



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

IDENTIFICATION DES *LISTERIA MONOCYTOGENES* PRÉSUMÉS POSITIFS
DANS LES ALIMENTS ET LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX
AU MOYEN DE L'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE (ACP)

Burton W. Blais et Lucille M. Phillippe

Laboratoire d'analyse des aliments
Laboratoire d'Ottawa (Carling)
Agence canadienne d'inspection des aliments
Édifice 22, FEC
Ottawa (Ontario) Canada
K1A 0C6

bblais@inspection.gc.ca

Franco Pagotto et Nathalie Corneau

Bureau des dangers microbiens
Direction des aliments
Santé Canada
Repère postal : 2204A2
Ottawa (Ontario) Canada
K1A 0L2

Franco_Pagotto@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode permet une identification rapide de *Listeria monocytogenes* isolé dans les aliments, de même que dans les échantillons environnementaux et cliniques, au moyen des méthodes MFHPB-30 (5.5), MFLP-38 (5.6) et MFLP-74 (5.4) de Santé Canada. Elle peut s'appliquer à la caractérisation et à l'identification de colonies présumées positives qui sont isolées sur des géloses sélectives comme Palcam (PAL), Oxford (OX) et Oxford modifiée (MOX) et sur toute autre gélose régulièrement utilisée pour isoler cet agent pathogène. La méthode de la DPGS peut aussi servir à confirmer les colonies trouvées positives par amplification en chaîne par polymérase (ACP). La méthode d'amplification en chaîne par polymérase (ACP) est protégée par des brevets américains dont le titulaire est Hoffman-LaRoche. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-78 datée de septembre 1995.

2. PRINCIPE

Après pré-enrichissement et enrichissement sélectif, un certain nombre de colonies présumées positives décelées par ensemencement sur géloses sélectives sont soumises à une ACP qui amplifie une séquence d'ADN spécifique du gène codant pour la listériolysine (*hlyA*). Les oligonucléotides servant d'amorce pour l'ACP sont hautement spécifiques à *Listeria monocytogenes* et n'amplifient pas l'ADN présent chez les autres espèces de *Listeria* ni chez les autres organismes. Le fragment d'ADN *hlyA* amplifié qui en résulte a une taille moléculaire spécifique définie par les amorces et est facilement identifié par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette méthode permet d'identifier les colonies présumées positives en quatre heures et, dans la plupart des cas, peut remplacer la gamme habituelle de tests biochimiques et d'épreuves de confirmation, ce qui représente des économies considérables de temps, de travail et d'argent. La technique d'ACP s'est révélée hautement spécifique et sensible pour l'identification de *L. monocytogenes* (5.1) isolé dans divers produits, y compris les produits laitiers, les oeufs, le fromage et les échantillons environnementaux (5.2).

3. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

- 1) Thermocycleur
- 2) Four à micro-ondes ou plaque chauffante
- 3) Support de coulage de gel et réservoir à tampon, appareil d'alimentation et mini-peigne approprié
- 4) Table lumineuse à rayons UV à ondes courtes (transilluminateur) pour visualiser l'ADN coloré dans les gels d'agarose
- 5) Système de photodocumentation (facultatif, pour les archives photographiques), y compris un appareil photo Polaroid (portatif ou fixe), un dispositif paralumière et un film Polaroid 667
- 6) Micropipettes de capacité réglable : 0,5-10 µl, 10-100 µl, 200-1 000 µl
- 7) Embouts de micropipettes (avec filtre)
- 8) Bloc chauffant pouvant contenir des tubes à centrifuger de 1,5 ml
- 9) Agitateur Vortex
- 10) Tubes à centrifuger de 1,5 ml ou l'équivalent
- 11) Tubes à centrifuger de 0,2 ml (200 µl) ou l'équivalent
- 12) ADN de taille moléculaire prédéterminée
- 13) En outre, il faut avoir sous la main les produits chimiques et les réactifs indiqués ci-dessous. Voir la section 6 pour la liste des tampons, des réactifs et de leur composition.
 - Agarose
 - Acide borique
 - Bleu de bromophénol
 - dATP
 - dCTP
 - dGTP
 - dTTP
 - Bromure d'éthidium
 - EDTA
 - ADN-polymérase *Taq*
 - MgCl₂
 - KCl
 - Sucrose
 - Tampon ACP 10X
 - Triton X-100
 - Tris[hydroxyméthyl]aminométhane (p. ex., base Trizma^{MD} de Sigma)
 - Huile minérale (facultative – selon la méthode appliquée)

