



Direction générale des produits de santé et des aliments

Ottawa

**Détection de *Salmonella* spp. dans les aliments au moyen de la trousse d'essai
du système de détection moléculaire 3M^{MC}, version 2**

**Comité des méthodes microbiologiques
Division de l'évaluation microbiologique
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments,
Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada
Localisateur postal : 2204E
Ottawa, Ontario K1A 0K9**

Communiquez avec le Comité des méthodes microbiologiques : hc.mmc-cmm.sc@canada.ca

1. Application

Cette méthode s'applique à la détection des espèces de *Salmonella* afin de déterminer la conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues* et/ou d'autres règlements fédéraux pertinents. Les résultats positifs doivent être confirmés par une méthode de culture. Cette méthode a été validée pour l'utilisation dans tous les aliments, sauf les produits à base de chocolat, les épices, les produits laitiers en poudre et les noix entières.

2. Description

Les essais de détection moléculaire 3M^{MC} recourent à l'amplification isotherme des séquences d'acide nucléique combinée à la bioluminescence pour détecter l'amplification du matériel génétique de l'organisme cible après 18 à 26 heures d'enrichissement. Les résultats positifs présomptifs sont déclarés en temps réel, tandis que les résultats négatifs sont affichés une fois l'essai terminé.

3. Principe

Les essais de détection moléculaire 3M^{MC} sont fondés sur l'amplification isotherme à médiation par boucle (LAMP) (8.1), qui amplifie l'acide nucléique (8.2, 8.3, 8.4, 8.5). Cette technologie permet au système de détection moléculaire 3M^{MC} d'offrir un processus simple de préparation des échantillons avec seulement deux étapes de transfert. La LAMP utilise plusieurs amorces qui reconnaissent des régions distinctes du gène cible de *Salmonella* spp. et fait appel à la *Bst* polymérase, une enzyme unique exerçant une activité de déplacement des brins d'ADN pour permettre une amplification isotherme rapide et continue (8.6).

Le système de détection moléculaire 3M^{MC} repose sur la technologie de la bioluminescence pour signaler l'amplification de l'ADN de l'organisme cible en temps réel. Cette technologie fait intervenir un processus enzymatique en deux étapes dans lequel les molécules de pyrophosphate, un sous-produit de l'amplification de l'ADN, sont utilisées pour générer de la lumière. Cette émission lumineuse est ensuite lue par l'instrument de détection moléculaire 3M^{MC} et signale la détection de l'organisme cible (8.7).

Cette méthode unique de détection de la bioluminescence, combinée à l'amplification à une seule température de la LAMP utilisée par le système de détection moléculaire 3M^{MC}, permet d'amplifier continuellement l'ADN cible, produisant plus de 10⁹ copies de la cible en aussi peu que 15 minutes.

4. Définition des termes

Voir l'[annexe A du volume 1](#).

5. Prélèvement des échantillons

Voir l'[annexe B du volume 1](#).

6. Matériel et équipement spécial

Note : Le superviseur du laboratoire est responsable de s'assurer que l'analyse décrite dans cette méthode soit réalisée en accord avec la Norme Internationale intitulée ISO/IEC 17025 (la version la plus récente) : «Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ».

Note: Le laboratoire est responsable de s'assurer de l'équivalence de toutes variations de formulation des milieux énumérés ici si elles sont utilisées (qu'il s'agisse d'un produit disponible sur le marché ou fabriqué à partir d'ingrédients). Il serait apprécié que les résultats d'équivalence soient transmis à l'[éditeur du Compendium de méthodes](#) en vue d'une modification de la méthode.

- 1) Instrument de détection moléculaire MDS100 3M^{MC} et trousse d'accessoires (MDS100) incluant :
 - Plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire 3M^{MC}
 - Support de bloc de refroidissement pour système de détection moléculaire 3M^{MC}
 - Plateau de bloc de refroidissement pour système de détection moléculaire 3M^{MC}
 - Outil de capsulage/décapsulage pour système de détection moléculaire 3M^{MC} – Lyse
 - Outil de capsulage/décapsulage pour système de détection moléculaire 3M^{MC} – Réactif
 - Supports pour tubes de lyse et de réactif
- 2) Trousse d'essai de *Salmonella* spp. du système de détection moléculaire 3M^{MC}, version 2 (MDA2SAL96) incluant :
 - Tubes de solution de lyse (SL) 3M^{MC} (96 – 12 bandelettes de 8 tubes)
 - Tubes de réactif pour *Salmonella* spp. 3M^{MC} (96 – 12 bandelettes de 8 tubes)
 - Bouchons supplémentaires (96 – 12 bandelettes de 8 bouchons)
 - Témoin des réactifs (TR) 3M^{MC} (16 tubes)
 - Guide de démarrage rapide

3) Milieux d'enrichissement

Les milieux énumérés ci-dessous sont offerts sur le marché et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi à l'[annexe G du volume 1](#) les formules des différents milieux.

