



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

**LA MÉTHODE DU SYSTÈME QUALICON BAX® POUR LA  
 DÉTECTION DE *SALMONELLA* DANS UNE VARIÉTÉ D'ALIMENTS**

**1. APPLICATION**

Cette méthode est applicable à la détection de *Salmonella* dans une variété d'aliments, y compris dans la viande, la volaille, le poisson et les fruits de mer, les fruits et légumes, les produits laitiers et divers produits alimentaires.

**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 de *Salmonella* dans une grande variété d'aliments. Après un préenrichissement de 22 à 26 heures (et une régénération de trois heures pour certains types d'aliments), 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 la méthode d'enrichissement du USDA-FSIS (United States Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service) pour la viande, les volailles et les oeufs et la méthode FDA-BAM pour les autres types d'aliments. La validation a également été effectuée en utilisant les méthodes d'enrichissement ISO pour tous les aliments (voir la section 8: Méthodes de référence). 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 de *Salmonella*, 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 appariement. 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 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° 17710608; 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 PRC 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 de régénération – varient selon le type d'aliment (voir la section 7)

Bouillon d'eau peptonée tamponnée

Bouillon d'eau peptonée tamponnée + novobiocine (pour les pousses)

Bouillon lactosé

Bouillon d'infusion de cerveau et de cœur (BHI)

- 3) Matériel (fourni avec la trousse de démarrage du système BAX®)

##### 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

- 4) Guide d'utilisation du système BAX®

#### 7. MARCHE À SUIVRE

##### 7.1 Prélèvement et enrichissement des échantillons

Préparer les échantillons selon une méthode normalisée pour le type d'aliment, comme suit :

Type d'échantillon	Pré-enrichissement	Régénération
--------------------	--------------------	--------------

Viande et volaille	Mélanger 25 g d'échantillon dans 225 ml de bouillon d'eau peptonée tamponnée. Incuber à 35°C pendant 20 à 24 heures.	S/O
Oeufs	Mélanger 25 g d'échantillon dans 225 ml de bouillon d'eau peptonée tamponnée. Incuber à 35°C pendant 20 à 24 heures.	Ajouter 10 µL d'échantillon enrichi à 500 µL de bouillon de BHI (à la température de la pièce). Incuber à 37°C pendant trois heures.
Pousses	Mélanger 25 g d'échantillon dans 225 ml de bouillon d'eau peptonée tamponnée avec novobiocine. Incuber à 42°C pendant 20 à 24 heures.	Ajouter 10 µL d'échantillon enrichi à 500 µL de bouillon de BHI (à la température de la pièce). Incuber à 37°C pendant trois heures.
Fromage naturel	Mélanger 25 g d'échantillon dans 225 ml de bouillon d'eau peptonée tamponnée. Incuber à 35°C pendant 22 à 26 heures.	Ajouter 10 µL d'échantillon enrichi à 500 µL de bouillon de BHI (à la température de la pièce). Incuber à 37°C pendant trois heures.
Poisson et fruits de mer	Mélanger 25 g d'échantillon dans 225 ml de bouillon lactosé. Laisser reposer pendant 55 à 65 minutes à la température de la pièce. Ajuster le pH à $6,8 \pm 0,2$ . Incuber à 35°C pendant 22 à 26 heures.	S/O
Friandises et enrobage de friandises (y compris le chocolat)	Mélanger 25 g d'échantillon avec 225 ml de poudre de lait écrémé reconstitué. Laisser reposer pendant 55 à 65 minutes à la température de la pièce. Ajuster le pH à $6,8 \pm 0,2$ . Ajouter 0,45 ml de vert brillant et incuber à 35°C pendant 22 à 26 heures.	Ajouter 10 µL d'échantillon enrichi à 500 µL de bouillon de BHI (à la température de la pièce). Incuber à 37°C pendant trois heures.
Lait écrémé et en poudre	Mélanger 25 g d'échantillon avec 225 ml de solution aqueuse de vert brillant. Laisser reposer pendant 55 à 65 minutes à la température de la pièce. Incuber à 35°C pendant 22 à 26 heures.	Ajouter 10 µL d'échantillon enrichi à 500 µL de bouillon de BHI (à la température de la pièce). Incuber à 37°C pendant trois heures.
Autres aliments	Mélanger 25 g d'échantillon dans 225 ml du bouillon d'enrichissement approprié pour le type d'aliment conformément aux spécifications du chapitre 5 du FDA-BAM ou selon la méthode normalisée de votre laboratoire. (Consulter la section 8 : Méthodes de référence.)	Ajouter 10 µL d'échantillon enrichi à 500 µL de bouillon de BHI (à la température de la pièce). Incuber à 37°C pendant trois heures.
Alternative : tous les aliments à l'exception des pousses et du fromage naturel	Mélanger 25 g d'échantillon dans 225 ml du bouillon d'enrichissement approprié pour le type d'aliment conformément aux spécifications de la méthode ISO 6579. (Consulter la section 8 : Méthodes de référence.)	<i>(Exceptions : viande, volaille, poisson et fruits de mer)</i> Ajouter 10 µL d'échantillon enrichi à 500 µL de bouillon de BHI (à la température de la pièce). 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.

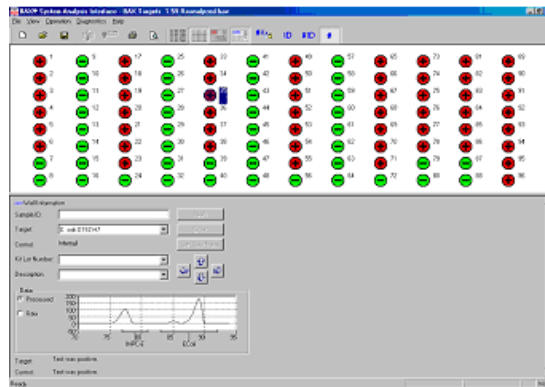
### 7.3.2 Préparer les échantillons pour la PCR

- 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 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



-  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 MFHPB-20. Ensemencer les plaques des géloses sélectives spécifiées et confirmer par des méthodes biochimiques et sérologiques.

## 8.0 Méthodes de référence

- 8.1 Santé Canada, Direction générale des produits de santé et des aliments, Direction des aliments, Bureau des dangers microbiens. *Compendium de méthodes*, volume 2 [Internet] Ottawa : The Branch; c1998. MFHPB-20. Méthodes pour l'isolement et l'identification des salmonelles dans les aliments [environ 19 écrans]. Ce document est disponible à l'adresse suivante : [http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume\\_2/f\\_mfhp2001.html](http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_2/f_mfhp2001.html)
- 8.2 Comité technique 34. Microbiologie des aliments et moulée animale-- *Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella spp.* Organisation internationale de normalisation. (ISO 6579 :2002, 4e édition). Organisation internationale des normes : Genève. Ce document est disponible à l'adresse suivante : <http://www.iso.ch/iso/fr/CatalogueDetailPage.CatalogueDetail?CSNUMBER=29315&ICS1=7&ICS2=100&ICS3=30>
- 8.3 US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. *Microbiology Laboratory Guidebook* [Internet]. Washington: The Dept; c1998 [rev 2001 January 10; cited 2003 June]. Chapitre 4, Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, and Egg Products [environ 14 écrans]. Ce document est disponible à l'adresse suivante : <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgchp4.pdf>
- 8.4 US Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. *Bacteriological Analytical Manual Online* [Internet]. Washington: The Admin; c1998 [rev 2001 October; cited 2003 June]. Chapitre 5, *Salmonella* [environ 12 écrans]. Ce document est disponible à l'adresse suivante : <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>