



## DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

## OTTAWA

IDENTIFICATION DE *ESCHERICHIA COLI* DANS LES ALIMENTS AU MOYEN DU SYSTÈME SEMI-QUANTITATIF DE LA RÉACTION EN CHAÎNE DE LA POLYMÉRISE EN TEMPS RÉEL (PCR TEMPS RÉEL) DE WARNEX<sup>MC</sup>

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](mailto:sshaw@inspection.gc.ca)

Courriel : [bosleyj@inspection.gc.ca](mailto:bosleyj@inspection.gc.ca)

**1. APPLICATION**

Cette méthode s'applique à l'identification et à la quantification rapides de *Escherichia coli* (*E. coli*) isolé dans les aliments et les ingrédients alimentaires au moyen de la technique traditionnelle de culture de *E. coli*, MFHPB-19 (8.1), de la méthode Warnex<sup>MC</sup> décrite dans la section 6.1, d'autres méthodes de la DGPSA ou d'autres méthodes de détection de *E. coli* non incluses dans le Compendium. Si des mesures de conformité fondées sur les produits sont prévues, et lorsque stipulé, les méthodes officielles et la méthodologie de la DGPSA doivent être employées.

**2. PRINCIPE**

Après les procédures d'enrichissement des échantillons d'aliments et d'ingrédients alimentaires, la suspension de cellules est soumise à la réaction PCR temps réel qui amplifie une séquence d'ADN spécifique et unique d'un gène de *E. coli*. Le système PCR en temps réel utilise des amorces oligonucléotidiques hautement spécifiques à *E. coli* et n'amplifie pas l'ADN provenant d'autres organismes non-*E. coli*. 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 à *E. coli*. La méthode complète, après les étapes d'enrichissement, permet d'identifier en 3 heures les échantillons positifs présumptifs et peut remplacer les tests de dépistage habituels fournissant ainsi une économie en temps, main d'œuvre et coût d'analyse. Cette technique PCR en temps réel s'est révélée une méthode spécifique et sensible pour l'identification présumptive de *E. coli* à partir de divers échantillons d'aliments.

**2.1 Méthode semi-quantitative de Warnex**

La méthode semi-quantitative de Warnex permet l'identification de *E. coli* lorsque l'organisme est présent au-dessus ou en dessous d'une valeur seuil prédéterminée par l'utilisateur. Cette valeur seuil est généralement déterminée en fonction des limites réglementaires permises pour un aliment particulier. La méthode est basée sur la loi de Poisson, un modèle statistique qui décrit la fréquence d'événements rares. Le principe est le suivant: un échantillon d'aliment est

homogénéisé et dilué dans un tampon jusqu'au point où seulement certains des sous-échantillons obtenus de l'homogénéat contiendront une ou plus d'une cellule tandis que les autres n'en contiendront pas. Les sous-échantillons peuvent ensuite être enrichis séparément et soumis à une analyse par PCR. Les résultats enregistrés sont la présence ou l'absence du pathogène dans chacun des sous-échantillons. Des descriptions mathématiques pour la fréquence de sous-échantillons positifs et négatifs peuvent être employées pour inférer le nombre initial de cellules présentes dans l'échantillon d'aliment avant l'homogénéisation et dilution.

La taille des sous-échantillons varie selon la valeur seuil ciblée. Pour une valeur seuil particulière, un volume spécifique d'inoculum doit être utilisé pour l'inoculation de chacun des deux tubes de gélose trypticase soja (TSA) ou de bouillon trypticase soja (TSB) (se référer aux instructions du fabricant dans la notice de produit pour déterminer le volume d'inoculum). Les résultats de présence/absence des analyses PCR sont ensuite obtenus pour chaque tube et le niveau de contamination est déterminé selon le tableau 1 de la section 7, Interprétation des résultats.

Warnex est une marque de commerce de Warnex inc., 3885, boulevard Industriel, Laval (Québec), Canada, H7L 4S3. Tel : (450) 663-6724, Télécopieur : (450) 669-2784, Site web : [www.warnex.ca](http://www.warnex.ca)

### 3. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'annexe A du Volume 3.

### 4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du Volume 3.

### 5. AMORCES SPÉCIALISÉES, RÉACTIFS, TAMPONS, MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT

<p><b>Note:</b> 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 ».</p>
--

#### 5.1. Matériel et équipement

##### 5.1.1 Matériel et équipements spéciaux fournis

- Tampon d'extraction (EX-1)
- Réactif d'extraction, lyophilisé (EX-2)
- Plaques d'extraction
- Scellant pour plaques
- Bandes de bouchons pour plaques d'extraction
- Tampon de détection (DT-1)
- Réactif de détection, lyophilisé (DT-2)
- Plaques de détection (contenant les réactifs PCR ainsi que les amorces)
- Bandes de bouchons optiques pour PCR
- Notice de produit

