



Health Products and Food Branch

Ottawa

**Detection of *Salmonella* spp. from all foods and selected environmental surfaces using
iQ-Check™ *Salmonella* Real-Time PCR Test Kit**

**Microbiological Methods Committee
Microbiology Evaluation Division
Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate,
Health Products and Food Branch, Health Canada
Postal Locator: 2204E
Ottawa, Ontario K1A 0K9**

E-mail micro_methods_committee@hc-sc.gc.ca

1. Application

This method is applicable to the rapid detection of *Salmonella* spp. to determine compliance with the requirements of Sections 4 and 7 of the *Food and Drugs Act*. Positive results must be confirmed with a cultural method. This method has been validated for use in all foods, and the following environmental samples: stainless steel, plastic, ceramic and concrete.

2. Description

The iQ-Check™ system is a real-time PCR based assay that involves simultaneous amplification and detection of target organism after a single 21 ± 1 hr enrichment in Buffered Peptone Water. A regrowth step is not required. Results are automatically determined by the iQ-Check™ software. The assay should only be used by trained laboratory personnel who follow standard good laboratory practices.

3. Principle

The iQ-Check™ *Salmonella* kit is based on gene amplification and detection by real-time PCR. Ready-to-use PCR reagents contain DNA polymerase, nucleotides, DNA primers and a fluorescent DNA hybridization probe specific to a highly conserved region on the genome of all species of *Salmonella*. All reagents necessary for the test are contained in the kit. PCR is a technique used to generate many copies of target DNA. During the PCR reaction, several cycles of heating and cooling allow DNA denaturation, by heat, followed by primers binding to the target region. The DNA polymerase then uses these primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons. In real-time PCR, specific oligonucleotide probes are used to detect the DNA during the amplification, by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore which fluoresces only when hybridized to the target sequence. In the iQ-Check™ *Salmonella* kit, carboxyfluorescein (FAM) is the fluorophore linked to the probe hybridizing to the *Salmonella* specific DNA sequence. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected, and the

sample is determined to be negative by the iQ-Check™ software. As the amount of amplicons increases with each round of amplification, fluorescence intensity also increases. During each PCR cycle, at the annealing step, the real-time PCR system measures this fluorescence and the associated software plots the fluorescence intensity versus number of cycles. This method allows a simple determination of the presence of *Salmonella* in a sample. To monitor for a successful DNA amplification in each reaction well, a synthetic DNA "internal control" is included in the reaction mix. This control is amplified with a specific probe at the same time as the *Salmonella* target DNA sequence, and detected by a second fluorophore.

4. Definition of Terms

See Appendix A of Volume 3.

5. Collection of Samples

See Appendix B of Volume 3

6. Materials and Special Equipment

Note: The Laboratory Supervisor must ensure that the analysis described in this method is carried out in accordance with the International Standard referred to as "ISO/IEC 17025:2005 (or latest version): General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories".

Note: If the laboratory uses any variations of the media listed here (either product that is commercially available or made from scratch), it is their responsibility to ensure equivalency. Please forward equivalency data to the Editor of *Compendium of Analytical Methods* for consideration of modification of this method.

1) iQ-Check™ *Salmonella* kit (Bio-Rad catalog # 357-8123)

Reagent A - Lysis reagent, 1 bottle (20 mL), contains magnetic stirbar

Reagent B - Fluorescent probes, 1 tube (0.55 mL)

Reagent C - Amplification mix, 2 tubes (2.2 mL each)

Reagent D - PCR negative control, 1 tube (0.5 mL)

Reagent E - PCR positive control, 1 tube (0.25 mL)

2) Supplies and reagents

2.1 Buffered Peptone Water (BPW)

2.2 Conical screw cap sterile tubes, 1.5 mL (for tube extraction only)

2.3 Dey-Engley (D/E) neutralizing broth or Lethen broth for sponges and swabs

2.4 12.5 cm x 8.5 cm x 4 cm Deepwell microplates (for deepwell extraction only)

