



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS
OTTAWA

IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE *SALMONELLA* AU MOYEN DU SYSTÈME DE LA RÉACTION
EN CHAÎNE DE LA POLYMÉRASE EN TEMPS RÉEL (PCR TEMPS RÉEL) DE WARNEX^{MD}

Stephen Shaw et Jessica Bosley
Section du développement technologique, Laboratoire d'Ottawa (Carling)
Agence canadienne d'inspection des aliments
Ottawa (Ontario) K1A 0C6

Courriel: sshaw@inspection.gc.ca
Courriel: bosleyj@inspection.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique à l'identification rapide des espèces de *Salmonella* isolées dans les aliments et autres échantillons, au moyen des techniques classiques de culture de *Salmonella*, MFHPB-20 (6.1), MFLP-75 (6.2), d'autres méthodes de la DGPSA et d'autres méthodes de détection de *Salmonella* non incluses dans le Compendium. Cette méthode peut être appliquée à l'identification présomptive des *Salmonella* dans des cultures de bouillons d'enrichissement. Si des mesures de conformité en fonction d'un produit sont prévues, et lorsque stipulé, seule la méthodologie de la DGPSA doit être employée. Elle doit aussi servir à confirmer les colonies trouvées positives par la réaction en chaîne de la polymérase en temps réel.

Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-32 datée de juin 2003.

2. PRINCIPE

Après les procédures d'enrichissement des échantillons, bouillon de pré-enrichissement (PE) pour la moulée animale, les fertilisants et les échantillons environnementaux ou bouillon sélectif d'enrichissement (SE) pour les aliments et les ingrédients alimentaires, les bouillons sont soumis à la réaction PCR en temps réel qui amplifie une séquence d'ADN spécifique unique du gène des espèces de *Salmonella*. Les amorces d'oligonucléotide utilisées pour le système PCR temps réel par fluorescence sont hautement spécifiques pour les *Salmonella* et n'amplifient pas l'ADN provenant d'autres organismes dans les conditions de la réactifs. Le fragment d'ADN ainsi amplifié a une masse moléculaire spécifique définie par les amorces et est facile à identifier par des lectures de fluorescence spécifiques aux espèces de *Salmonella*. La méthode complète, après les étapes d'enrichissement (PE, SE), permet d'identifier en 3 heures les échantillons positifs présomptifs et remplace les tests usuels de dépistage et de confirmation, ce qui constitue une économie considérable de temps, de main d'œuvre et d'argent (en coût d'analyse). Cette technique PCR s'est révélée une méthode spécifique et sensible pour l'identification des espèces de *Salmonella* à partir de divers échantillons.

Le système de détection rapide de pathogènes de Warnex^{MD} par PCR en temps réel pour *Salmonella* spp. a été validé par l'AOAC-RI et a reçu le statut de « Performance Tested Method » en 2004, Numéro du certificat : 070402.

* Warnex^{MD} est une marque de commerce de Warnex Diagnostiques Inc., 3885 boul. Industriel, Laval (Québec), Canada. H7L 4S3.
Tél (450) 663-6724, Télécopieur (450) 669-2784, site web: www.warnex.ca.

3. AMORCES SPÉCIALISÉES, RÉACTIFS, TAMPONS, MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT

NOTE: Il est de la responsabilité du superviseur du laboratoire de voir à ce que l'analyse décrite dans cette méthode soit réalisée en accord avec la Norme Internationale intitulée « ISO/IEC 17025:1999 (ou version plus récente) : Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ».

3.1 Matériel et équipement

3.1.1 Matériel et équipement spéciaux fournis

Tampon d'extraction (EX-1)
Réactif d'extraction, lyophilisé (EX-2)
Plaques d'extraction
Scellant pour plaques
Tampon de détection (DT-1)
Réactif de détection, lyophilisé (DT-2)
Plaque de détection (contenant les réactifs PCR et les amorces pré-distribués)
Bandes de bouchons optiques en plastique pour PCR

3.1.2 Matériel additionnel et équipements spéciaux requis

Thermocycleur PCR en temps réel validé par Warnex*

* Spécifications du thermocycleur :

- capacité d'analyser une microplaque « low profile » 96-puits ou 96 tubes PCR « low profile » de 0,2 ml
- capacité d'exciter des fluorophores ayant un pic d'émission autour de 485 à 520 nm.
- capacité d'exciter des fluorophores ayant un pic d'émission autour de 500 à 600 nm.

