



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉTECTION SPÉCIFIQUE DES SOUCHES DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* À L'AIDE D'UNE RÉACTION EN CHAÎNE DE LA POLYMÉRASE (PCR) MULTIPLEX BASÉE SUR LE MARQUEUR TAXONOMIQUE *R72H* ET LES GÈNES DE L'HÉMOLYSINE *TDH* ET *TRH*

Margaret Green  
ACIA - Laboratoire de Sidney - Maladies virales et viroïdes des plantes  
8801 East Saanich Road  
Sidney (C.-B.) V8L 1H3  
Courriel : greenmg@inspection.gc.ca

Enrico Buenaventura, Christina Wong et Jennifer Liu  
ACIA - Laboratoire de Burnaby (Boundary)  
2250 Boundary Road  
Burnaby (C.-B.) V5M 4L9  
Courriel : buenaventura@inspection.gc.ca

**1. APPLICATION**

La présente méthode s'applique à l'identification rapide des souches de *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) présentes dans les aliments et l'eau de mer, ainsi que dans les échantillons environnementaux et cliniques à l'aide de la méthode MFLP-37 (8.2) de Santé Canada et d'autres méthodes équivalentes.

La méthode peut être appliquée à la caractérisation et à l'identification des colonies présumées positives isolées sur géloses sélectives ou différentielles utilisées couramment pour l'isolement de ce pathogène. Lorsqu'elle est appliquée à titre de méthode d'identification dans le cadre de méthodes quantitatives comme celle du nombre le plus probable (NPP), la méthode permet d'obtenir des résultats quantitatifs pour les souches de Vp (8.3).

**2. DESCRIPTION**

Cette technique de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) s'est révélée très spécifique et très sensible pour l'identification de *Vibrio parahaemolyticus* isolé de divers produits alimentaires et échantillons environnementaux, ainsi que d'échantillons cliniques (Buenaventura, résultats non publiés).

**3. PRINCIPE**

Après pré-enrichissement, des colonies présumées positives détectées par culture sur des géloses sélectives sont soumises à la PCR qui amplifie trois séquences d'ADN spécifiques - le fragment *r72h* du génome du Vp (identifiant l'espèce), le gène *tdh* (hémolysine directe thermostable) et le gène *trh*

(hémolysine trh). Les amorces oligonucléotidiques utilisées dans la PCR sont très spécifiques à *Vibrio parahaemolyticus* et n'amplifient pas l'ADN présent dans d'autres espèces de *Vibrio* ou d'autres organismes dans les conditions de réaction décrites. Les fragments d'ADN amplifiés par la PCR obtenus ont des tailles moléculaires déterminées, définies par les amorces, et sont facilement identifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ensemble de la procédure permet d'identifier les colonies présumées positives en moins de 4 heures et, dans la plupart des cas, peut remplacer la batterie habituelle d'essais biochimiques utilisés dans les étapes de confirmation en aval, ce qui permet de réaliser des économies considérables en matière de temps, de travail et de coût d'analyse.

La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est une procédure visée par des brevets américains appartenant à Hoffman-LaRoche.

#### **4. DÉFINITION DES TERMES**

Voir l'annexe A du volume 2.

#### **5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS**

Voir l'annexe B du volume 2.

#### **6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL**

- 1) Thermocycleur (Stratagene Robocycler ou Applied Biosystems GeneAmp 9700), ou l'équivalent
- 2) Four à micro-ondes ou plaque chauffante
- 3) Nécessaire d'électrophorèse pour gels submergés, avec peignes appropriés et bloc d'alimentation, ou l'équivalent
- 4) Transilluminateur UV à ondes courtes pour visualiser l'ADN coloré dans les gels d'agarose
- 5) Système de photo-documentation ou système d'imagerie numérique équivalent
- 6) Micropipettes réglables : 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 20 - 200 µL et 200 – 1000 µL
- 7) Embouts de pipette pour les micropipettes ci-dessus (munis obligatoirement de filtres contre les aérosols)
- 8) Bloc chauffant à agitation convenant aux microtubes à centrifuger de 1,5 mL (VWR Thermomixer), ou l'équivalent
- 9) Mélangeur Vortex
- 10) Microtubes à centrifuger - capacité de 1,5 mL, ou l'équivalent
- 11) Tubes en bande à paroi mince pour PCR, avec bouchons et/ou tubes individuels avec bouchons - 0,2 mL (200 µL), ou l'équivalent
- 12) Microcentrifugeuse
- 13) Centrifugeuse Strip-fuge pour centrifuger les tubes à PCR
- 14) Marqueur de poids moléculaire d'ADN (échelle d'ADN de 50 pb recommandée)
- 15) De plus, les produits chimiques et réactifs suivants sont nécessaires. Voir la section 9 qui contient la liste des tampons et réactifs et leurs formules :