2.5 Low-profile unskirted PCR plates, 48 or 96 well, white (Bio-Rad catalog# MLL-4851XTU, MLL-9651XTU)

2.6 Optical Flat 8-cap strips, ultraclear (Bio-Rad catalog # TCS-0803XTU)

2.7 Pre-pierced sealing film (Bio-Rad catalog # 360-0040) or equivalent (for deepwell extraction only)

2.8 Powder-free gloves

2.9 Sterile filter tips - adaptable to 20 µL, 200 µL and 1000 µL micropipettes

2.10 Stomacher bag with incorporated filter

2.11 Micropipettes—20 µL, 200 µL and 1000 µL

3) Equipment

- 3.1 Bench top centrifuge - maximum 10,000-12,000 × g, for 1.5 mL tubes (for tube extraction only)
- 3.2 CFX Manager Software Industrial Diagnostic Edition (Bio-Rad catalog # 360-0042)
- 3.3 Dry heat block, for 1.5 mL tubes - capable of maintaining 95 - 100°C (for tube extraction only)
- 3.4 Incubator - capable of maintaining temperatures of 37 ± 1°C for sample incubation
- 3.5 Magnetic stir plate
- 3.6 Real-time PCR system – CFX96™ real-time PCR detection system (Bio-Rad catalog # 360-0037) or MiniOpticon™ real-time PCR detection system (Bio-Rad catalog # 359-1592)
- 3.7 Stomacher, blender or equivalent
- 3.8 Thermomixer (Bio-Rad catalog # 360-0038 [base] and 360-0039 [deepwell block]) or equivalent (for deepwell extraction only)
- 3.9 Vortex apparatus

Note:	It is the responsibility of each laboratory to ensure that the temperatures of the incubators or water baths are maintained at the recommended temperatures. Where 35°C is recommended in text of the method the incubator may be at 35 ± 1.0°C. Similarly, lower temperatures of 30 or 25 may be ± 1.0°C. However, where higher temperatures are recommended, such as 43 or 45.5°C, it is imperative that the incubators or water baths be maintained within 0.5°C due to potential lethality of the higher temperatures on the microorganism(s) being isolated.
--------------	---

7. Procedure

The test shall be carried out in accordance with the following instructions:

7.1 Handling of Sample Units

Note:	It is important that the D/E neutralizing or Lethen broth is used to moisten sponges and swabs. The use of other neutralizing buffers can cause PCR inhibition.
--------------	---

- 7.1.1 Add D/E neutralizing broth to sterile sponges and swabs to moisten.
- 7.1.2 The protocol of MFLP-41 should be followed for obtaining and transporting swabs.
- 7.1.3 In the laboratory prior to analysis, except for shelf-stable foods, keep food sample units refrigerated or frozen, depending on the nature of the product. Thaw frozen food samples in a refrigerator, or under time and temperature conditions which prevent microbial growth or death.
- 7.1.4 Analyze the sample units as soon as possible after receipt at the laboratory.

7.2 Preparation for Analysis

- 7.2.1 Turn on heating block or thermomixer in advance to reach 95 - 100°C.
- 7.2.2 Turn on the thermal cycler and computer.

7.3 Preparation of Samples

- 7.3.1 Temper BPW to approximately 37°C before use.
- 7.3.2 Weigh 25g or 25ml of each food sample and combine with 225 ml BPW. Blend, stomach or vortex as required for thorough mixing.
- 7.3.3 Add the environmental sponge or large swabs to 100 mL of BPW or composite up to 10 sponges with 100 mL of BPW per sponge. Place smaller environmental swabs (e.g., cotton tip) in 10 mL of BPW or composite up to 10 swabs with 10 mL BPW per swab. Sponges should be stomached for 2 min on high speed; swabs should be vortexed for 2 min on high speed.
- 7.3.4 Incubate all samples 37°C for 21 ± 1 hr.

7.4 DNA Extraction – tube format

- 7.4.1 Place lysis reagent on a magnetic stir plate and stir on medium speed.
- 7.4.2 Add 100 µl of the lysis reagent to each 1.5 ml screw cap conical tube.
- 7.4.3 Collect 100 µl of enriched sample and add to a tube containing lysis reagent. Mix the solution by pipetting up and down in the tube a minimum of 3 times.
- 7.4.4 Place tube in the heat block at 100°C for 15 min.
- 7.4.5 Vortex at high speed.
- 7.4.6 Centrifuge at 10,000-12,000 × g for 2 min.