##### 5.1.2 Matériel additionnel et équipements spéciaux requis

- Thermocycleur PCR en temps réel validé par Warnex\*
- Vortex (avec adaptateurs)
- Centrifugeuse (avec rotor et adaptateur pour plaque)
- Appareil « stomacher »

Sac « stomacher » avec filtre  
Micro-pipettes couvrant des volumes variant de 0,5 à 1000 µl et embouts stériles avec filtres

\* Spécifications du thermocycleur : capacité d'analyser une microplaque « low profile » de 96-puits ou 96 tubes PCR « low profile » de 0,2 ml, capacité d'exciter des fluorophores ayant un pic d'excitation autour de 485 à 520 nm, et capacité de détecter des fluorophores ayant un pic d'émission autour de 500 à 600 nm

## **5.2 Amorces PCR, programmes des cycles de température, tampons et réactifs**

### 5.2.1 Amorces PCR

Les amorces et les phares moléculaires sont fournis dans chaque trousse de détection et leur spécificité pour *E. coli* a été vérifiée (8.2).

### 5.2.2 Programmes des cycles de température

Les programmes des cycles de température de la réaction PCR incluent un cycle automatisé d'extraction de 15 minutes favorisant la lyse des cellules bactériennes suivi d'un programme automatisé de détection. L'étape de la détection (amplification) est prédéterminée par le programme du thermocycleur pour 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 la plaque  
Extension, 15 secondes, 72°C

### 5.2.3 Tampons et réactifs

Tous les tampons et les réactifs sont fournis par Warnex diagnostiques inc. dans chaque trousse. Ceci inclut les tampons et réactifs d'extraction (EX-1, EX-2) ainsi que les tampons et réactifs de détection (DT-1, DT-2). Tous les autres réactifs requis pour la détection des pathogènes sont déjà pré-distribués dans les puits de la plaque de détection. L'eau, les 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.

## **6. PROCÉDURE**

Préparer et enrichir les échantillons selon la méthode de culture traditionnelle pour l'isolement de *E. coli* (8.1) ou par toute autre méthode validée pour l'identification qualitative ou quantitative de *E. coli*, ou préparer et enrichir les échantillons selon la méthode Warnex décrite dans la section 6.1 pour l'identification semi-quantitative de *E. coli* au-dessus ou en dessous d'une valeur seuil prédéterminée. Prélever une portion du bouillon d'enrichissement, extraire l'ADN à l'aide du tampon d'extraction et le soumettre à la procédure PCR avec le système Warnex. La procédure Warnex est effectuée selon les instructions suivantes :

(Note : Les cycles de température du système PCR et les tampons et réactifs spécialisés sont décrits dans la Section 5).

## **6.1 Manipulation des échantillons**

- 6.1.1 Déposer 10 (11) g ou ml de l'échantillon dans un sac « stomacher » avec filtre dans 90 (99) ml d'eau peptonée.
- 6.1.2 Homogénéiser le contenu du sac en utilisant un appareil « stomacher ».
- 6.1.3 Se référer à la notice de produit pour déterminer le choix de milieu de culture (TSA, TSB) ainsi que le volume applicable d'homogénat à inoculer.
- 6.1.4 Inoculer deux (2) tubes avec le volume d'homogénat indiqué dans la notice de produit. Placer le reste de l'homogénat de l'échantillon au réfrigérateur pour une utilisation ultérieure, au cas où une confirmation s'avérerait nécessaire.
- 6.1.5 Incuber le TSA/TSB à 35°C pendant 18-24 heures, en position inclinée pour le TSA.
- 6.1.6 Après l'incubation, ajouter 2 ml d'eau peptonée stérile dans chaque tube de TSA à l'aide d'une pipette sérologique de 2 ml (ne s'applique pas au TSB).
- 6.1.7 Vortexer brièvement pour remettre les cellules en suspension.
- 6.1.8 Transférer 1 ml de chaque suspension de cellules provenant des tubes de culture dans des tubes de 2 ml à l'aide d'une pipette sérologique de 2 ml.

