



## DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

## OTTAWA

**LA MÉTHODE DU SYSTÈME QUALICON BAX® DE DUPONT POUR LA DÉTECTION DE  
*E. COLI* O157:H7 DANS LE BOEUF CRU ET LES JUS DE FRUITS****1. APPLICATION**

Cette méthode est applicable à la détection de *E. coli* O157:H7 dans le boeuf haché cru et les jus de fruits pour déterminer la conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*.

**2. DESCRIPTION**

Le système BAX® est une méthode de laboratoire rapide qui permet de détecter avec précision *E. coli* O157:H7 dans le boeuf haché cru et les jus de fruits. Le système BAX® pour *E. coli* O157:H7 permet de détecter le sérotype dans le boeuf haché cru après 8 heures utilisant le milieu du système BAX® ou 14 heures dans le bouillon de *E. coli* modifié + 20 mg/L de novobiocine, alors que dans les jus de fruits, le micro-organisme peut être détecté après 20 heures dans du bouillon de *E. coli* modifié + 20 mg/L de novobiocine (mEC+n).

Le système de dépistage de *E. coli* O157:H7 est un instrument pratique de dépistage oui/non qui utilise la technologie de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) pour l'obtention de résultats fiables 12 à 24 heures après l'échantillonnage. La procédure prend environ quatre heures après l'enrichissement et requiert environ une heure du temps de l'utilisateur. Les systèmes BAX® sont conçus pour être utilisés par un personnel de laboratoire qualifié qui suit les procédures normalisées de microbiologie.

**3. PRINCIPE**

Le système BAX® pour *E. coli* O157:H7 vise un fragment précis de l'ADN bactérien. Ce fragment de l'ADN est stable, non affecté par l'environnement de croissance et spécifique à *E. coli* O157:H7. La technologie PCR permet au système BAX® de fournir une amplification rapide et précise de l'ADN, avec des résultats qui sont disponibles environ quatre heures après l'enrichissement.

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 anelage. 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<sup>®</sup> simplifie ce processus en combinant les amorces, la polymérase, les nucléotides et le témoin positif dans une seule tablette d'échantillon déjà emballé dans des tubes PCR. De plus, la détection automatique 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° 17710611; permettent d'effectuer 96 tests; DuPont Qualicon, téléphone : 800-863-6842, télécopieur : 302-695-5301)  
2 sachets - tablettes d'échantillon PCR, emballées 1 par tube PRC dans 12 bandelettes de 8 tubes. Les tablettes comprennent les réactifs nécessaires à la réaction du test ainsi qu'au 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 , 12 mL/bouteille. Utiliser pour préparer le réactif de lyse.  
1 flacon - solution de protéase, 400 mL/flacon. Utiliser pour préparer le réactif de lyse.
- 2) Bouillon d'enrichissement  
Le milieu du système BAX<sup>®</sup> pour *E. coli* O157:H7 (numéro 17710647; 2,5 kg)  
\* Bouillon de *E. coli* modifié contenant 20 mg/L de novobiocine (mEC+n)
- 3) Matériel (fourni avec la trousse de démarrage)

##### Équipements

Cycleur/détecteur du système BAX<sup>®</sup> avec plaques de vérification  
Poste de travail informatique avec le système d'exploitation Microsoft Windows<sup>®</sup>, le logiciel du système BAX<sup>®</sup> et une imprimante  
Les blocs de chauffage pour le système BAX<sup>®</sup> avec dispositif d'ancrage pour les tubes de lyse  
Outils de capsulage/décapsulage  
Pipettes variées pour le transfert 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

- 4) Système BAX<sup>®</sup> avec le guide d'utilisation pour la détection automatisée

#### 7. MARCHE À SUIVRE

##### 7.1 Prélèvement et enrichissement des échantillons

Les échantillons de boeuf cru peuvent être préparés avec du bouillon EC modifié avec de la novobiocine (pour un enrichissement de 14 à 24 heures), ou avec le milieu du système BAX<sup>®</sup> pour *E. coli* O157:H7 (pour un enrichissement de 8 à 24 heures), selon les besoins et la quantité

de travail de votre laboratoire. Pour les jus de fruits, utiliser du bouillon EC modifié avec de la novobiocine pour des enrichissements de 14 à 24 heures.