7.5 DNA Extraction – deepwell format

- 7.5.1 Add 100 µl of the lysis reagent to each well of a deepwell microplate.
- 7.5.2 After sample enrichment, collect a 100 µl aliquot of each sample and add into the deepwell microplate.
- 7.5.3 Seal with pre-pierced sealing film.
- 7.5.4 Place in the thermomixer instrument at 99°C at 1,300 rpm for 10-15 min.
- 7.5.5 Remove plate from thermomixer and allow to cool in the refrigerator for 10 minutes.

7.6 PCR

- 7.6.1 Prepare PCR mix combining the amplification solution (Reagent C) and the fluorescent probes (Reagent B) according to the chart in the package insert.
- 7.6.2 Add 45 µl of PCR mix to each well of a 48 or 96 well PCR plate, pipetting carefully to avoid bubbles.
- 7.6.3 Add 5 µl of each sample, or control, to the appropriate well.
- 7.6.4 One positive control (Reagent E) and one negative control (Reagent D) should be run with each assay. Controls are provided as ready-to-use solutions in the kit.
- 7.6.5 Seal the plate with the optical caps.
- 7.6.6 Place the plate into the reaction module of the thermal cycler and close the lid.
- 7.6.7 Verify the plate setup and protocol selection is correct.
- 7.6.8 Click on the “run” button in the software program.
- 7.6.9 A window will appear allowing you to save your data in a specific location. Once “save” is selected, the PCR protocol is started.
- 7.6.10 A report will be generated at the end of the run assigning each sample a positive or negative result.

7.7 Confirmation of Presumptive Positive Results

Using the enrichment broth, immediately proceed with MFHPB-20, beginning with inoculation of the selective enrichment (Tetrathionate Brilliant Green broth and Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone broth).

8. References

- 8.1 Health Canada, 2009. MFHPB-20. Methods for Isolation and Identification of *Salmonella* from Foods and Environmental Samples. Compendium of Analytical Methods, Volume 2. Available at <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2/mfhp20-01-eng.php>

9. Preparation of Media

9.1 Letheen Broth

Beef Extract	5.0 g
Proteose Peptone no. 3	10.0 g
Polysorbate 80 (Tween™ 80)	5.0 g
Lecithin	0.7 g
Sodium chloride	5.0 g
Distilled water	1.0 L

Dissolve ingredients with gentle heating, if necessary, and adjust pH to 7.0 ± 0.2 . Dispense and autoclave for 15 min at 121°C.

9.2 Dey-Engley Neutralizing Broth

Tryptone	5.0 g
Yeast Extract	2.5 g
Dextrose	10.0 g
Sodium thioglycollate	1.0 g
Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	6.0 g
Sodium bisulfate (NaHSO_3)	2.5 g
Polysorbate 80 (Tween™ 80)	5.0 g
Lecithin (soy bean)	7.0 g
Bromcresol Purple	0.02 g
Distilled water	1.0 L

Dissolve ingredients with gentle heating, if necessary, and adjust pH to 7.6 ± 0.2 . Dispense and autoclave for 15 min at 121°C.

End of Document



Direction générale des produits de santé et des aliments

Ottawa

Détection des *Salmonella* spp. dans tous les aliments et dans certains échantillons de surface au moyen de la trousse iQ-Check^{MC} *Salmonella*, une méthode PCR en temps réel

**Comité des méthodes microbiologiques
Division de l'évaluation microbiologique
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments,
Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada
Indice de l'adresse : 2204E
Ottawa, Ontario K1A 0K9**

Courriel : micro_methods_committee@hc-sc.gc.ca

1. Application

Cette méthode est applicable à la détection rapide des *Salmonella* spp. afin de déterminer la conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*. Les résultats positifs doivent être confirmés au moyen d'une méthode de culture. Le recours à cette méthode a été validé pour tous les aliments et les échantillons environnementaux suivants: acier inoxydable, plastique, céramique et béton.

2. Description

Le système iQ-Check^{MC} est une épreuve fondée sur la PCR en temps réel qui repose sur l'amplification simultanée et la détection de l'organisme cible à la suite d'un seul enrichissement de 21 ± 1 h dans de l'eau peptonée tamponnée. Aucune étape de revivification n'est pas requise. Le logiciel iQ-Check^{MC} détermine les résultats automatiquement. L'essai ne doit être utilisé que par du personnel de laboratoire formé observant les bonnes pratiques de laboratoire.