Vortex (avec adaptateurs pour plate-forme)
Centrifugeuse (avec rotor et adaptateur pour plaque)
Appareil « stomacher »
Sacs « stomacher » avec filtre
Micro-pipettes couvrant des volumes variant de 0,5 à 1000 µL et embouts stériles avec filtres

3.2 Amorces PCR, programme des cycles de température, tampons et réactifs

3.2.1 Amorces PCR

Les amorces d'oligonucléotide et les phares moléculaires sont fournis dans la trousse et leur spécificité pour *Salmonella* spp. a été vérifiée (6.3).

3.2.2 Programme des cycles de température

Les programmes des cycles de température de la réaction PCR incluent un cycle d'extraction automatisé de 15 minutes favorisant la lyse des cellules bactériennes suivi d'un procédé automatisé de détection. L'étape de la détection (amplification) est prédéterminée par le programme du thermocycleur selon les paramètres suivants :

Amplification:

1 cycle de :

Démarrage à chaud, 15 minutes, 95°C

40 cycles de
Dénaturation, 15 secondes, 94°C
Hybridation, 15 secondes, 55°C
Lecture de plaques
Extension, 15 secondes, 72°C

3.2.3 Tampons et réactifs

Tous les tampons et les réactifs sont fournis par Warnex Diagnostiques inc dans chaque trousse. Ceci inclut les réactifs d'extraction (EX-1, EX-2) et les réactifs de détection (DT-1, DT-2). Tous les autres réactifs et tampons de détection sont déjà pré-distribués dans les puits de la plaque de détection. L'eau, les micro-pipettes, les embouts de pipette et tout le matériel entrant en contact avec les échantillons ou les réactifs PCR temps réel devraient être stériles et sans ADNase et/ou autoclavés avant usage afin d'éliminer toute trace d'ADNase ou d'autres contaminants.

4. PROCÉDURE

4.1 Manipulation des échantillons

4.1.1 Les unités d'échantillonnage sont manipulées, enrichies, isolées et mises en culture selon les méthodes de Santé Canada pour l'isolement des *Salmonella* (6.1, 6.2) ou par d'autres méthodes validées pour l'isolement des *Salmonella*. Les bouillons PE et/ou SE sont par la suite prélevés et soumis à la procédure PCR selon les instructions indiquées ci-dessous. Un témoin positif constitué d'une souche de *Salmonella* cultivée dans un bouillon de culture et un témoin négatif constitué d'un organisme autre que *Salmonella* sont tous deux soumis à l'analyse avec chaque groupe d'échantillons. Un témoin négatif de stérilité des réactifs est aussi soumis à l'analyse avec chaque groupe d'échantillons.

4.2 Extraction de l'ADN

- 4.2.1 Verser le contenu de la bouteille EX-1 (bouteille de plastique souple) dans le vial EX-2 pour obtenir la solution EX-2 reconstituée. Refermer le vial et agiter par inversion pour assurer la complète dissolution du réactif déshydraté. Verser la solution EX-2 reconstituée dans un bassin pour pipette à multi-canaux.
- 4.2.2 Placer 90 µl de la solution EX-2 reconstituée dans chaque puits de la plaque d'extraction de 96 puits (un puits par extraction).
- 4.2.3 Transférer 10 µl de la suspension de cellules (étape 4.1.1) dans les puits de la plaque d'extraction à l'aide d'une pipette à canal simple, selon le schéma prédéterminé.
- 4.2.4 Sceller les puits de la plaque d'extraction avec les bandes de bouchons fournis.
- 4.2.5 Placer la plaque d'extraction dans le thermocycleur et fermer le couvercle.
- 4.2.6 Débuter le programme d'extraction du thermocycleur.
- 4.2.7 Lorsque le programme d'extraction est complété, retirer la plaque d'extraction.
- 4.2.8 Tous les microorganismes sont maintenant lysés et inactivés.
- 4.2.9 Centrifuger la plaque d'extraction pendant 5 minutes à 1,800 x g.
- 4.2.10 Le surnageant peut maintenant être utilisé pour la méthode d'amplification par PCR.