- 7.1.1 Boeuf - Bouillon d'enrichissement *E. coli* modifié : préparer les échantillons à une dilution 1:10 dans le bouillon EC modifié + 20 mg/L de novobiocine. Incuber les enrichissements à 35 -37 °C pendant 14 à 24 heures.
- 7.1.2 Boeuf - Milieu d'enrichissement du système BAX® : préparer le volume requis de milieu du système BAX® pour *E. coli* O157:H7 selon les instructions indiquées sur l'étiquette du contenant. Ajouter le boeuf cru au bouillon préchauffé (41 à 42 °C) à une dilution 1:10. Incuber à 41-42 °C pendant 8 à 24 heures.
- 7.1.3 Jus de fruits : préparer les échantillons à une dilution 1:10 dans du bouillon EC modifié + 20 mg/L de novobiocine. Incuber les enrichissements à 35 -37°C pendant 14 à 24 heures.

## 7.2 Préparation de l'équipement

- 7.2.1 Allumer les blocs de chauffage et s'assurer que les températures sont réglées à 37°C et 95°C.
- 7.2.2 Démarrer le cycleur/détecteur tel qu'indiqué dans le *Guide d'utilisation de la détection automatisée du système BAX®*, pages II-4 à II-14.

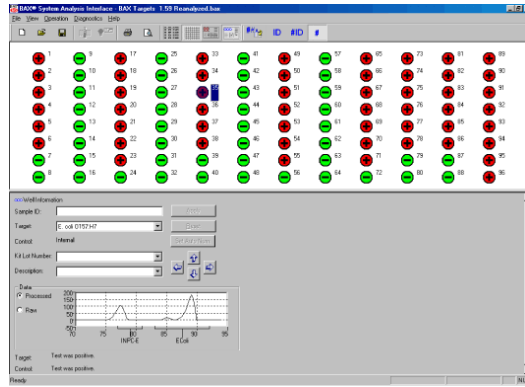
## 7.3 Traitement des échantillons





- 7.3.1 Échantillons de lyse
  - 7.3.1.1 Préparer les tubes de lyse et transférer les échantillons
  - 7.3.1.2 Placer le nombre voulu de tubes de lyse (un pour chaque échantillon et un pour le témoin) dans le support.
  - 7.3.1.3 Préparer le réactif de lyse en pipettant 150 µL de protéase dans une bouteille de tampon de lyse.
  - 7.3.1.4 Ajouter 200 µL de réactif de lyse dans chaque tube de lyse.
  - 7.3.1.5 Transférer 5 µL d'échantillon enrichi au tube de lyse correspondant.
  - 7.3.1.6 Bien fermer les bouchons après les transferts.
- 7.3.2 Effectuer la lyse
  - 7.3.2.1 Chauffer les tubes à 37 °C pendant 20 minutes, puis à 95°C pendant 10 minutes.
  - 7.3.2.2 Placer les tubes de lyse dans le bloc de refroidissement pendant au moins 5 minutes.
- 7.3.3 Préparer les tubes PCR et transférer le lysat
  - 7.3.3.1 Placer le support à tubes PCR dans le bloc de refroidissement PCR.
  - 7.3.3.2 Placer un tube PCR pour chaque échantillon dans le support.
  - 7.3.3.3 Retirer et jeter le couvercle d'une bandelette de tubes à la fois. Utiliser une pipette à canaux multiples pour transférer 50 µL de chaque échantillon de lyse dans un tube PCR correspondant. Reboucher les tubes avec une nouvelle bandelette de bouchon optique et bien refermer.
  - 7.3.3.4 Répéter pour tous les échantillons.
  - 7.3.3.5 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 Amplification de l'ADN

Suivre à l'écran les directives de l'assistant PCR pour charger vos échantillons, exécuter le programme, puis retirer vos échantillons. (Voir *Guide d'utilisation de la détection automatisée du système BAX®* pour plus de renseignements.)

## 7.5 Analyse des résultats affichés



-  Green - negative result
-  Red - positive result
-  Yellow - indeterminate result
-  Yellow with red bar - error

### Légende :

- Vert - résultat négatif**
- Rouge - résultat positif**
- Jaune - résultat indéterminé**
- Jaune avec barre rouge - erreur**

## 7.6 Confirmation des résultats positifs

Les résultats positifs doivent être confirmés par cultures conformément aux exigences de la procédure MFLP-80. Préparer les dilutions appropriées à partir des enrichissements. Ensemencer les plaques des géloses sélectives spécifiées et confirmer par des méthodes biochimiques et sérologiques.