3. Principe

La trousse iQ-Check^{MC} *Salmonella* est fondée sur l'amplification génique et la détection au moyen de la PCR en temps réel. Les réactifs de PCR prêts à être utilisés contiennent de l'ADN polymérase, des nucléotides, des amorces de l'ADN et une sonde d'hybridation de l'ADN fluorescente ciblant une zone du génome bien conservée de toutes les espèces de *Salmonella*. La trousse contient tous les réactifs nécessaires pour l'analyse. La PCR est une technique servant à produire plusieurs copies de l'ADN ciblé. Pendant la PCR, plusieurs cycles de chauffage et de refroidissement permettent la dénaturation thermique de l'ADN, laquelle est suivie par la fixation des amorces à la région ciblée. L'ADN polymérase utilise ensuite ces amorces et les désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) pour répliquer l'ADN, créant ainsi des copies de l'ADN ciblé appelées *amplicons*. En PCR en temps réel, les sondes d'oligonucléotides spécifiques sont utilisées pour détecter l'ADN au moyen de l'hybridation des amplicons pendant l'amplification. Ces sondes sont liées à un fluorophore, lequel fluoresce

exclusivement pendant l'hybridation à la séquence ciblée. Dans les trousse*s* iQ-Check^{MC} *Salmonella*, la carboxyfluoresceine (FAM) est le fluorophore lié à la sonde d'hybridation de la séquence d'ADN spécifique de *Salmonella*. En absence d'ADN ciblé, aucune fluorescence n'est détectée, et le logiciel iQ-Check^{MC} détermine que l'échantillon est négatif. L'intensité de la fluorescence augmente proportionnellement à l'augmentation du nombre d'amplicons à chaque cycle d'amplification. Durant chaque cycle de PCR, à l'étape de renaturation, le système de PCR en temps réel mesure cette fluorescence, et le logiciel de la trousse reproduit sur graphique l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Cette méthode permet une détermination simple de la présence de *Salmonella* dans un échantillon donné. Le mélange réactionnel contient un « témoin interne » d'ADN synthétique destiné à surveiller la réussite de l'amplification de l'ADN dans chaque puits de réaction. Ce témoin est amplifié au moyen d'une sonde spécifique simultanément à l'amplification de la séquence d'ADN cible, puis détecté par un second fluorophore.

4. Définition des termes

Voir l'annexe A du volume 3.

5. Prélèvement des échantillons

Voir l'annexe B du volume 3.

6. Matériel et équipements spéciaux

Note: Le superviseur du laboratoire doit veiller à ce que l'analyse décrite dans la présente méthode soit effectuée conformément à la norme internationale ISO/IEC 17025 :2005 (ou dernière version) : Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Note: Si le laboratoire utilise des variantes des milieux énumérés aux présentes (qu'il s'agisse d'un produit offert sur le marché ou fabriqué à partir d'ingrédients), il leur incombe d'en assurer l'équivalence. Veuillez transmettre les données d'équivalence aux fins d'une étude de la modification de cette méthode à l'éditeur du *Compendium de méthodes d'analyse*.

1) Trousse iQ-Check^{MC} *Salmonella* (n° 357-8123 du catalogue Bio-Rad)

- Réactif A – réactif de lyse, 1 flacon (20 ml) contenant une tige agitatrice magnétique
- Réactif B – sondes fluorescentes, 1 tube (0,55 ml)
- Réactif C – mélange d'amplification, 2 tubes (2,2 ml chacun)
- Réactif D – témoin négatif de PCR, 1 tube (0,5 ml)
- Réactif E – témoin positif de PCR, 1 tube (0,25 ml)

2) Fournitures et réactifs

- 2.1 Eau peptonée tamponnée (EPT)
- 2.2 Tubes coniques stériles à bouchon vissé, 1,5 ml (pour extraction en tube seulement)
- 2.3 Bouillon neutralisant Dey-Engley (D/E) ou bouillon Lethen destiné aux éponges et aux écouvillons
- 2.4 12,5 cm × 8,5 cm × 4 cm Microplaques à puits profonds (pour extraction en puits profond seulement)
- 2.5 Plaques sans rebords pour PCR, de 48 ou 96 puits, blanches (n° MII-4851XTU, MLL-9651XTU au catalogue Bio-Rad)
- 2.6 Bandes optiques plates de 8 bouchons, ultratransparentes (n° TCS-0803XTU au

