	EPT	Écouvillon Éponge	10 ml 100 ml	18–24 h	37 ±1 °C
Eau de procédé	EPT	25 ml	1:10 (225 ml)	18–24 h	37 ±1 °C
Avec repiquage dans du BHI					
Types d'aliments crus et non transformés	EPT	25 g	1/10 (225 ml)	18–24 h	37 ±1 °C
Échantillons environnementaux (surfaces n'entrant pas en contact avec les aliments**)	EPT	Écouvillon Éponge	10 ml 100 ml	18–24 h	37 ±1 °C
Poussière, balayures	EPT	25 g	1/10 (225 ml)	18–24 h	37 ±1 °C

* Échantillons environnementaux : surfaces en contact avec des produits alimentaires (et non alimentaires), surfaces de travail et zones adjacentes

(p. ex. mélangeurs, plans de travail, zones d'égouttage, locaux)

**Échantillons environnementaux : surfaces n'entrant pas en contact avec les aliments et éloignées des surfaces de travail (p. ex. systèmes d'évacuation des liquides, sols, murs, roulettes des chariots)

Tableau 2 : Types d'échantillon et méthodes d'enrichissement pour *Salmonella* (préparations pour nourrissons, céréales pour nourrissons et NFDM) – NF Validation (TRA 02/12-01/09)

Catégorie de denrées alimentaires	Milieu	Taille de l'échantillon	Rapport échantillon/ milieu (volume de milieu)	Durée d'enrichissement	Température d'enrichissement (préchauffage du milieu)
Sans repiquage dans du BHI					
Préparations pour nourrissons <u>sans</u> probiotiques	EPT	10–25 g	1/10 (90–225 ml)	18–26 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)
		50–375 g	1/10 (450–3375 ml)	18–29 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)
Céréales pour nourrissons <u>sans</u> probiotiques	EPT+a	10–25 g	1/10 (90–225 ml)	18–26 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)
		50–375 g	1/10 (450–3375 ml)	18–29 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)
Avec repiquage dans du BHI					
Préparations pour nourrissons <u>avec</u> probiotiques	EPT+v	10–25 g	1/10 (90–225 ml)	18–26 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)
		50–375 g	1/10 (450–3375 ml)	18–29 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)
Céréales pour nourrissons <u>avec</u> probiotiques	EPT+v+a	10–25 g	1/10 (90–225 ml)	18–26 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)
		50–375 g	1/10 (450–3375 ml)	18–29 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)
NFDM	BGW	10–25 g	1/10 (90–225 ml)	20–28 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)
		50–375 g	1/10 (450–3375 ml)	20–29 h	37 ±1 °C (37 ±1 °C)

Tableau 3 : Types d'échantillon et méthodes d'enrichissement pour *Salmonella* (produits bruts et finis à base de chocolat, prises d'essai de grand volume) – NF Validation (TRA 02/12-01/09)

Catégorie de denrées alimentaires	Milieu	Taille de l'échantillon	Rapport échantillon/ milieu (volume de milieu)	Durée d'enrichissement	Température d'enrichissement (préchauffage du milieu)
Produits bruts et finis à base de chocolat	Lait UHT + BG	Jusqu'à 375 g	1/10 (jusqu'à 3 375 ml)	24–32 h	34 à 38 °C (37 ±1 °C)
	EPT	Jusqu'à 375 g	1/10 (jusqu'à 3 375 ml)	24–32 h	34 à 38 °C (37 ±1 °C)

Tableau 4 : Type d'échantillon et méthode d'enrichissement pour *Salmonella* – Validation MicroVal (2015LR50)

Catégorie de denrées alimentaires	Milieu	Taille de l'échantillon	Rapport échantillon / milieu (volume de milieu)	Durée d'enrichissement	Température d'enrichissement (préchauffage du milieu)
Produits carnés, charcuterie et produits carnés traités thermiquement	mEHEC®	25 g	1:10 (225 ml)	10 à 18 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
		375 g	1:5 (1 500 ml)	10 à 18 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
Volaille crue, charcuterie et produits à base de volaille traités thermiquement		25 g	1:10 (225 ml)	10 à 18 h	41,5 ±1 °C (37 ±1 °C)
Fruits et légumes		25 g	1:10 (225 ml)	10 à 14 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
Aliments multi-composants et aliments composant un repas		25 g	1:10 (225 ml)	18 à 24 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
Produits laitiers		25 g	1:10 (225 ml)	10 à 18 h + 2-4 h dans du BHI	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
Échantillons environnementaux		25 g ou ml ou dispositif d'échantillonnage	1:10	10 à 18 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)

Certificat NF Validation accordé par AFNOR Certification à Assurance® GDS pour Salmonella Tq comme méthode alternative d'analyse pour la détection de Salmonella spp. dans tous les produits alimentaires, aliments pour animaux et échantillons environnementaux de production industrielle en relation avec la méthode de référence décrite dans la norme internationale EN ISO 6579-1 et son premier amendement, conformément à la norme EN ISO 16140-2 (2016). Pour de plus amples informations sur la date de fin de validité de la certification NF VALIDATION, veuillez consulter le certificat TRA 02/12-01/09 disponible sur le site Internet <http://nf-validation.afnor.org/en>.



TRA 02/12-01/09

MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR L'AGRO-ALIMENTAIRE

<http://nf-validation.afnor.org/en>

Entité de fabrication

BioControl Systems, Inc., 12822 SE 32nd St, Bellevue, WA 98005, États-Unis.

Tél. : +1 425-586-3300 www.sigmaaldrich.com

BioControl Systems, Inc. est une filiale de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.