4.3 Méthode d'amplification par PCR

- 4.3.1 Verser le contenu de la bouteille DT-1 (bouteille de plastique souple) dans le vial DT-2 pour obtenir la solution DT-2 reconstituée. Refermer le vial et agiter par inversion pour assurer la complète dissolution du réactif déshydraté. Verser la solution DT-2 reconstituée dans un bassin pour pipette à multi-canaux.
- 4.3.2 Prendre une plaque de détection et la retirer de l'enveloppe.
- 4.3.3 Placer 15 µl de la solution DT-2 reconstituée dans la plaque de détection de 96 puits à l'aide d'une pipette multi-canaux.
- 4.3.4 Transférer 10 µl d'extrait d'ADN provenant de chaque puits de la plaque d'extraction dans les puits de la plaque de détection.
- 4.3.5 Sceller la plaque d'extraction en utilisant les scellants fournis et entreposer la plaque à 4°C jusqu'à ce que l'analyse soit complétée.
- 4.3.6 Sceller la plaque de détection avec les bandes de bouchons optiques pour PCR fournis.
- 4.3.7 Vortexer la plaque de détection pendant 1 minute.
- 4.3.8 Centrifuger la plaque de détection pendant 1 minute à 1,800 x g. Cette étape est nécessaire pour s'assurer que les réactifs PCR ainsi que l'échantillon d'ADN se retrouvent bien au fond des puits de la plaque PCR.
- 4.3.9 Bien fixer la plaque de détection dans l'appareil PCR. S'assurer que le puits A1 se retrouve dans le coin supérieur gauche. Fermer le couvercle de l'appareil PCR et sélectionner l'icône «Start Detection» pour débiter l'analyse.
- 4.3.10 Lorsque le programme de détection sera complété, enlever la plaque de l'appareil et en disposer.

5. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'amplicon (produit de la réaction PCR) généré à partir des séquences du gène de *Salmonella* par la présente méthode PCR est un fragment d'ADN double brin. Lors d'un résultat PCR positif, la réponse mesurée par fluorescence sera plus élevée que celle du seuil de référence exprimé par les témoins négatifs en moins de 40 cycles d'amplification de la réaction PCR. La valeur seuil de référence de la fluorescence est déterminée et établie par l'appareil PCR. Un résultat négatif n'émettra normalement pas de fluorescence. S'il y a émission de fluorescence au-dessus de la valeur seuil de référence dans les témoins négatifs, les résultats du test ne sont pas valides et l'analyse doit être refaite après avoir pris soin d'éliminer toutes les sources d'erreur possibles. Tout échantillon trouvé positif au moyen de la technique PCR de Warnex doit être confirmé en procédant à une culture, surtout si des mesures de conformité sont prévues.

6. RÉFÉRENCES

- 6.1 D'Aoust, J.-Y. et U. Purvis. 1998. MFHPB-20. Isolement et identification des *Salmonella* dans les aliments. Dans: Volume 2, *Compendium de méthodes*, Site Web: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.
- 6.2 Poppe, C. et E. D. Mann, 1998. MFLP-75. Méthode d'isolement des espèces du genre *Salmonella* sur milieu modifié semi-solide de Rappaport-Vassiliadis (MSRV). Dans: Volume 3, *Compendium de méthodes*, Site Web: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.
- 6.3 Archambault, C., Plante, D. et M.C. Gagnon, Warnex Inc. 2002. Validation de la technique PCR en temps réel pour l'identification rapide des espèces de *Salmonella* dans les aliments et autres échantillons. Communication personnelle (données non publiées).