- catalogue Bio-Rad)
- 2.7 Film scellant prépercé (n° 360-0040 au catalogue Bio-Rad) ou l'équivalent (pour extraction en puits profond seulement)
- 2.8 Gants non poudrés
- 2.9 Embouts à filtre stériles adaptables aux micropipettes de 20 µl, de 200 µl et de 1000 µl
- 2.10 Sac pour Stomacher avec filtre incorporé
- 2.11 Micropipettes—20µL, 200µL, et 1000µL

3) Équipement

- 3.1 Centrifugeuse de table – vitesse maximale de 10 000 à 12 000 × g, pour tubes de 1,5 ml (pour extraction en tube seulement)
- 3.2 CFX Manager Software – Industrial Diagnostic Edition (n° 360-0042 au catalogue Bio-Rad)
- 3.3 Bloc de chauffage à sec, pour tubes de 1,5 ml – maintenant une température de 95 à 100 °C (pour extraction en tube seulement)
- 3.4 Incubateur – maintenant une température de 37 ± 1°C pour incuber les échantillons
- 3.5 Plaque d'agitation magnétique
- 3.6 Système de PCR en temps réel – système de détection PCR en temps réel CFX96™ pour (n° 360-0037 au catalogue Bio-Rad) ou système de détection PCR en temps réel MiniOpticon™ (n° 359-1592 au catalogue Bio-Rad)
- 3.7 Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 3.8 Thermomixeur (base, n° 360-0038 au catalogue Bio-Rad; bloc pour puits profonds, n° 360-0039 au catalogue Bio-Rad) ou l'équivalent (pour extraction en puits profond seulement)
- 3.9 Agitateur vortex

Note:	Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35°C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 35 ± 1°C. De même, des températures plus basses à 30 ou 25°C peuvent être à ± 1°C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5°C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs à ± 0,5°C, car une température plus élevée peut être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.
--------------	---

7. Marche à suivre

Effectuer l'analyse en suivant les instructions ci-dessous :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

Note:	L'humidification des éponges et des écouvillons au moyen du bouillon neutralisant D/E ou Letheen est importante. Le recours à d'autres tampons neutralisant peut faire obstacle à la PCR.
--------------	---

- 7.1.1 Humidifier les éponges et les écouvillons stériles à l'aide du bouillon neutralisant D/E.
- 7.1.2 Le protocole de la méthode MFLP-41 doit être suivi pour le prélèvement et le transport des écouvillons.
- 7.1.3 Les unités d'échantillonnage doivent être conservées au réfrigérateur ou au congélateur, selon la nature du produit, jusqu'au moment de l'analyse sauf dans

le cas des aliments pouvant être conservés à la température de la pièce pour une longue période de temps. Faire décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des microorganismes.

- 7.1.4 Les échantillons doivent être analysés le plus tôt possible après leur réception au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Mettre en marche le bloc de chauffage ou le thermomixeur de sorte qu'il atteigne de 95 à 100°C.
7.2.2 Mettre en marche le thermocycleur et l'ordinateur.

7.3 Préparation des échantillons

- 7.3.1 Avant d'utiliser l'eau peptonée tamponnée, veiller à ce que sa température atteigne à environ 37°C.
7.3.2 Mesurer 25 g ou 25 ml de chaque échantillon d'aliment et combiner avec 225 ml d'eau peptonée tamponnée. Homogénéiser à l'aide d'un stomacher ou d'un vortex selon le cas.
7.3.3 Ajouter 100 mL de EPT à chaque éponge ou amalgamer jusqu'à 10 éponges et ajouter 100 ml de EPT par éponge. Ajouter 10 ml de EPT à chaque écouvillon ou amalgamer jusqu'à 10 écouvillons et ajouter 10 ml de EPT par écouvillon. Pour les éponges, mélanger à grande vitesse pendant 2 minutes à l'aide du stomacher et pour les écouvillons, mélanger à grande vitesse pendant 2 minutes à l'aide de l'agitateur vortex.
7.3.4 Incuber tous les échantillons à 37°C pendant 21 ± 1 h.

