



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

**LA MÉTHODE DU SYSTÈME QUALICON BAX® POUR LA  
 DÉTECTION D'*ENTEROBACTER SAKAZAKII* DANS DES ALIMENTS SÉLECTIONNÉS**

**1. APPLICATION**

Cette méthode est applicable à la détection d'*Enterobacter sakazakii*, après enrichissement, dans des aliments sélectionnés comprenant les formules pour nourrissons en poudre, les ingrédients laitiers et de soja en poudre et les échantillons environnementaux de production alimentaire.

**2. DESCRIPTION**

Le système BAX® est un instrument pratique de dépistage oui/non qui utilise la technologie de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) pour l'amplification rapide et la détection par fluorescence. Les transformateurs d'aliments et les laboratoires associés peuvent utiliser le système BAX® comme méthode rapide permettant de détecter avec précision la présence d'*Enterobacter sakazakii* dans une grande variété d'aliments. Après un préenrichissement de 20 à 22 heures et un enrichissement secondaire de trois heures, la préparation des échantillons requiert environ une heure du temps de l'utilisateur, et la procédure automatisée donne des résultats fiables dans un délai d'environ quatre heures. Les études de validation du système BAX® utilisaient une méthode d'enrichissement développée par le Nestle Research Centre. Le système BAX® est conçu pour être utilisé par un personnel de laboratoire qualifié qui suit les procédures normalisées de microbiologie.

**3. PRINCIPE**

Le système BAX® utilise la technologie de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) pour amplifier un fragment précis de l'ADN bactérien, qui est stable et non affecté par l'environnement de croissance. Ce fragment est une séquence génétique unique d'*Enterobacter sakazakii*, c'est pourquoi la méthode constitue un indicateur très fiable de la présence de cet organisme. Le système BAX® automatisé utilise ensuite la détection par fluorescence pour analyser le produit de la PCR et déterminer si les résultats sont positifs ou négatifs.

Le PCR représente un moyen puissant d'offrir rapidement des millions de copies d'un fragment précis d'ADN. Dans une application typique, on combine l'échantillon d'ADN à une polymérase, des nucléotides et des amorces spécifiques à une séquence donnée de nucléotides. Ce mélange est alors soumis à une série de cycles chronométrés de chauffage et de refroidissement. Le chauffage dénature ou sépare l'ADN en brins distincts. À mesure que le mélange refroidit, les amorces reconnaissent la séquence cible d'ADN et s'y fixent par annelage. L'ADN polymérase utilise ensuite les nucléotides pour étendre les amorces, ce qui a pour effet de créer deux copies du fragment d'ADN cible. Des cycles répétés de dénaturation, d'hybridation et d'élongation produisent des augmentations exponentielles du nombre de fragments d'ADN cibles en quelques heures à peine. Si la séquence cible n'est pas présente, il ne se produit aucune amplification détectable.

Le système BAX® simplifie ce processus en combinant les amorces, la polymérase, les nucléotides et le

témoin positif dans une seule tablette d'échantillon déjà emballée dans des tubes PCR. De plus, la détection automatisée par fluorescence permet les tests en tubes fermés, éliminant virtuellement la possibilité de contamination entraînée avec l'ADN amplifié.

#### 4 DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

#### 5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

#### 6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

- 1) Fournis avec la trousse - (n° 17720657; permettent d'effectuer 96 tests; DuPont Qualicon, téléphone : 1 800 863-6842, télécopieur : 302 695-5301)

2 sachets - Tablettes d'échantillon PCR, emballées 1 tablette par tube PCR dans 12 bandelettes de 8 tubes. Les tablettes comprennent les réactifs nécessaires à la réaction du test, ainsi qu'un témoin positif interne (ce qui évite d'avoir à exécuter une réaction CQ distincte). Les tablettes pèsent  $7,6 \pm 0,1$  mg.

1 sachet - Bouchons optiques, 12 bandelettes de 8 bouchons.