## **6.2 Extraction de l'ADN**

- 6.2.1 Vider le contenu de la bouteille EX-1 (bouteille de plastique souple) dans la fiole EX-2 pour obtenir la solution EX-2 reconstituée. Refermer la fiole et agiter par inversion pour assurer la dissolution complète du réactif déshydraté. Verser la solution EX-2 reconstituée dans un bassin pour pipette à multi-canaux.
- 6.2.2 Aliquoter 90 µl de la solution EX-2 reconstituée dans chaque puits de la plaque d'extraction de 96 puits (un puits par extraction).
- 6.2.3 Transférer 10 µl de la suspension de cellules de l'étape 6.1.8 (suspension TSA ou TSB) dans les puits de la plaque d'extraction à l'aide d'une micro-pipette à canal simple, selon le schéma prédéterminé.
- 6.2.4 Sceller les puits de la plaque d'extraction avec les bandes de bouchons fournies.
- 6.2.5 Placer la plaque d'extraction dans le thermocycleur et fermer le couvercle.
- 6.2.6 Débuter le programme d'extraction de l'ADN du thermocycleur.
- 6.2.7 Lorsque le programme d'extraction est complété, retirer la plaque d'extraction.
- 6.2.8 Tous les microorganismes sont maintenant lysés et inactivés.
- 6.2.9 Centrifuger la plaque d'extraction pendant 5 minutes à 1800 x g.
- 6.2.10 Le surnageant peut maintenant être utilisé pour la méthode de détection (amplification) par PCR.

## **6.3 Méthode de détection (amplification) par PCR**

- 6.3.1 Vider le contenu de la bouteille DT-1 (bouteille de plastique souple) dans la fiole DT-2 pour obtenir la solution DT-2 reconstituée. Refermer la fiole et agiter par inversion pour assurer la dissolution complète du réactif déshydraté. Verser la solution DT-2

reconstituée dans un bassin pour pipette à multi-canaux.

- 6.3.2 Prendre une plaque de détection et la retirer de l'enveloppe.
- 6.3.3 Aliquoter 15 µl de la solution DT-2 reconstituée dans la plaque de détection de 96 puits à l'aide d'une pipette multi-canaux.
- 6.3.4 Transférer 10 µl d'extrait d'ADN provenant de chaque puits de la plaque d'extraction dans les puits de la plaque de détection.
- 6.3.5 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.
- 6.3.6 Sceller la plaque de détection avec les bandes de bouchons optiques pour PCR.
- 6.3.7 Vortexer la plaque de détection pendant 1 minute.
- 6.3.8 Centrifuger la plaque de détection pendant 1 minute à 1800 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.
- 6.3.9 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 le protocole d'analyse.
- 6.3.10 Lorsque le programme de détection sera complété, enlever la plaque de l'appareil et la jeter.

## 7. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'amplicon (produit de la réaction PCR) généré 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 du 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 du seuil de référence dans les témoins négatifs, les résultats du test ne sont pas valides et l'analyse doit être reprise 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.

### 7.1 Résultat qualitatif

Un signal PCR positif indique la présence de *E. coli* dans l'échantillon analysé.

### 7.2 Résultat semi-quantitatif

L'interprétation du résultat semi-quantitatif est déterminée en fonction des résultats de présence ou absence de *E. coli* dans chaque paire de sous-échantillons inoculés au volume spécifié dans la notice de produit pour une valeur seuil ciblée. Se référer au tableau 1, Directives pour l'interprétation des résultats selon les valeurs seuils les plus communes, pour déterminer le niveau de contamination de l'échantillon analysé.

Tableau 1. Directives pour l'interprétation des résultats selon les valeurs seuils les plus communes

Valeur seuil (UFC/g)	Analyse des résultats PCR (tube 1 / tube 2)		
	Contaminé au-dessus de la limite	Contaminé en dessous de la limite	<i>E. coli</i> non-déecté
50	+/- ou +/+	n/a	-/-
100	+/+	+/-	-/-
250	+/+	+/-	-/-
500	+/+	+/-	-/-
1000	+/+	+/-	-/-

## 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Christensen, D., C. Crawford et R. A. Szabo. 2002. Dénombrement des coliformes, des coliformes fécaux et des *E. coli* dans les aliments au moyen de la méthode NPP (MFHPB-19). Volume 2, Compendium de méthodes, Santé Canada, Ottawa. Publié sur le site web de la Direction des aliments (Santé Canada) à :  
[http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index\\_f.html](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index_f.html)
- 8.2 Warnex recherche inc. 2003. Validation de la technique PCR en temps réel pour l'identification rapide de *E. coli* dans les aliments et les ingrédients alimentaires. (Données non publiées).