7.4 Extraction de l'ADN – avec tube

- 7.4.1 Placer le réactif de lyse sur la plaque d'agitation magnétique et agiter à vitesse moyenne.
7.4.2 Ajouter 100 µl du réactif de lyse à chaque tube conique à bouchon vissable de 1,5 ml.
7.4.3 Transférer 100 µl du bouillon enrichi dans le tube contenant le réactif de lyse. Mélanger la solution en pipettant en mouvements ascendants et descendants au moins 3 fois.
7.4.4 Placer le tube dans le bloc de chauffage à 100°C pendant 15 min.
7.4.5 Mélanger à haute vitesse au moyen de l'agitateur vortex.
7.4.6 Centrifuger à 10 000 à 12 000 × g pendant 2 min.

7.5 Extraction de l'ADN – avec puits profonds

- 7.5.1 Ajouter 100 µl du réactif de lyse dans chaque puits d'une microplaque à puits profonds.
7.5.2 Après l'enrichissement de l'échantillon, transférer un aliquot de 100 µl de chaque échantillon enrichi dans la microplaque à puits profonds.
7.5.3 Sceller à l'aide du film scellant prépercé.
7.5.4 Placer dans le thermomixeur réglé à 99°C, à 1 300 rpm pendant 10 à 15 min.
7.5.5 Retirer la plaque du thermomixeur et laisser refroidir au réfrigérateur pendant 10 min.

7.6 PCR

- 7.6.1 Préparer le mélange de PCR en combinant la solution d'amplification (réactif C) et les sondes fluorescentes (réactif B), selon le tableau de la notice d'accompagnement du produit.
- 7.6.2 Ajouter 45 µl de mélange de PCR dans chaque puits d'une microplaque à 48 ou 96 puits et pipetter soigneusement pour éviter la formation de bulles.
- 7.6.3 Ajouter un aliquot de 5 µl de chaque échantillon ou témoin dans le puits approprié.
- 7.6.4 Un témoin positif (réactif E) et un témoin négatif (réactif D) doivent être analysés avec chaque épreuve. Les témoins prêts à utiliser sont compris dans la trousse.
- 7.6.5 Sceller la plaque au moyen des bouchons optiques.
- 7.6.6 Placer la plaque dans le thermocycleur et refermer le couvercle.
- 7.6.7 Vérifier le caractère adéquat de la préparation de la plaque et de la sélection du protocole.
- 7.6.8 Cliquer sur le bouton « run » du programme du logiciel.
- 7.6.9 Une fenêtre vous permettant de sauvegarder vos données à l'endroit votre choix s'affichera. La sélection de « save » démarre le protocole de PCR.
- 7.6.10 À la fin de l'analyse, un rapport sera produit attribuant un résultat positif ou négatif à chaque échantillon.

7.7 Épreuves de confirmation pour les résultats présumés positifs

En utilisant le bouillon d'enrichissement, procéder immédiatement avec MFHPB-20, eu débutant par l'inoculation de l'enrichissement sélectif (bouillon au tétrathionate additionné de vert brillant et bouillon Rapport-Vassiliadis au peptone de soja).

8. Références

- 8.1 Santé Canada, 2009. MFHPB-20. *Méthodes pour l'isolement et l'identification des salmonelles dans les aliments et les échantillons environnementaux. Compendium de méthodes*, Volume 2. Consultable au <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2/mfhp20-01-fra.php>.

9. Préparation des milieux

9.1 Bouillon Lethen

Extrait de viande	5,0 g
Peptone de protéose n° 3	10,0 g
Polysorbate 80 (Tween™ 80)	5,0 g
Lécithine	0,7 g
Sodium chlorure	5,0 g
Eau distillée	1,0 L

Faire dissoudre les ingrédients en chauffant doucement si nécessaire et ajuster le pH à 7,0± 0,2. Distribuer et stériliser à 121°C pendant 15 min.

9.2 Bouillon neutralisant Dey-Engley (D/E)

Tryptone	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Dextrose	10,0 g
Thioglycolate de sodium	1,0 g
Thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	6,0 g
Bisulfite de sodium (NaHSO_3)	2,5 g
Polysorbate (Tween ^{MD}) 80	5,0 g
Lécithine (de soja)	7,0 g
Violet de bromocrésol	0,02 g
Eau distillée	1,0 L

Faire dissoudre les ingrédients en chauffant doucement si nécessaire et ajuster le pH à $7,6 \pm 0,2$. Distribuer et stériliser à 121°C pendant 15 min.

Fin du document