

**IDENTIFICATION DE COLONIES POSITIVES PRÉSUMPTIVES D'*ESCHERICHIA COLI* VÉROCYTOTOXIGÈNE
PAR LA RÉACTION EN CHAÎNE DE LA POLYMÉRASE**

Kim Ziebell
Laboratoire des zoonoses alimentaires
Santé Canada,
Guelph, Ontario, N1G 3W4

Courriel: Kim_Ziebell@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique à l'identification rapide d'*Escherichia coli* vérocytotoxigène (ECVT) isolé dans les aliments et autres échantillons par la méthode de la DHVDV (6.1), les méthodes de la DGPSA (6.3) ou une autre méthode de détection d'*Escherichia coli* O157 ou autres ECVT. Elle peut servir à l'identification finale des colonies positives présumptives isolées sur gélose MacConkey ou sur toute gélose couramment employée pour isoler ce pathogène à partir de cultures d'enrichissement. Si des mesures de conformité en fonction d'un produit sont prévues, et lorsque stipulé, seule les méthodes de la DGPSA peuvent être employées ou pour la confirmation de colonies positives par la réaction en chaîne de la polymérase.

2. PRINCIPE

Après la procédure d'isolement, une portion des colonies positives présumptives cultivées sur gélose MacConkey (Mac) est soumise à la réaction en chaîne de la polymérase (PCR)*, qui amplifie une séquence d'ADN spécifique du gène de la toxine. Les oligonucléotides utilisés pour amorcer la PCR sont hautement spécifiques pour les ECVT et n'amplifient pas l'ADN des organismes autres qu'ECVT. Le fragment d'ADN ainsi amplifié a une masse moléculaire spécifique définie par les amorces et est facile à identifier par électrophorèse sur gel d'agarose. La méthode permet d'identifier en 5 heures les colonies positives présumptives 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. La technique PCR s'est révélée une méthode hautement spécifique et hautement sensible pour identifier les ECVT à partir de divers échantillons.

* La firme Hoffman-Laroche détient des brevets américains pour le procédé de la réaction en chaîne de la polymérase.

3. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

- 1) Cycleur thermique (Modèle 9600, Perkin-Elmer Cetus) ou l'équivalent.
- 2) Four à micro-ondes ou plaque chauffante.
- 3) Plateau à gel submergé, réservoir de tampon et bloc d'alimentation.
- 4) Transilluminateur UV (courte longueur d'onde), pour visionner l'ADN coloré sur les gels d'agarose.
- 5) Système de photo documentation (facultatif, pour les dossiers photographiques), y compris un appareil-photo Polaroid (manuel ou fixe).

- 6) Pipetteurs, dans une gamme de volumes (0.5-1000/ μ L).
- 7) Eau stérile Milli-que (MQ) ou l'équivalent (purifiée ou distillée).

4. PROCÉDURE

Préparer et enrichir les échantillons par la méthode de la DHVDV pour l'isolement d'*Escherichia coli* vérocytotoxigène (Manuel des méthodes - Salubrité des aliments, Chapitre 6c) (6.1), la méthode de la DGPSA (MFLP-80) (6.3) ou une méthode de détection d'*Escherichia coli* O157 ou autres ECVT. Après avoir isolé des colonies positives présomptives sur gélose MacConkey ou sur d'autres géloses sélectives, on prélève séparément des portions de colonies qui sont soumises à la procédure PCR, de la manière suivante :

(Note : le mode de préparation et le nom des distributeurs des tampons et réactifs employés figurent dans les sections 7 et 8.)

4.1 Manipulation des échantillons

- 4.1.1 Les unités d'échantillonnage sont manipulées, enrichies, isolées et mises en culture par la méthode de la DHVDV (6.1), la méthode de la DGPSA (6.3) ou une autre méthode. Les colonies positives présomptives d'ECVT isolées sur les géloses sélectives (p. ex., MacConkey) sont ensuite échantillonnées et analysées par PCR de la manière indiquée ci-dessous. Un témoin positif constitué d'une souche de laboratoire d'ECVT cultivée dans un bouillon de culture (infusion coeur-cerveille) et un témoin négatif constitué d'un organisme non-ECVT sont soumis à l'analyse avec chaque groupe d'échantillons.