4. MARCHE À SUIVRE

Préparer et enrichir les échantillons d'aliments selon la méthode MFHPB-30 (5.5), MFLP-38 (5.6) ou MFLP-74 (5.4) pour isoler *Listeria monocytogenes*. Une fois que l'on peut observer des colonies présumées positives dans les milieux d'ensemencement (les colonies typiques sont décrites à la section 6 de la méthode MFHPB-30), il faut prélever un certain nombre de colonies. Chacune d'entre elles est soumise à une ACP selon les instructions suivantes :

4.1 Manipulation des échantillons

Les échantillons sont traités et soumis à l'enrichissement, à l'isolement et à l'ensemencement selon la méthode MFHPB-30, MFLP-38 ou MFLP-74. Les colonies présumées positives (de *L. monocytogenes*) isolées sur géloses sélectives (p. ex., PAL, OX ou MOX) sont ensuite prélevées individuellement et soumises à une ACP selon les indications ci-dessous. Un témoin positif consistant en une colonie ou une culture en bouillon (bouillon trypticase-soja) d'une souche de laboratoire de *L. monocytogenes* est également traité avec chaque série d'échantillons.

4.2 Lyse cellulaire

- 4.2.1 Prélever une petite partie de la colonie suspecte (toucher légèrement la surface au moyen d'une anse ou d'une aiguille) et mettre en suspension dans un tube à centrifuger stérile de 1,5 ml contenant 50 µl de tampon d'ACP 1 X. Pour le témoin négatif, utiliser un tube contenant 50 µl de tampon ACP 1 X sans cellules.
- 4.2.2 Ajouter 50 µl de Triton X 100 à 2 % (p/v) aux tubes contenant les suspensions de cellules ou le témoin négatif, et mélanger avec un agitateur Vortex.
- 4.2.3 Incuber à 100 °C pendant 10 minutes. Laisser refroidir à la température ambiante et centrifuger les tubes à 2 000 tr/min pendant quelques secondes.

4.3 Amplification en chaîne par polymérase (ACP)

Le choix des oligonucléotides servant d'amorces pour l'ACP repose sur la séquence de nucléotides publiée du gène *hlyA* (5.3). Pour l'amplification d'un fragment d'ADN de 730 pb provenant du gène *hlyA*, la séquence de l'amorce requise est la suivante : 5'-CATTAGTGGAAAGATGGAATG-3' (amorce A) et 5'-GTATCCTCCAGAGTGATCGA-3' (amorce B). Il n'est pas nécessaire que les amorces d'ACP soient d'un haut niveau de pureté. Elles peuvent être synthétisées au moyen d'un système approprié de synthèse des oligonucléotides en suivant les instructions du fabricant. La synthèse des oligonucléotides d'amorce peut également être confiée en sous-traitance à une université ou à une entreprise de biotechnologie ayant des compétences spécialisées dans le domaine.

- 4.3.1 Ajouter 5 µl de lysat cellulaire ou de témoin négatif à 44,5 µl de mélange à réaction ACP (6.1) dans un tube à centrifuger qui permet l'utilisation d'un thermocycleur et d'un agitateur Vortex.
- 4.3.2 Facultatif :

Si le thermocycleur n'est pas doté d'un couvercle chauffant, ajouter deux gouttes (100 µl) d'huile minérale stérile dans chaque tube et mettre deux gouttes d'huile minérale dans chaque puits du thermocycleur.
- 4.3.3 Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme de cycles de température.

4.4 Programme de cycles de température

Note : Les caractéristiques de performance pourraient différer entre les modèles de thermocycleur. Il pourrait donc falloir optimiser les paramètres du programme en fonction du modèle.

Note : Le nombre d'unités enzymatiques requises pourrait varier selon le type d'ADN-polymérase *Taq* utilisé. Il faut suivre les instructions du fabricant.