- a) Agarose
  - b) Eau stérile ultrapure, apyrogène, exempte de nucléase, ou l'équivalent
  - c) Acide orthophosphorique (85 %, 1,679 g/mL)
  - d) Orange G ou tampon de chargement équivalent
  - e) Glycérol
  - f) dATP, dCTP, dGTP et dTTP 100 mM
  - g) Bromure d'éthidium (10 mg/mL)
  - h) EDTA
  - i) ADN polymérase *Taq* (5 unités/ $\mu$ L)
  - j)  $MgCl_2$  50 mM
  - k) Tampon PCR 10X, sans  $MgCl_2$
  - l) Tris[hydroxyméthyl]aminométhane
  - m) Chlorhydrate de Tris
  - n) Alimentation en eau désionisée pour l'électrophorèse
- 16) Témoins de culture
- a) Témoin positif : *Vibrio parahaemolyticus* (utiliser une souche de *Vibrio parahaemolyticus* bien caractérisée, comme ATCC 49529)
  - b) Témoins négatifs : Autres que Vp

## 7. MÉTHODE

Les unités d'échantillonnage sont traitées et soumises aux techniques d'enrichissement, d'isolement et de culture décrites dans la méthode MFLP-37 (8.2) ou toute autre méthode équivalente. Lorsque des colonies présumées positives sont observées sur les milieux de culture, prélever le nombre de colonies indiquées dans la méthode et soumettre chaque colonie à la PCR multiplex, laquelle est exécutée comme suit :

### 7.1 Manipulation des échantillons

Les colonies présumées positives (*V. parahaemolyticus*) isolées sur les géloses sélectives/différentielles (p. ex. TCBS) sont prélevées individuellement et soumises à la PCR multiplex comme il est indiqué ci-après. Un témoin positif constitué d'une colonie d'une souche de *V. parahaemolyticus* de laboratoire est également analysé avec chaque échantillon. On ajoute également un témoin négatif (autre que Vp) et un témoin sans matrice ou constitué d'eau.

### 7.2 Lyse des cellules

- 7.2.1 Prélever une colonie bactérienne isolée et l'inoculer dans 100  $\mu$ L d'eau stérile exempte de nucléase. Mélanger au Vortex pour remettre les cellules en suspension. Préparer simultanément les témoins positif, négatif et sans matrice (utiliser un tube non inoculé contenant 100  $\mu$ L d'eau stérile exempte de nucléase).
- 7.2.2 Chauffer les tubes à 95 °C pendant 5 minutes.
- 7.2.3 Refroidir rapidement les tubes dans un bain de glace pendant 10 minutes et entreposer au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse par PCR. Lorsque la PCR ne peut pas être exécutée en moins de 24 heures, entreposer les lysats à -20 °C.

### 7.3 Méthode de la PCR

Les amorces utilisées pour la PCR multiplex sont basées sur des séquences nucléotidiques publiées et visent trois séquences différentes du génome de *Vibrio parahaemolyticus*. Les amorces de PCR peuvent provenir du commerce (sous forme d'oligonucléotides dessalés) et n'ont pas besoin d'être purifiées par HPLC pour la présente méthode.

Nom de la paire d'amorces	Séquence de l'amorce	Taille de l'amplicon (pb)	Référence
TDH-L TDH-R	5' GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC 3' 5' TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC3'	270	Bej, 1999 (8.1)
TRH-L TRH-R	5' TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT 3' 5' CATAACAAACATATGCCCATTTCC3'	486	Bej, 1999 (8.1)
VP33 VP32 (cible R72H)	5' TGCGAATTCGATAGGGTGTTAACC3' 5' CGAATCCTTGAACATACGCAGC 3'	387 ou 320	Robert-Pillot, A. et. al., 2002 (8.5) et Lee, C-Y., et.al., 1995 (8.4)

7.3.1 Pipetter 23,0 µL de PCR Master Mix (voir la section 9.1) dans un tube à PCR à paroi mince de 0,2 mL. Ajouter 2,0 µL du lysat cellulaire ou de témoin négatif et mélanger une fois à la pipette. Bien boucher les tubes, en utilisant au besoin l'outil prévu à cet effet, de façon à obtenir l'herméticité. Mélanger au Vortex, puis centrifuger les tubes à PCR dans une centrifugeuse Strip-fuge pour bien mélanger le contenu. Maintenir les tubes sur la glace ou à 4 °C jusqu'au moment de les mettre dans le thermocycleur préchauffé et programmé.