4.2 Lyse des cellules

- 4.2.1 Prélever une petite portion d'une colonie suspecte (il suffit de toucher légèrement la surface avec une anse ou un fil à inoculer) et mettre en suspension dans un tube microfuge stérile de 1,5 ml contenant 1 ml d'infusion coeur-cerveille. Garder un tube non inoculé comme témoin négatif (contrôle de stérilité). Incuber à 35 °C pendant la nuit.
- 4.2.2 Centrifuger les cultures à 12 000 tpm pendant 1 minute et les laver avec 1 ml de tampon FA. Resuspendre le culot dans 0,5 ml d'eau stérile Milli-Q ou l'équivalent.
- 4.2.3 Chauffer à 100 °C pendant 10 minutes et placer immédiatement sur de la glace. Centrifuger le tube à 12 000 tpm pendant 1 minute.

4.3 Méthode PCR

- 4.3.1 Ajouter 5 μ L du lysat cellulaire ou du témoin de stérilité (voir 4.2.1) à 20 μ L de mélange à réactifs PCR dans un tube microfuge de 0.2 ml.
- 4.3.2 Boucher les tubes, les placer dans le cycleur thermique et démarrer le programme. Une fois la PCR terminée, retirer les tubes et les analyser par électrophorèse sur gel d'agarose. (N.B. au besoin, on peut conserver les tubes à -20 °C pendant un ou deux jours avant de procéder à l'analyse.)

4.4 Électrophorèse sur gel d'agarose

- 4.4.1 Préparer un gel d'agarose à 1,0 % (p/v) dans un tampon TBE 1,0 X. Pour dissoudre l'agarose, chauffer pendant 1 ou 2 minutes sur une plaque chauffante, en brassant, ou dans un four à micro-ondes réglé à haute puissance. S'assurer que l'agarose est complètement dissout (liquide clair sans aucune particule en suspension).
- 4.4.2 Laisser refroidir l'agarose à environ 60 °C et le couler dans un plateau à gel dont les deux extrémités sont scellées avec du ruban adhésif. Ajouter un peigne pour former les puits et

laisser le gel se solidifier pendant environ 20 minutes.

- 4.4.3 Préparer les échantillons pour l'électrophorèse: sur un morceau de parafilm, mélanger 3 µL de colorant à 5 µL d'échantillon PCR.
- 4.4.4 Une fois le gel d'agarose solidifié, retirer le peigne et le ruban adhésif, placer le plateau avec le gel dans l'appareil à électrophorèse et remplir le réservoir avec suffisamment de tampon TBE 1,0 X pour couvrir la surface du gel. Pipetter soigneusement les échantillons (4.4.3) dans les puits du gel submergé. Pipetter un échantillon de marqueur de masse moléculaire (fragment d'ADN en incréments de 100 pb) dans un puits vide.
- 4.4.5 Relier l'appareil au bloc d'alimentation, la cathode placée au haut du gel (près des puits d'échantillons) et l'anode placée au bas (à la fin du gel). Appliquer 100 volts de tension sur le gel (environ 30 mA par gel pour les mini-gels) et faire fonctionner l'appareil pendant au moins 1 heure ou jusqu'à ce que le colorant ait migré d'environ 3 cm.
- 4.4.6 Retirer le gel du plateau et colorer l'ADN en le plaçant dans une solution de bromure d'éthidium (EtBr) (1 µg/ml) pendant 15 minutes (Note : le bromure d'éthidium étant un mutagène, porter des gants pour le manipuler). Retirer le gel de l'EtBr, le rincer rapidement à l'eau distillée et visionner les bandes d'ADN en les exposant à la lumière ultraviolette (courte longueur d'onde) sur le transilluminateur. Note : porter des lunettes de sécurité à coquilles car les UV peuvent être dommageables pour les yeux. On peut photographier les gels avec un film Polaroid 665 pour des fins d'analyse et de documentation.

5. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'amplicon (produit de la PCR) généré à partir des séquences du gène de la toxine d'ECVT par la présente méthode de PCR est un fragment d'ADN bicaténaire d'approximativement 900 paires de bases de longueur. Par conséquent, si le résultat de la PCR est positif, on obtiendra un fragment d'ADN de 900 paires de bases qui apparaîtra comme une bande foncée sur le gel d'agarose coloré à l'EtBr. On peut vérifier la masse moléculaire de la bande en comparant sa migration avec celle du marqueur de masse moléculaire (le fragment d'ADN en incréments de 100 pb) déposé sur le même gel. Si le résultat est négatif, il n'y a habituellement aucune bande visible sur le gel coloré à l'EtBr. Bien que ce soit extrêmement rare, la production de bandes ne correspondant pas à l'amplicon de 900 paires de bases (produits d'amplification non spécifiques) constitue un résultat négatif. Si une bande correspondant à l'amplicon de 900 paires de bases apparaît dans le témoin négatif ou dans le contrôle de stérilité, les résultats ne sont pas valides et il faut alors recommencer en prenant soin d'éliminer les sources possibles de contamination.

