



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

LA MÉTHODE DU SYSTÈME QUALICON BAX® POUR LA
 DÉTECTION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS UNE VARIÉTÉ D'ALIMENTS**1. APPLICATION**

Cette méthode est applicable à la détection de *Listeria monocytogenes* dans une grande variété d'aliments, y compris les viandes crues, les viandes transformées, les fruits de mer, les fruits et légumes frais, les produits laitiers fermentés et non fermentés, les œufs et les produits à base d'œufs et les jus de fruits.

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 les *Listeria monocytogenes* dans une grande variété d'aliments. Après la période d'enrichissement primaire de 22 à 26 heures et d'enrichissement secondaire de 18 à 24 heures, la préparation de l'échantillon requiert environ une heure du temps de l'utilisateur, et la procédure automatisée donne des résultats fiables dans un délai d'environ 4 heures. Les études portant sur la validation du système BAX® utilisaient la méthode d'enrichissement du USDA-FSIS pour la viande, la volaille et les œufs; la méthode 993.12 de l'AOAC pour les produits laitiers; et la méthode FDA-BAM pour les autres types d'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 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 monocytogenes*. C'est pourquoi la méthode constitue un indicateur très fiable de la présence de *Listeria monocytogenes*. 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 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 les tests en tubes fermés, éliminant 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 ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

- 1) Fournis avec la trousse – (n° 17710609; 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, 12 ml/bouteille. Utiliser pour préparer le réactif de lyse.

1 flacon Solution de protéase, 400 ul/flacon. Utiliser pour préparer le réactif de lyse.

- 2) Bouillons d'enrichissement

Enrichissement primaire - varie selon le type d'aliments (voir la section 7)

Bouillon UVM

Bouillon Demi-Fraser

Bouillon d'enrichissement sélectif

Bouillon d'enrichissement

Bouillon de pré-enrichissement universel

Enrichissement secondaire – MOPS-BLEB

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

Équipements

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 les transferts de 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. PROCÉDURE

7.1 Prélèvement et enrichissement des échantillons

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

Type d'échantillon	Enrichissement primaire	Enrichissement secondaire
Viande crue et volaille	Mélanger 25 g de l'échantillon avec 225 ml de bouillon Demi Fraser. Incuber à 30 °C pendant 22 à 26 heures.	Ajouter 100 µL d'échantillon enrichi à 9,9 ml de bouillon préchauffé MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures.
Autre viande et volaille	Mélanger 25 g de l'échantillon avec 225 ml de bouillon UVM. Incuber à 30 °C pendant 20 à 24 heures.	Ajouter 100 µL d'échantillon enrichi à 9,9 ml de bouillon préchauffé MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures.
Poisson fumé	Mélanger 25 g de l'échantillon avec 225 ml de bouillon de pré-enrichissement universel. Incuber à 35 °C pendant 22 à 26 heures.	Ajouter 1 ml d'échantillon enrichi à 9 ml de bouillon préchauffé MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures.
Produits laitiers	Mélanger 25 g de l'échantillon avec 225 ml de bouillon d'enrichissement sélectif complet. Incuber à 30 °C pendant 48 heures.	Ajouter 100 µL d'échantillon enrichi à 9,9 ml de bouillon préchauffé MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures.
Autres aliments	Mélanger 25 g de l'échantillon avec 225 ml de bouillon d'enrichissement. Incuber à 30 °C pendant 4 heures avant d'ajouter les agents de sélection, soit l'acriflavine, l'acide nalidixique et la cycloheximide. Poursuivre l'incubation à 30 °C pendant 44 heures.	Ajouter 100 µL d'échantillon enrichi à 9,9 ml de bouillon préchauffé MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures.

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 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

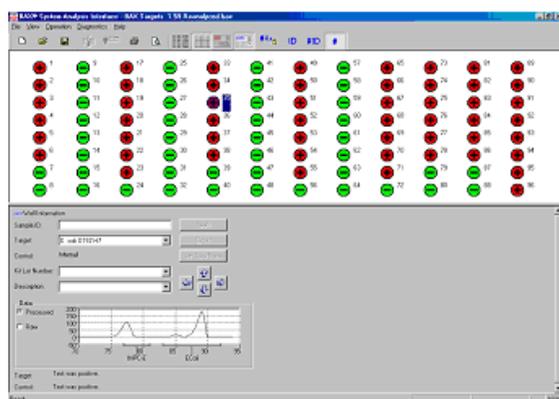
- 7.3.1 Lyse des échantillons
 - 7.3.1.1 Placer le nombre voulu de tubes de lyse (un pour chaque échantillon et un pour le témoin) dans le support selon le fichier de support.
 - 7.3.1.2 Préparer le réactif de lyse en pipettant 150 µL de protéase dans une bouteille de tampon de lyse de 12 ml.
 - 7.3.1.3 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 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 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



Légende :

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

7.6 Confirmation des résultats positifs

Les résultats positifs doivent être confirmés par cultures conformément aux exigences de la procédure MFHPB-30 (voir la section 8 : Méthodes de référence). Ensemencer les plaques des géloses sélectives spécifiées et confirmer par des méthodes biochimiques et sérologiques.

8. Méthodes de référence

- 8.1 Santé Canada, Direction générale des produits de santé et des aliments, Direction des aliments, Bureau des dangers microbiens. Compendium des méthodes d'analyse, Volume 2 [Internet] Ottawa : The Branch; c2001 [supplément, mars 2002]. MFHPB-30. Isolement de *Listeria monocytogenes* dans les aliments et les échantillons environnementaux [environ 15 écrans]. Disponible à l'adresse suivante :
http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_2/e_index.html
- 8.2 Official Methods of Analysis (2002), 17th edition. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, section 993.12.
- 8.3 US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Microbiology Laboratory Guidebook [Internet]. Washington: The Dept; c2002 [révisé le 29 avril; cité le 22 juillet 2002]. Chapter 8, Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples [environ 20 écrans]. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgchp803.pdf>
- 8.4 US Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual Online [Internet]. Washington: The Admin; c2001 [révisé le 1^{er} avril; cité le 22 juillet 2002]. Chapter 10, *Listeria monocytogenes* [environ 12 écrans]. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>