

**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS
OTTAWA****LA MÉTHODE DU SYSTÈME QUALICON BAX[®] DE DUPONT POUR LA
 DÉTECTION DE *LISTERIA* SPP. SUR DES SURFACES DE L'ENVIRONNEMENT**

**Don Warburton et Franco Pagotto
Divisions de l'évaluation et de la recherche
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments
Localisateur postal : 2204A1
DGPSA, Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

Courriel : Don.Warburton@hc-sc.gc.ca

Courriel : Franco.Pagotto@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détection de *Listeria* spp. sur une grande variété de surfaces de l'environnement.

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 de produits alimentaires et les laboratoires associés peuvent se servir du système BAX[®] comme méthode rapide permettant de détecter avec précision *Listeria* spp. sur une grande variété de surfaces. Après la période d'enrichissement (24 ± 2 heures pour les écouvillons ou 28 ± 2 heures pour les éponges), la préparation de l'échantillon requiert environ 1,5 heure du temps de l'utilisateur et la procédure automatisée donne des résultats fiables dans un délai d'environ 4 heures. Le système BAX[®] est conçu pour être utilisé par un personnel de laboratoire qualifié qui suit des procédures normalisées de microbiologie. Le protocole de dépistage du système BAX[®] a été validé selon la méthode de culture de l'USDA-FSIS pour la détection de *Listeria* spp. dans des échantillons environnementaux.

3. PRINCIPE

Le système BAX[®] utilise 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. Le fragment est une séquence génétique unique à *Listeria* spp., ce qui constitue ainsi un indicateur très fiable de la présence de l'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.

La 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, à des nucléotides et à 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[®] 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 automatique par fluorescence permet des tests en tubes fermés, ce qui élimine la possibilité de contamination entraînée avec l'ADN amplifié.

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 ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

- 6.1. **Méthode de la PCR et du système BAX[®] pour le dépistage de la bactérie du genre *Listeria*** - (n° de cat. 17710610; permettent d'effectuer 96 tests - DuPont Qualicon, téléphone : (517) 372-9200, télécopieur : (302) 695-5301). Tablettes de PCR, emballées à raison d'une tablette par tube de 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. Bouchons optiques, 12 bandelettes de 8 bouchons. Tampon de lyse, 12 ml/bouteille, pH de $8,35 \pm 0,05$ à 25 °C. Utilisé pour préparer le réactif de lyse. Solution de protéase, 400 µl/flacon. Utilisé pour préparer le réactif de lyse.
- 6.2. **Milieu d'enrichissement du système BAX[®] pour la *Listeria*** (n° de cat. 17710672). Ajouter 60,4 g du milieu du système BAX[®] à 1 litre d'eau distillée. Passer à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes (retirer de l'autoclave dans la demi-heure qui suit la fin du cycle). Ne pas faire bouillir. pH final de $7,2 \pm 0,2$.
- 6.3. **Bouillon neutralisant D/E** - numéro de produit Difco 0819-17 ou l'équivalent.
- 6.4. **Sacs et éponges Whirl-Pak** - Sac d'échantillonnage de surfaces de l'environnement de 18 oz « Speci-Sponge[®] » de Whirl-Pak[®] (numéro de produit Nasco B01245WA ou l'équivalent).
- 6.5. **Tiges à embouts de coton** - Numéro de produit Puritan 867-WCNOGLUE ou l'équivalent.
- 6.6. **Matériel (compris dans le nécessaire de démarrage du système BAX[®])**.
 - 6.6.1. Cycleur/détecteur avec plaques de vérification.
 - 6.6.2. Poste de travail informatique avec le système d'exploitation Microsoft Windows[®], le logiciel du système BAX et une imprimante.
 - 6.6.3. Blocs de chauffage à sec avec dispositif d'ancrage et thermomètres pour les tubes de lyse.
 - 6.6.4. Outils de capsulage/décapsulage.
 - 6.6.5. Pipettes pour les transferts de réactifs et des échantillons (5 µl, 10 µl, 10 à 50 µl à

8 canaux, pipetteur à répétition).

6.6.6. Blocs de refroidissement avec dispositif d'ancrage pour les tubes de lyse et les tubes PCR.

6.6.7. Supports pour tubes PCR.

6.6.8. Tubes de lyse avec bouchons et support.

6.6.9. Embouts de pipette.

6.6.10. Gants de nitrile sans poudre.

6.6.11. *Guide d'utilisation* du Système BAX®.

7) **Matériel supplémentaire**

7.1. Incubateur capable de maintenir une température de 34 à 38 °C.

7. MARCHE À SUIVRE

7.1. **Prélèvement et enrichissement des échantillons**

7.1.1. Durant la nuit qui précède l'analyse, préchauffer le bouillon préparé d'enrichissement de *Listeria* du système all BAX® dans un incubateur à une température de 34 à 38 °C.