7.3.2 Mettre les tubes dans le thermocycleur et démarrer le programme des cycles de température.

### 7.4 Programme des cycles de température

**Note :** Comme les performances du thermocycleur peuvent différer d'une marque à l'autre, il peut être nécessaire d'optimiser les paramètres des cycles de température lorsqu'un modèle autre que ceux indiqués est utilisé.

#### 7.4.1 Paramètres des cycles de température

Dénaturation initiale		5 minutes	94 °C
Amplification par la PCR	40 cycles	Dénaturation	30 secondes / 94 °C
		Renaturation	45 secondes / 58 °C
		Extension	75 secondes / 68 °C
Élongation finale		7 minutes	68 °C

7.4.2 Après la PCR, entreposer au besoin les amplicons au réfrigérateur jusqu'au moment de les soumettre à l'électrophorèse sur gel d'agarose.

## 7.5 Électrophorèse sur gel d'agarose

- 7.5.1 Préparer un gel d'agarose à 2,0 % (p/v) dans du tampon TPE (Tris-Phosphate-EDTA) 1X, du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 1X ou du tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 1X. On peut dissoudre l'agarose par agitation sur une plaque chauffante ou au four à micro-ondes pendant 1-2 minutes à la puissance maximum. Au four à micro-ondes, veiller à ce que la suspension ne soit pas soumise à une trop forte ébullition en arrêtant le four dès le début de l'ébullition et en le redémarrant ensuite et en répétant ce procédé jusqu'à dissolution complète (c.-à-d. jusqu'à ce que le liquide soit transparent et qu'il n'y ait plus de particules en suspension). Compléter le volume gravimétriquement avec de l'eau désionisée si le volume a diminué à cause de l'évaporation.
- 7.5.2 Refroidir l'agarose à 60 °C, puis ajouter suffisamment de bromure d'éthidium (EtBr) pour obtenir une concentration finale de 0,2 µg/mL. Agiter doucement le mélange en tournant et verser dans un plateau à gel. Insérer un peigne pour former les puits et laisser prendre le gel pendant environ 20 à 30 minutes.
- 7.5.3 Préparer les échantillons pour l'électrophorèse en ajoutant 3 µL d'Orange G 10X (ou un tampon de chargement équivalent) à 25 µL d'échantillon de PCR de façon à obtenir une concentration finale approximative de 1X.
- 7.5.4 Lorsque le gel d'agarose est pris, retirer le peigne et mettre le plateau contenant le gel dans l'appareil d'électrophorèse. Remplir le réservoir de tampon TPE 1X, TBE 1X ou TAE 1X (utiliser le même tampon pour la préparation du gel d'agarose et pour l'électrophorèse) renfermant du bromure d'éthidium (concentration finale de 0,2 µg/mL), de façon à recouvrir le gel (profondeur d'environ 3 à 5 mm). Pipetter doucement 15 µL d'échantillon dans les puits du gel submergé. Pipetter 7,5 µL d'une échelle d'ADN de 50 pb (0,1 µg/L) dans les puits situés de chaque côté des échantillons de PCR de façon à distinguer les produits de la PCR dans la gamme prévue pour *V. parahaemolyticus*. Les laboratoires qui utilisent des gels contenant plus de 20 puits devraient mettre des marqueurs de poids moléculaire additionnels dans les puits du milieu.
- 7.5.5 Brancher l'appareil au bloc d'alimentation en veillant à raccorder la cathode (-, noir) située à la partie supérieure (près des puits d'échantillon) et l'anode (+, rouge) située à la partie inférieure (l'extrémité) du gel. Appliquer 5 à 10 volts par cm de gel (p. ex. pour un gel de 12 x 14 cm, appliquer 70 à 140 volts) pendant le temps nécessaire à résoudre les acides nucléiques d'intérêt (p. ex. il faudra environ 1 heure pour un gel de 12 x 14 cm soumis à une tension de 75 volts).
- 7.5.6 Retirer le gel du plateau et visualiser les bandes d'ADN en les exposant aux rayons ultraviolets (ondes courtes) d'un transilluminateur. On peut documenter les résultats à l'aide d'un système d'imagerie numérique adéquat, ou toute autre méthode, de façon à faciliter l'analyse et à des fins d'archivage.