Note : Si l'on utilise de l'ADN-polymérase *Taq* pour le démarrage à chaud, il faut suivre le protocole du fabricant au lieu de la méthode de démarrage à chaud manuel.

4.4.1 Voici un exemple des paramètres d'un programme type de cycles de température :

Version a	Version b ^{a,b}
Méthode de « démarrage à chaud » manuel... 10 minutes, 80 °C	Utilisation d'ADN-polymérase <i>Taq</i> pour le « démarrage à chaud » (ou d'autres enzymes <i>Taq</i> à activité différée)
a) dénaturation... 5 minutes, 94 °C	a) dénaturation... 10 minutes, 94 °C
b) ajout de 0,5 unité d'ADN-polymérase <i>Taq</i>	b) ajout de 0,5 unité d'ADN-polymérase <i>Taq</i>
c) dénaturation...3 minutes, 94 °C	c) dénaturation...3 minutes, 94 °C
d) suivie de 30 cycles de : dénaturation...1 minute, 94 °C attachement...1 minute, 55 °C extension.....2 minutes, 72 °C	d) suivie de 30 cycles de : dénaturation...1 minute, 94 °C attachement...1 minute, 55 °C extension.....2 minutes, 72 °C
e) suivis d'une : extension finale... 2 minutes, 72 °C	e) suivis d'une : extension finale...2 minutes, 72 °C

Note^a : Si l'on utilise de l'ADN-polymérase *Taq* pour le démarrage à chaud (version b), il pourrait falloir optimiser le protocole (surtout les températures de l'attachement) afin de reproduire les conditions découlant de l'application du protocole standard (version a).

Note^b : Dans la version b, il faut utiliser un tube de 0,2 ml. Un volume typique de réaction comprend 22,5 ou 45 µl du mélange de réaction ACP avec 2,5 ou 5 µl de matrice, respectivement.

- 4.4.2 Si l'on utilise de l'huile minérale (4.3.2), il faut soigneusement insérer l'embout de la pipette sous la couche d'huile minérale.
- 4.4.3 Remettre le tube dans l'appareil immédiatement après l'ajout de l'enzyme *Taq*.
- 4.4.4 Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque ajout d'enzyme *Taq*.
- 4.4.5 Une fois l'ACP terminée, enlever les tubes et en analyser le contenu par électrophorèse sur gel agarose. S'il est impossible d'effectuer l'analyse immédiatement, les tubes peuvent être conservés à -20 °C.

4.5. Électrophorèse sur gel d'agarose

- 4.5.1 Préparer du gel d'agarose à 1,2 % (p/v) dans du tampon 0,5 X TBE (Tris-Borate-EDTA). Il est possible de dissoudre l'agarose en mélangeant la solution sur une plaque chauffante ou en la plaçant au four à micro-ondes pendant une à deux minutes à puissance élevée. S'assurer que l'agarose est entièrement dissoute (c.-à-d., liquide limpide, exempt de particules en suspension). En cas d'évaporation, ajouter du tampon 0,5 X TBE pour ramener le volume au niveau voulu.
- 4.5.2 Laisser l'agarose refroidir à 50°C (10 minutes) puis la verser dans un support à gel. Ajouter le peigne pour la formation des puits et laisser le gel solidifier pendant environ 30 min.

- 4.5.3 Préparer les échantillons pour l'électrophorèse : dans des tubes à centrifuger propres, mélanger 5 µl de colorant marqueur avec 10 µl d'échantillons ACP. Si l'on utilise de l'huile, il faut prélever l'échantillon sous la couche d'huile. L'embout de la pipette doit être essuyé avec un papier mouchoir après le prélèvement.
- 4.5.4 Une fois le gel d'agarose solidifié, enlever le peigne et placer le support à gel dans l'appareil d'électrophorèse. Remplir le réservoir avec du tampon 0,5 X TBE en quantité suffisante pour immerger le gel (profondeur de 5 mm). Doucement, pipeter 10 à 15 µl (4.5.3) dans les puits du gel submergé. Pipeter un échantillon d'ADN de taille moléculaire prédéterminée (p. ex., un échantillon qui permettra la différenciation des produits de l'ACP dans la plage prévue pour *L. monocytogenes*) dans un puits vide.
- 4.5.5 Brancher l'appareil à la source d'alimentation, la cathode (-, noir) placée en dessus (c.-à-d. près des puits) et l'anode (+, rouge) en dessous (c.-à-d. au bas) du gel. Appliquer de 80 à 100 volts par gel (environ 30 mA) et laisser fonctionner l'appareil pendant environ 1 heure ou jusqu'à ce que le colorant de repérage arrive environ aux deux tiers du gel.
- 4.5.6 Retirer le gel du support et colorer l'ADN en plaçant le gel dans une solution de bromure d'éthidium (EtBr, 10 µl/ml) pendant 15 minutes. Retirer le gel de la solution d'EtBr avec une cuillère à gel, le rincer rapidement sous l'eau du robinet et examiner les bandes d'ADN en exposant le gel à une source de lumière ultraviolette (de courte longueur d'onde) au moyen d'un transilluminateur. On peut photographier les gels à l'aide d'un film Polaroid 667 ou par d'autres méthodes appropriées pour faciliter l'analyse et pour les besoins de l'archivage.