2 bouteilles - Tampon de lyse, pH de  $8,35 \pm 0,05$  à 25 °C, bouteille de 12 ml. Utiliser pour préparer le réactif de lyse.

1 flacon - Solution de protéase, flacon de 400 µL. Utiliser pour préparer le réactif de lyse.

- 2) Bouillons d'enrichissement et milieu de confirmation

- Enrichissement primaire – bouillon mLST avec vancomycine\*

Mélanger 20 g de tryptose, 5 g de lactose, 2,75 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,75 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 34,22 g de NaCl et 0,1 g de sulfate sodique de lauryle dans 1 litre d'eau distillée. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. Préparer une solution 10 mg/ml de vancomycine dans de l'eau distillée. Stériliser par filtration à l'aide d'un filtre 0,2 µm, puis transférer 1 ml de solution de vancomycine dans 1 litre de bouillon LST modifié refroidi (moins de 50 °C). Utiliser ce bouillon dans les 24 heures.

\*Vous pouvez utiliser un milieu LST disponible dans le commerce, mais vous devrez ajouter une quantité supplémentaire de NaCl (29,22 g/litre) au bouillon avant d'autoclaver.

- Enrichissement secondaire – bouillon BHI (disponible dans le commerce)

- Milieu de confirmation – Gélose nutritive (disponible dans le commerce)

- Tablettes d'alpha-glucosidase (Rosco : Diatab 50421, [site Web : www.rosco.dk](http://www.rosco.dk))

- 3) Matériel

Équipement :

- Stomacher
- Incubateur
- Autre (fourni avec la trousse de démarrage du système BAX®)
- Cycleur/détecteur avec plaques de vérification
- Poste de travail informatique avec le système d'exploitation Microsoft Windows®, le logiciel du système BAX® et une imprimante. Blocs de chauffage avec dispositif d'ancrage à thermomètres pour les tubes de lyse
- Outils de capsulage/décapsulage
- Pipettes variées pour le transfert des réactifs et des échantillons
- Blocs de refroidissement avec dispositif d'ancrage pour les tubes de lyse et les tubes PCR
- Supports pour tubes PCR

Fournitures :

- Tubes de lyse avec bouchons et supports

- Embouts de pipette
- Gants de nitrile sans poudre
- Guide d'utilisation du système BAX®

## 7. MARCHE À SUIVRE

### 7.1 Prélèvement et enrichissement des échantillons

- 7.1.1 Mélanger 25 g d'échantillon dans 225 ml de bouillon mLST avec vancomycine.
- 7.1.2 Incuber à 45 °C pendant 20 à 22 heures.
- 7.1.3 Ajouter 10 µL d'échantillon enrichi à 500 µL de bouillon de BHI (à la température de la pièce).
- 7.1.4 Incuber à 37 °C pendant trois heures.

### 7.2 Préparation de l'équipement (Se reporter au Guide d'utilisation du système BAX® pour plus de détails)

- 7.2.1 S'assurer que les blocs de refroidissement ont été réfrigérés pendant la nuit.
- 7.2.2 Faire chauffer les blocs de chauffage et s'assurer que les températures sont réglées à 37 °C et 95 °C.
- 7.2.3 Mettre en marche le cycleur/détecteur du système BAX® (effectuer la vérification, si demandé).
- 7.2.4 Créer un fichier de support.
- 7.2.5 Sélectionner RUN FULL PROCESS dans la barre de menu pour réchauffer le cycleur/détecteur.