6. RÉFÉRENCES

- 6.1 Agriculture et Agroalimentaire Canada. 1994. Méthode de détection d'*Escherichia coli* producteur de vérocytotoxine dans des échantillons de viande crue ou cuite. Manuel des méthodes - Salubrité des aliments, version 2.0, Chapitre 6c.
- 6.2 Lin, Z.H., Kurazono, S., Yamasaki, S., Takeda, Y. 1993. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by Polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 37: 543-548.
- 6.3 Direction générale des produits de santé et des aliments. 2001. Les procédures de laboratoire pour l'isolement d'*Escherichia coli* O157 dans les aliments Dans: Volume 3. **Compendium de méthodes**. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>

7. AMORCES DE PCR ET PROGRAMME DES CYCLES DE TEMPÉRATURE

7.1 Amorces de PCR

Le choix des oligonucléotides utilisés comme amorces dans la PCR est fondé sur la séquence nucléique publiée (6.2). Pour amplifier un fragment d'ADN de 900 paires de bases de la toxine, il faut disposer des amorces suivantes : 5'gaa cga aat aat tta tat gt3' (LinU), et 5'ttt gat tgt tac agt cat3' (LinD)

7.2 Programme des cycles de température

Le programme des cycles de température comprend 40 cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation de l'amorce. Par conséquent, programmer le cycleur thermique selon les paramètres suivants :

40 cycles :
de dénaturation, 1 minute, 94 °C
d'hybridation, 1.5 minute, 43 °C
d'élongation, 1.5 minute, 72 °C

suivi de :
un maintien indéfini à 4°C

8. RÉACTIFS

Les tampons, l'eau MQ, les pipettes, les pointes de pipettes et tout le matériel entrant en contact avec les échantillons et les réactifs à PCR devraient être autoclavés avant usage afin d'éliminer les ADNases et autres contaminants.

8.1 Mélange de réactifs à PCR

Ce mélange de base est suffisant pour 10 tubes et son volume final est de 200 µL. Il se prépare comme suit :

H ₂ Od MQ (stérile)	137,75 µL
Tampon PCR X 10 contenant 15 mM MgCl ₂	25 µL
Amorce 20 µM LinU	7,5 µL
Amorce 20 µM LinD	7,5 µL
Mélange dNTP 10 mM (contenant 2,5mM de chacun de dCTP, dATP, dTTP, dGTP)	20 µL
Taq polymérase	1,25 µL

8.2 Tampon PCR X 10

Le tampon concentré PCR X 10 comprend 500 mM de KCl, 100 mM de tris-HCl (pH 9,0), 15 mM de MgCl₂ et de la gélatine à 0.01% (p/v) . Il est offert en vente par la firme Perkin-Elmer (n° de catalogue N808-0006).

8.3 Tampon FA

Tampon FA (Difco)	10 g
H ₂ Od	1,0 l

Dissoudre en brassant. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes.

8.4 Tampon TBE X 10

On peut se procurer le tampon TBE X 10 (Tris-Borate-EDTA) chez Sigma Chemical et contient 0,89M de Tris Borate, pH approx. de 8.3 contenant 0,02 M EDTA (no. de cat. T-4415).

Ou peut être préparé:

	Par litre
Base Trizma	108 g
Acide borique	55 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	40 ml

Porter le volume final à un litre avec de l'eau distillée.

Conserver à la température ambiante. Avant d'utiliser le tampon dans l'électrophorèse sur gel d'agarose, le diluer à 1:10 avec de l'eau distillée.

8.5 Colorant

Bleu de bromophénol à 0,10 % (p/v)
Sucrose à 50 % (p/v)
EDTA 50 mM
Urée 4M
dans l'eau distillée stérile

Conserver à 4 °C.

8.6 Marqueur de masse moléculaire

Bien que de nombreuses préparations de ces marqueurs soient offertes par divers fournisseurs, le marqueur en incréments de 100 pb offert par Invitrogen (n° de catalogue 15628-019) fournit un bon éventail de fragments d'ADN et facilite la détermination de la taille des amplicons produits par PCR. Préparer une solution stock de ce marqueur comme suit :

Mêler 900 µL d'eau MQ et 100 µL du fragment d'ADN en incréments de 100 pb. Conserver à 4,0 °C. Utiliser 5 µL de fragments d'ADN et 2 µL de colorant pour chaque gel.

8.7 Taq polymérase

Une Taq polymérase de bonne qualité est offerte en vente par Perkin-Elmer (n° de cat. N808-0160).