Note : LE BROMURE D'ÉTHIDIUM EST UN MUTAGÈNE PUISSANT. UTILISER DES GANTS DOUBLES POUR LE MANIPULER.

Note : LES RAYONS UV PEUVENT ENDOMMAGER LES YEUX : PORTER DES LUNETTES PROTECTRICES.

4.6 Interprétation des résultats

L'amplicon (produit de l'ACP) provenant des séquences du gène *hlyA* de *L. monocytogenes* est un fragment d'ADN de l'échelle de 730 pb de longueur. Par conséquent, une épreuve ACP positive donnera un fragment d'ADN de 730 pb qui apparaîtra sous forme de bande très nette sur le gel d'agarose coloré à l'EtBr. La taille moléculaire de la bande peut être vérifiée en comparant sa migration à celle de l'ADN de taille moléculaire prédéterminée ayant parcouru le même gel. Normalement, une épreuve ACP négative ne donnera pas de bande visible sur le gel d'agarose coloré à l'EtBr. Dans les cas extrêmement rares où un échantillon a donné des bandes qui ne correspondent pas à un amplicon de 730 pb (produits d'amplification non spécifiques), l'échantillon est considéré comme négatif. Toute bande correspondant à l'amplicon 730 pb produite par le témoin négatif (4.2.1) indique un problème de contamination provenant du Triton X-100, de l'huile minérale, du mélange à réaction ACP ou de bactéries en aérosol. Les réactifs susmentionnés sont alors tenus pour des sources possibles de contamination et doivent être jetés. Il faut analyser de nouveau les échantillons avec de nouveaux réactifs. Il faut aussi examiner toutes les sources possibles de contamination par aérosol.

5. RÉFÉRENCES

- 5.1 Blais, B.W. et L.M. Phillippe. 1993. A simple RNA probe system for analysis of *Listeria monocytogenes* polymerase chain reaction products. Appl. Environ. Microbiol., **59**: 2795-2800.
- 5.2 Blais, B.W. et L.M. Phillippe. 1994. Applicabilité de l'amplification enzymatique à *Listeria monocytogenes* dans le laboratoire d'analyse courante. Objectif salubrité, Bulletin sur les toxi-infections alimentaires, n° 32. Agriculture et Agroalimentaires Canada, Ottawa.

- 5.3 Mengaud, J., M. Vicente, J. Chenevert, J.M. Pereira, C. Geoffroy, B. Gicquel-Sanze, F. Baquero, J. Perez-Diaz et P. Cossart. 1988. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, 56: 766-772.
- 5.4 Pagotto, F., E. Daley et J. Farber. 2002. Dénombrement de *Listeria monocytogènes* dans les aliments. *Compendium de méthodes*, volume 3 (MFLP-74). <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>
- 5.5 Pagotto, F., E. Daley, J. Farber et D. Warburton. 2001. Isolement de *Listeria monocytogenes* dans tous les types d'aliments et les échantillons environnementaux (MFHPB-30). *Compendium de méthodes*, volume 2. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.
- 5.6 Warburton, D., A. Boville. 2001. Détection des *Listeria* spp. dans les aliments et les échantillons environnementaux (MFLP-38). *Compendium de méthodes*, volume 3. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.