**NOTE DE SÉCURITÉ : LE BROMURE D'ÉTHIDIUM EST UN MUTAGÈNE PUISSANT. PORTER DES GANTS DE QUALITÉ MÉDICALE NON EN LATEX POUR LE MANIPULER.**

**NOTE DE SÉCURITÉ : LES RAYONS ULTRAVIOLETS PEUVENT ENDOMMAGER LES YEUX : PORTER DES LUNETTES DE SÉCURITÉ .**

## 7.6 Interprétation des résultats

Les amplicons (produits de la PCR) générés par cette méthode PCR multiplex à partir des séquences d'ADN *trh*, *r72h* et *tdh* de *V. parahaemolyticus* sont des fragments d'ADN double brin de 486, de 387 ou 320 et de 270 pb, respectivement. Par conséquent, un essai PCR positif donnera des fragments d'ADN qui apparaîtront sous forme de bandes intenses sur le gel d'agarose coloré à l'EtBr. On peut déterminer la taille moléculaire des bandes en comparant leur migration à celle d'un marqueur de tailles moléculaires d'ADN chargé sur le même gel.

Le tableau ci-après indique les résultats attendus et leur interprétation dans le cas de la PCR multiplex. Lorsque les résultats ne concordent pas avec le tableau, il faut répéter la PCR multiplex et confirmer par des essais biochimiques, comme il est indiqué dans la méthode MFLP-37 (8.2) ou une méthode équivalente.

Taille de l'amplicon			Interprétation**
486 pb	387 pb ou 320 pb	270 pb	
–	+	–	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
–	+	+	<i>Vibrio parahaemolyticus tdh</i> -positif
+	+	–	<i>Vibrio parahaemolyticus trh</i> -positif
+	+	+	<i>Vibrio parahaemolyticus tdh</i> -positif et <i>trh</i> -positif
–	–	–	Autre que <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

\*\*Lorsque les résultats ne concordent pas avec ce tableau, répéter la PCR multiplex et confirmer par des essais biochimiques.

Un échantillon de PCR négatif ne produit généralement pas de bandes visibles sur un gel d'agarose coloré à l'EtBr. Dans les cas extrêmement rares où un échantillon donne des bandes ne correspondant pas aux amplicons de 486, de 387 ou 320 ou de 270 pb (produits d'amplification non spécifiques), cet échantillon est considéré comme négatif. Toute bande correspondant aux amplicons de 486, de 387 ou 320 ou de 270 pb apparaissant dans le témoin négatif (section 7.2.1) indique des problèmes éventuels de contamination. Les réactifs sont considérés comme une source possible de contamination et doivent être jetés. Il faut analyser de nouveau les échantillons avec de nouveaux réactifs. Examiner aussi toutes les possibilités de contamination par des aérosols.

## 7.7 Confirmation biochimique (facultative)

Des galeries API 20E ou des trousse d'identification rapide équivalentes peuvent être utilisées comme solution de rechange aux milieux en tube traditionnels pour les essais biochimiques. Toutefois, certains *Vibrio* spp. ne croîtront pas dans les milieux des galeries d'essais commerciales lorsque une solution physiologique saline (NaCl 0,85 %) est utilisée comme diluant. Utiliser du NaCl 2 % comme diluant. Si les galeries commerciales ne permettent pas l'identification, poursuivre la confirmation à l'aide d'essais traditionnels en utilisant une méthode de la DGPSA (8.2) ou une méthode équivalente.

## 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Bej, A., D. Patterson, C.Brasher, M. Vickery, D. Jones, and C. Kaysner. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh*, and *trh*. *Journal of Microbiological Methods* 36: 215-225.
- 8.2 Santé Canada. 2004. Détection de *Vibrio*. Partie 1 : Détection des espèces de *Vibrio* halophiles dans les fruits de mer. Partie 2 : Détection de *Vibrio Cholerae*. In : Volume 3. Compendium des méthodes d'analyse. Site web : [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume3/mflp37\\_f.html](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume3/mflp37_f.html)
- 8.3 Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Comité du Codex sur les poissons et les produits de la pêche. Questions découlant de la FAO et de l'OMS : Évaluation des risques microbiologiques présentés par *Vibrio* spp. Vingt-sixième session, 2003. CX/FPP 03/02-Add. 1. Ålesund (Norvège), 13-17 octobre 2003.
- 8.4 Lee, C-Y, S-F. Pan, and C-H. Chen. 1995. Sequence of a Cloned pR72H Fragment and its Use for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1311-1317.
- 8.5 Robert-Pillot, A., A. Guenole, and J.M. Fournier. 2002. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization. *FEMS Microbiology Letters* 215: 1-6.