- Eau peptonée tamponnée (EPT)

4) Matériel supplémentaire

- Support du bloc chauffant pour système de détection moléculaire 3M^{MC} (MDSHBIN)
- Témoin des matrices pour système de détection moléculaire 3M^{MC} (MDMC96) (facultatif)
- Gants sans poudre
- Embouts à barrière / à filtre stériles – adaptables à des micropipettes de 20 µL
- Sac stérile pour Stomacher
- Micropipette à canal unique de 20 µL
- Micropipette à canaux multiples à 8 canaux de 20 µL
- Poste de travail informatique
- Incubateur(s) pouvant être réglé(s) à 37 ± 1 °C et à $41,5 \pm 0,5$ °C
- Unité de bloc thermique à sec pouvant recevoir le support (15 cm × 9,5 cm ou 5,875 po × 3,75 po) et atteindre des températures de 100 °C
- Stomacher, mélangeur ou l'équivalent

<p>Note: Chaque laboratoire a la responsabilité de s'assurer que les incubateurs et les bains-marie soient maintenus aux températures recommandées. Les dispositions suivantes s'appliquent aux étapes de la méthode reliées à la croissance seulement. Lorsqu'une température ≤ 37 °C est recommandée dans le texte de la méthode, cette température peut-être $\pm 1,0$ °C, par exemple, $35 \pm 1,0$ °C. Toutefois, lorsque des températures plus élevées sont recommandées, il est impératif que la température des incubateurs ou des bains-marie ne varie pas plus de 0,5 °C, parce qu'une température plus élevée pourrait être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.</p>
--

7. Marche à suivre

L'essai doit être effectué conformément aux instructions suivantes :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, à l'exception des aliments de longue conservation, réfrigérer ou congeler les aliments comme leur conservation l'exige. Laisser dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou pendant une période et à une température empêchant la croissance ou la destruction microbienne.

7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur réception au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

7.2.1 Préparer de l'EPT stérile et acclimatée à la température ambiante avant l'utilisation.

- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié.
- 7.2.3 Mettre en marche le chauffe-bloc avec le support du bloc thermique en place, de façon qu'il puisse atteindre 100 °C avant l'analyse.
- 7.2.4 Se connecter au logiciel de détection moléculaire 3M^{MC} et allumer l'instrument de détection moléculaire 3M^{MC}.

7.3 Préparation des échantillons

Pour s'assurer d'obtenir une unité d'analyse représentative, agiter les liquides ou les matières en suspension jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Si l'unité d'échantillonnage est solide, constituer l'unité d'analyse en prélevant une portion à différents endroits de l'échantillon.

- 7.3.1 Ajouter 9 volumes (c.-à-d. 225 mL) d'eau peptonée tamponnée à la température ambiante à chaque échantillon de nourriture (habituellement 25 g) dans un sac pour Stomacher.
- 7.3.2 Pour réduire la charge de travail, on peut combiner jusqu'à 15 unités analytiques en un seul échantillon d'essai (p. ex., 375 g ou mL) tout en maintenant le rapport de dilution de 1:10.
- 7.3.3 Passer au mélangeur, au Stomacher ou au vortex afin d'obtenir un mélange homogène.
- 7.3.4 Incuber tous les échantillons pendant 18 à 26 h à 37 ± 1 °C. Incuber le kéfir pendant 18 à 26 h à $41,5 \pm 0,5$ °C.
- 7.3.5 Après avoir réalisé l'enrichissement approprié, passer à la section 7.4.

7.4 Extraction de l'ADN – étape de lyse

Note : On suggère d'utiliser un témoin matriciel (TM) 3M^{MC} par type de matrice pour déterminer si la matrice a une incidence sur les résultats de l'essai.