6. RÉACTIFS

Les tampons, l'eau distillée, les pipettes, les embouts de pipettes et d'autres fournitures qui viennent en contact avec les échantillons ou avec les réactifs d'ACP doivent être stérilisés à l'autoclave avant usage afin d'éliminer toute DNase et tout autre contaminant. Pour éviter les problèmes de contamination, tous les réactifs devraient être préparés dans une hotte laminaire qui n'a jamais été exposée au *L. monocytogenes* ou aux produits de l'ACP.

6.1 Mélange pour ACP

Les mélanges à réaction ACP peuvent être préparés et des aliquots de 44,5 µl, distribués d'avance dans des tubes à centrifuger de 0,2 ml et stockés à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation (peuvent se conserver jusqu'à un an). Les solutions-mères peuvent également être stockées à -20°C jusqu'au moment de l'emploi. La formule suivante permet de préparer des tubes d'amplification individuels de 44,5 µl, bien que dans la pratique, il soit plus utile de préparer d'avance une grande quantité équivalant à 100 amplifications, puis de mettre des aliquots de 44,5 µl dans des tubes individuels.

<u>Solutions-mères</u>	<u>par tube d'amplification</u>
H ₂ O distillée (stérile)	32,5 µl
Tampon d'ACP 10 X (section 7.2)	5,0 µl
MgCl ₂ , 25 mM	4,0 µl
Amorce A, 100 µM	0,5 µl
Amorce B, 100 µM	0,5 µl
dNTP (dCTP, dATP, dTTP, dGTP), 20 mM	0,5 µl chacun
Volume final	44,5 µl

6.2 Tampon 10 X pour ACP (disponible dans le commerce; accompagne souvent la solution *Taq*)

Le tampon pour ACP concentré 10 fois comprend habituellement 500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl (pH 9,0) et du Triton X-100 à 1 % (p/v).

6.3 Triton X-100

Est préparé sous forme de solution à 2 % (p/v) avec de l'eau distillée stérile. Conserver à la température ambiante.

6.4 Huile minérale

Stériliser l'huile minérale à l'autoclave dans une bouteille de verre (il est normal que l'huile se brouille en refroidissant.) Préparer des aliquots de 1 ml dans des tubes à centrifuger stériles de 1,5 ml. Conserver à la température ambiante.

6.5 Tampon TBE 5 X (disponible dans le commerce)

Le tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) concentré 5 fois se prépare comme suit :

	<u>par litre</u>
Base Trizma	54,0 g
Acide borique	27,5 g (pH final de 8,4)
EDTA, 0,5 M*	20,0 ml

Ajouter de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1 litre.

* (EDTA 0,5 M = 19,01 g d'EDTA par 100 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 8,0 avec du HCl)

Conserver à la température ambiante. Au moment de l'utilisation, diluer à raison de 1:10 avec de l'eau distillée pour l'électrophorèse sur gel d'agarose.

6.6 Colorant de repérage (disponible dans le commerce)

Bleu de bromophénol, 0,25 % (p/v) (ou xylène cyanol FF, 0,25 %)
Sucrose, 40 % (p/v)
Eau distillée stérile
Conserver à 4°C

6.7 ADN de taille moléculaire prédéterminée

Les différents fournisseurs offrent sur le marché de nombreuses préparations d'ADN de taille moléculaire prédéterminée. Il faut suivre les instructions du fabricant pour chaque préparation. Les préparations peuvent être réparties en petites portions (p. ex., 100 µl) dans des tubes Eppendorf stériles et conservées à -20 °C jusqu'à un an.

6.8 Tampon TE (Tris-EDTA)

Ce tampon se prépare en mélangeant 1,0 ml de Tris-HCl M (pH 8,0) et 1,0 ml d'EDTA 100 mM (pH 8,0) dans 98 ml d'eau distillée. La solution est ensuite stérilisée à l'autoclave à 121 °C, pendant 15 minutes, et conservée à la température de la pièce.

6.9 ADN-polymérase Taq

Il faut parfois diluer les solutions enzymatiques-mères pour obtenir une dilution de travail. Le fabricant de la solution enzymatique fournit le diluant. Voir les instructions du fabricant. Cette dilution de travail peut être conservée à -20 °C jusqu'à un an.