### 7.3 Préparation des échantillons

- 7.3.1 Lyse des échantillons
  - 7.3.1.1 Placer le nombre voulu de tubes de lyse (un pour chaque échantillon et un pour le témoin) dans le support conformément au fichier de support.
  - 7.3.1.2 Préparer le réactif de lyse en pipettant 150 µL de protéase dans une bouteille de tampon de lyse de 12 ml.
  - 7.3.1.3 Ajouter 200 µL de réactif de lyse dans chaque tube de lyse.
  - 7.3.1.4 Transférer 5 µL d'échantillon enrichi au tube de lyse correspondant.
  - 7.3.1.5 Bien fermer les bouchons et chauffer les tubes à 37 °C pendant 20 minutes, puis à 95 °C pendant 10 minutes.
  - 7.3.1.6 Placer les tubes de lyse dans le bloc de refroidissement pendant au moins 5 minutes.
- 7.3.2 Préparation des échantillons pour la PCR
  - 7.3.2.1 Placer le support à tubes PCR dans le bloc de refroidissement PCR.
  - 7.3.2.2 Placer un tube PCR pour chaque échantillon dans le support.
  - 7.3.2.3 Retirer et jeter le couvercle d'une bandelette de tubes à la fois.
  - 7.3.2.4 Utiliser une pipette à canaux multiples pour transférer 50 µL de chaque échantillon lysé dans un tube PCR correspondant.
  - 7.3.2.5 Reboucher les tubes avec une nouvelle bandelette de bouchon optique et bien refermer. Répéter pour tous les échantillons.

7.3.2.6 Déposer le bloc entier de refroidissement dans le cycleur/détecteur. Les échantillons devraient rester dans le bloc de refroidissement jusqu'à ce que le cycleur/détecteur soit prêt à être chargé, mais pour une période n'excédant pas 30 minutes après l'hydratation de la tablette.

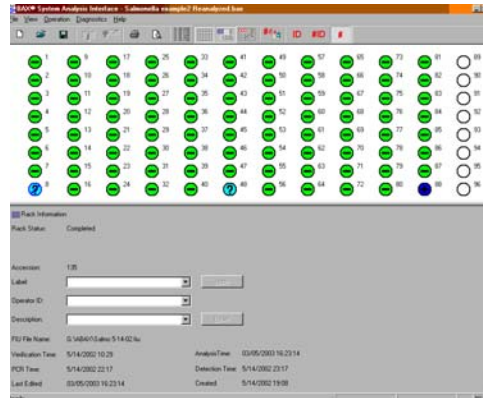
#### **7.4 Traitement des échantillons**

Suivre à l'écran les directives de l'assistant PCR pour charger vos échantillons, exécuter le programme, puis retirer vos échantillons, tel que précisé dans le Guide d'utilisation.

## 7.5 Analyse des résultats



Négatif



Positif



Indéterminé



Erreur

## 8. CONFIRMATION DES RÉSULTATS POSITIFS

- 8.1 A partir des enrichissements originaux, ensemercer des boîtes de gélose nutritive.
- 8.2 Incuber les boîtes de gélose nutritive à  $37 \pm 1$  °C pendant 24 heures, puis retirer les boîtes de l'incubateur et les placer sous la lumière pendant 4 heures à la température de la pièce.
- 8.3 Prélever jusqu'à 5 colonies jaunes et effectuer une épreuve de confirmation alpha-glucosidase de la façon suivante :
  - 8.3.1 Transférer 0,25 ml de solution saline dans un petit tube en verre.
  - 8.3.2 Suspendre 2 à 3 colonies jaunes et une tablette de diagnostic dans la solution saline en produisant des tourbillons.
  - 8.3.3 Incuber dans un bain-marie à  $37 \pm 1$  °C pendant 4 heures.
  - 8.3.4 Observer la couleur du liquide : si le liquide est jaune vif, le résultat est positif.

**REMARQUE :** Vous devriez aussi effectuer un contrôle positif *E. sakazakii* et un contrôle négatif de la solution saline stérile.

- 8.4 Si les colonies ci-dessus donnent des résultats négatifs, sélectionner jusqu'à 5 colonies blanches (*Enterobacter sakazakii* atypique) et les soumettre à une épreuve d'alpha-glucosidase.
- 8.5 Des résultats positifs à l'épreuve d'alpha-glucosidase sont considérés présumés et exigent une identification biochimique (API 20E) ou moléculaire (système RiboPrinter®) plus poussée pour confirmer la présence d'*Enterobacter sakazakii*.