7.1.2. Échantillons de surface prélevés avec des éponges. Humecter les éponges avec 10 ml de bouillon neutralisant D/E et les entreposer dans un sac Whirl-Pak®.

7.1.2.1. Au moins 2 heures après la désinfection des installations et de l'équipement, prélever un échantillon en frottant une section de 10 cm X 10 cm (100 cm²) de la surface à l'aide d'une éponge.

7.1.2.2. Après avoir remis l'éponge dans le sac d'échantillonnage, ajouter 190 ml* du milieu BAX® pour la bactérie du genre *Listeria*. Homogénéiser à la main pendant 1 à 2 min.

7.1.2.3. Incuber pendant 26 à 30 heures à une température de 34 à 38 °C.

7.1.3. Échantillons de surface prélevés avec des coton-tiges. Préhumer les coton-tiges avec 0,5 ml de bouillon neutralisant (bouillon neutralisant D/E).

7.1.3.1. Au moins 2 heures après la désinfection des installations et de l'équipement, prélever un échantillon en frottant une section de 2,5 cm X 2,5 cm (6,25 cm²) de la surface à l'aide du coton-tige.

7.1.3.2. Remettre les coton-tiges dans 10 ml du milieu BAX® pour la bactérie du genre *Listeria* et tournez-les à la main pendant 1 min.

7.1.3.3. Incuber pendant 22 à 26 heures à une température de 34 à 38 °C.

7.1.4. Après la période d'incubation, effectuer une analyse à l'aide du système BAX®, comme décrite à la section 5.2.

***Note :** On peut utiliser un volume de 90 ml du milieu d'enrichissement BAX®. Cependant, une validation supplémentaire est nécessaire pour s'assurer qu'il n'y a pas de perte de rendement.

7.2. **Préparation de l'équipement (consulter le *guide d'utilisation* du Système BAX® pour de plus amples détails)**

- 7.2.1. S'assurer que les blocs de refroidissement ont été réfrigérés durant la nuit.
- 7.2.2. Faire chauffer les blocs de chauffage. S'assurer que les températures sont réglées à 55 °C et à 95 °C.
- 7.2.3. Mettre en marche le cycleur/détecteur du système BAX® (effectuer la vérification, si demandée).
- 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 avant de déposer les échantillons dans le système.

7.3. Préparation des échantillons

- 7.3.1. Lyse des échantillons
 - 7.3.1.1. Placer le nombre voulu de tubes de lyse dans le support selon le fichier de support. Préparer des contrôles positifs, négatifs et à blanc, conformément aux exigences de votre laboratoire.
 - 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 55 °C pendant 60 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. Préparer les 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 bouchons optiques 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.

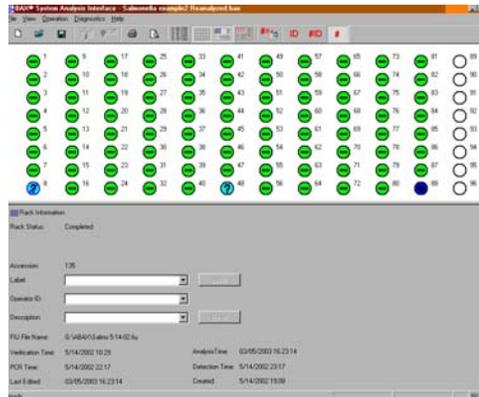
7.4. Traitement des échantillons

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

1



indéterminé

1



Signal d'erreur

1

7.6. Confirmation des résultats positifs

Les résultats positifs doivent être confirmés par cultures conformément aux exigences de la procédure MFHPB-30. Préparer les dilutions appropriées à partir des enrichissements. Ensemencer les plaques des géloses sélectives spécifiées et confirmer par des méthodes biochimiques et sérologiques.

8. Références

- 8.1 *Compendium des méthodes*. Isolement de *Listeria monocytogenes* dans tous les types d'aliments et les échantillons environnementaux. MFHPB-30, janvier 2001. Direction générale des produits de santé et des aliments, Ottawa, Santé Canada.
http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/f_index.html
- 8.2 United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples. <http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/MIg8.03.pdf>
- 8.3 U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bacterial Analytical Manual Chapter 10. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods.
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>
- 8.4 ISO: Organisation internationale de normalisation.
<http://www.iso.ch/iso/en/CatalogueDetailPage.CatalogueDetail?CSNUMBER=29315&ICS1=7&ICS2=100&ICS3=30>