## 9. RÉACTIFS

Les tampons, l'eau désionisée, les pipettes, les embouts de pipette et tout le matériel utilisé dans la préparation des échantillons, la préparation de la PCR et les manipulations succédant à la PCR (sauf l'électrophorèse sur gel d'agarose) qui entrent en contact avec les échantillons ou les réactifs de la PCR doivent être autoclavés avant usage afin d'éliminer les ADNases et les autres contaminants. Dans le but d'éviter tout problème de contamination, il est préférable de préparer tous les réactifs dans une aire de travail réservée à cette fin.

### 9.1 PCR Master Mix

Les mélanges PCR Master Mix (sans l'ADN polymérase *taq*) peuvent être préparés bien en avance et entreposés à -20 °C jusqu'à l'utilisation (stables pendant un an); l'ADN polymérase *taq* peut être ajoutée immédiatement avant l'usage. Toutes les solutions mères doivent être également entreposées à -20 °C jusqu'à l'utilisation. Une fois dégelés, les réactifs de la PCR (sauf l'ADN polymérase *taq*) sont conservés à 4 °C. La stabilité à long terme des réactifs de la PCR au réfrigérateur est inconnue. Les laboratoires devraient diviser les réactifs en plus petits volumes de travail afin de réduire les temps d'entreposage au réfrigérateur.

Voici comment préparer la quantité exacte de PCR Master Mix requise pour une seule réaction de PCR (23 µL de Master Mix + 2 µL de matrice). En pratique, il peut être plus utile de préparer des lots de PCR Master Mix. Dans le calcul des volumes pour la préparation de lots, multiplier le volume par tube de réaction par le nombre d'échantillons à analyser (y compris les témoins) et par 1,1 (un facteur permettant à l'analyste de disposer d'un léger excès de Master Mix au cas où une réaction devrait être jetée ou répétée).

Solutions mères	Par tube de réaction
Eau stérile ultrapure exempte de nucléase, ou l'équivalent	7,22 µL
Tampon PCR 10X	2,50 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,25 µL
dNTP (dCTP, dATP, dTTP, dGTP) 10 mM	0,63 µL
Amorce VP-32 5 µM	2,50 µL
Amorce VP-33 5 µM	2,50 µL
Amorce TRH-L 5 µM	2,00 µL
Amorce TRH-R 5 µM	2,00 µL
Amorce TDH-L 5 µM	1,00 µL
Amorce TDH-R 5 µM	1,00 µL
ADN polymérase <i>Taq</i> (5 unités/µL)	0,40 µL

### 9.2 Tampon PCR 10X

Tris-HCl 200 mM (pH 8,4)

KCl 500 mM

Le tampon PCR est fourni sous forme de concentré 10X qui doit être dilué avant usage.

### 9.3 Tampon TPE 10X, tampon TBE 10X ou tampon TAE 10X

Le tampon TPE (Tris-Phosphate-EDTA) concentré 10X est préparé comme suit :

Tris[hydroxyméthyl]aminométhane	108 g
Acide orthophosphorique (85 %, 1,679 g/mL)	15,5 g
EDTA 0,5 M (pH 8)	40,0 mL

Ajouter la quantité d'eau désionisée nécessaire pour obtenir un volume final de 1 litre.

Entreposer à la température ambiante. Au moment d'utiliser, diluer 1:10 avec de l'eau désionisée pour l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Les tampons TBE (Tris-Borate-EDTA) concentré 10X et TAE (Tris-Acétate-EDTA) concentré 10X sont disponibles dans le commerce. Au moment d'utiliser, diluer 1:10 avec de l'eau désionisée pour l'électrophorèse sur gel d'agarose.

### 9.4 Orange G 10X

Eau stérile ultrapure exempte de nucléase, ou l'équivalent	60,0 mL
Glycérol	40,0 mL
Orange G	0,25 g



Stériliser et répartir en aliquotes de 1 mL dans des microtubes à centrifuger de 1,5 mL. Entreposer à long terme à -20 °C; les aliquotes dégelées doivent être entreposées à 4 °C.

**9.5 Échelle de 50 pb (marqueur de poids moléculaires d'ADN)**

Échelle d'ADN de 50 pb (1 µg/µL)	50 µL
Orange G 10X	50 µL
Eau stérile ultrapure exempte de nucléase, ou l'équivalent	400 µL