- 7.4.1 Laisser les tubes de solution de lyse (SL) se réchauffer à la température ambiante en plaçant le support des tubes sur le plan de travail du laboratoire pendant 2 h. Inverser les tubes bouchés pour mélanger. Il faut un tube SL pour chaque échantillon et le témoin négatif.
- 7.4.2 Les bandelettes de tubes SL peuvent être coupées au nombre de tubes désiré. Sélectionner le nombre de tubes SL individuels ou de bandelettes de 8 tubes nécessaire. Placer les tubes SL sur un support vide.
- 7.4.3 Retirer le bouillon d'enrichissement de l'incubateur et en agiter doucement le contenu.
- 7.4.4 Pour éviter la contamination croisée, décapsuler une bandelette de tubes SL à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
- 7.4.5 Transférer l'échantillon enrichi dans des tubes SL tel que décrit ci-dessous :

- 7.4.5.1 Utiliser l'outil de capsulage/décapsulage pour système de détection moléculaire 3M^{MC} – Lyse pour décapsuler une bandelette de tubes SL – une bandelette à la fois. Placer l'outil muni des bouchons sur une surface propre. On peut conserver les bouchons afin d'entreposer les tubes de lyse au besoin.
- 7.4.5.2 Transférer 20 µL d'échantillon dans un tube SL.
- 7.4.5.3 Répéter l'étape 7.4.5.2 jusqu'à ce que chaque échantillon individuel ait été ajouté à un tube SL correspondant sur la bandelette.
- 7.4.5.4 Répéter les étapes 7.4.5.1 à 7.4.5.3 au besoin, en fonction du nombre d'échantillons à analyser.
- 7.4.5.5 Une fois que tous les échantillons ont été transférés, transférer 20 µL d'EPT stérile dans un tube SL comme témoin négatif (TN) (à moins d'utiliser ses propres témoins internes).
- 7.4.6 Vérifier que la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire 3M^{MC} est de 100 ± 1 °C. Placer le support de tubes SL non couverts dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire 3M^{MC} et chauffer pendant 15 ± 1 min. Lors du chauffage, la couleur de la solution de lyse passera de rose (froide) à jaune (chaude).
- 7.4.7 Retirer le support de tubes SL non couverts du bloc de chauffage et le laisser refroidir dans le support du bloc de refroidissement pour système de détection moléculaire 3M^{MC} pendant 5 ± 1 min. La solution de lyse devrait passer du jaune au rose, lorsqu'elle est refroidie.
- 7.4.8 Retirer le support de tubes SL du support du bloc de refroidissement pour système de détection moléculaire 3M^{MC}.

7.5 Amplification et détection

- 7.5.1 Les bandelettes de tubes de réactif peuvent être coupées au nombre de tubes désiré. Sélectionner le nombre de tubes de réactif individuels ou de bandelettes de 8 tubes nécessaire. Il faut un tube de réactif pour chaque échantillon et le témoin négatif.
- 7.5.2 Placer les tubes de réactif sur un support vide.
- 7.5.3 Sélectionner 1 tube de témoin des réactifs (TR) et le placer sur le support.
- 7.5.4 Les étapes 7.5.5 à 7.5.8 décrivent la marche à suivre pour transférer chaque lysat d'échantillon dans les tubes de réactif. Transférer chaque lysat d'échantillon dans les tubes de réactif individuels en **premier**, suivis du TN. Hydrater le tube TR en **dernier**. Pour éviter la contamination croisée, décapsuler une bandelette de tubes de réactif à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.

Note : Prendre des précautions au moment de pipetter la SL, car le transfert des résidus de protéines au fond des tubes de lyse peut compromettre l'amplification.

- 7.5.5 Utiliser l'outil de capsulage/décapsulage pour système de détection moléculaire 3M^{MC} – Réactif pour décapsuler les tubes de réactif – une bandelette à la fois. Jeter le bouchon.
- 7.5.6 Transférer 20 µL de lysat d'échantillon prélevé dans la portion supérieure du liquide contenu dans le tube SL dans le tube de réactif correspondant. Incliner le tube pour éviter d'agiter les pastilles. Mélanger en pipettant délicatement de haut en bas à 5 reprises. L'utilisation d'une pipette à canaux multiples peut accélérer ce processus.
- 7.5.7 Répéter l'étape 7.5.6 jusqu'à ce que chaque lysat d'échantillon individuel ait été ajouté au tube de réactif correspondant dans la bandelette.
- 7.5.8 Recouvrir les tubes de réactif des bouchons supplémentaires prévus à cet effet et utiliser le bord arrondi de l'outil de capsulage/décapsulage pour système de détection moléculaire 3M^{MC} – Réactif en appuyant dans un mouvement de va-et-vient pour bien insérer les bouchons sur les tubes.
- 7.5.9 Répéter les étapes 7.5.5 à 7.5.8 au besoin, en fonction du nombre d'échantillons à analyser.
- 7.5.10 Lorsque tous les lysats d'échantillon ont été transférés, répéter le transfert de 20 µL de lysat de TN dans un tube de réactif pour servir de témoin négatif. Incliner le tube pour éviter d'agiter les pastilles. Mélanger en pipettant délicatement de haut en bas à 5 reprises.
- 7.5.11 Transférer **20 µL de lysat de TN dans un tube de témoin de réactif** pour servir de témoin positif. Incliner le tube pour éviter d'agiter les pastilles. Mélanger en pipettant délicatement de haut en bas à 5 reprises.
- 7.5.12 Charger les tubes recouverts d'un bouchon dans un plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire 3M^{MC} propre et décontaminé. Fermer et verrouiller le couvercle du plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire 3M^{MC}.
- 7.5.13 Vérifier et confirmer l'essai configuré dans le logiciel de détection moléculaire 3M^{MC}.
- 7.5.14 Cliquer sur le bouton *Démarrer* du logiciel et sélectionner l'instrument à utiliser. Le couvercle de l'instrument sélectionné s'ouvre automatiquement.
- 7.5.15 Placer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire 3M^{MC} dans l'instrument de détection moléculaire 3M^{MC} et fermer le couvercle pour débiter l'essai. Les résultats sont fournis dans un délai de 60 min, bien que les résultats positifs puissent être détectés plus rapidement.

7.6 Résultats et interprétation

Un algorithme interprète la courbe du signal lumineux provenant de la détection de l'amplification de l'acide nucléique. Les résultats sont analysés automatiquement par le logiciel et sont codés par couleur en fonction du résultat. Un résultat « positif » ou « négatif » est déterminé par l'analyse d'un certain nombre de paramètres uniques de la courbe. Les échantillons négatifs ne donneront pas de résultat nul, car le système et les réactifs d'amplification de la trousse de détection moléculaire *Salmonella* spp. 3M^{MC} effectuent une lecture d'unité relative de lumière (URL) « de base ». Les résultats positifs

présomptifs sont signalés en temps réel, tandis que les résultats « négatifs » et « À vérifier » seront affichés à la fin de l'analyse.

Dans le cas peu probable d'un résultat lumineux inhabituel, l'algorithme interprétera cela comme « À vérifier ». Répéter l'essai pour tous résultats « À vérifier », à partir de la section 7.4. Si le résultat est de nouveau « À vérifier », procéder à la confirmation décrite à la section 7.7.

7.7 Confirmation des résultats positifs présumés

Commencer par la mise en culture directe du milieu d'enrichissement EPT primaire positif présumé sur des géloses sélectives tel que décrit dans la méthode MFHPB-20 (8.8), en transférant en même temps une aliquote du bouillon d'enrichissement primaire aux bouillons d'enrichissement sélectifs tel qu'indiqué dans MFHPB-20. Si les résultats de la mise en culture directe confirment le résultat positif présumé, l'enrichissement sélectif peut être interrompu. Si les résultats de la mise en culture directe sont négatifs, poursuivre l'incubation des bouillons d'enrichissement, la mise en culture, l'isolement et la confirmation, comme le décrit la méthode MFHPB-20.

8. Références

- 8.1 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12):E63. 3.
- 8.2 Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T, Perkins MD, Schrenzel J. 2011. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62(1):41-48.
- 8.3 Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods.* 70(3):499-501.
- 8.4 Kiddle G, Hardinge P, Buttigieg N, Gandelman O, Pereira C, McElgunn CJ, Rizzoli M, Jackson R, Appleton N, Moore C, Tisi LC, Murray JAH. 2012. GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *BMC Biotechnology.* 12:15.
- 8.5 Plutzer J, Karanis P. 2009. Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitol Res.* 104 (6):1527-1533.
- 8.6 Nkouawa A, Sako Y, Li T, Xingwang C, Wandra T, Swastika K, Nakao M, Yanagida T, Nakaya K, Qiu D, Ito A. 2010. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia* species from humans. *J. Clin. Microbiol.* 48(9):3350-3352.
- 8.7 Gandelman OA, Church VL, Moore CA, Kiddle G, Carne CA, Parmar S, Jalal H, Tisi LC, Murray JAH. 2010. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time. *PLoS ONE.* 5(11): e14155.
- 8.8 Reid A. 2009. Isolement et identification des *Salmonella* dans les aliments (MFHPB-20) dans le [Volume 2. Le Compendium de méthodes.](#)