

Protocole de détection de la *Salmonelle* par PCR en Temps Réel TaqMan®

Contact : Frédéric BAR - Key Account Manager - Quality and Safety Testing & Biosecurity

Applied Biosystems - **Tel**: +33 169 59 85 85 **Fax**: +33 169 59 85 00

e-mail: frederic.bar@eur.appliedbiosystems.com - <http://www.microseq.com> - <http://info.appliedbiosystems.com/pathogenkits>

Introduction : la PCR en Temps Réel TaqMan®

La technologie de PCR en Temps Réel TaqMan® permet de coupler une réaction de PCR (et donc l'amplification exponentielle de l'ADN de la cible recherchée) à sa détection à l'aide d'une sonde oligonucléotidique fluorescente, la sonde TaqMan®.

Les avantages de cette méthode dans le cadre de la recherche des bactéries pathogènes dans les aliments sont les suivants :

1° Pas d'analyse post-PCR.

Grâce au couplage amplification/détection, il n'est plus nécessaire de réaliser une analyse post-PCR (gel d'électrophorèse) Les résultats de détection et/ou de quantification sont directement obtenus après les cycles d'amplification du run de PCR en temps Réel.

Gain de temps : obtention du résultat en 2h30 après la phase de pré-enrichissement.
Absence de contaminants issus d'une manipulation accidentelle des produits PCR

2° Spécificité de détection. La spécificité d'amplification est assurée par la paire d'amorces de PCR. La sonde oligonucléotidique TaqMan® apporte un niveau supplémentaire de spécificité.

Garantie de **cibler à 100%** la bonne espèce bactérienne ou le **bon sérotype bactérien**

3° Sensibilité de détection. La technologie de PCR en Temps Réel TaqMan® autorise une quantification sur plus de 9 décades en descendant jusqu'à 10 copies de cibles dans l'échantillon.

Possibilité de détecter jusqu'à **une UFC (Unité Formant Colonie) dans 25 g d'échantillon**

4° PCR TaqMan® Duplex. Il est possible de réaliser la co-amplification dans la même cupule de l'ADN de l'espèce bactérienne recherchée et d'un Contrôle Interne Positif (CIP) C'est un système PCR artificiel amplifié et détecté par des amorces/sonde TaqMan® dédiées et marquées par un fluorophore différent de celui utilisé pour la détection de l'ADN de la bactérie

Le **CIP** permet d'attester de la présence ou non de **molécules inhibitrices de la PCR**
Pas de faux négatifs

Thermocycleur Temps Réel Applied Biosystems - 7300 RT-PCR System

Les thermocycleurs Temps Réel sont des instruments permettant de coupler la réaction de PCR à la détection du signal fluorescent issu du clivage de la sonde TaqMan®

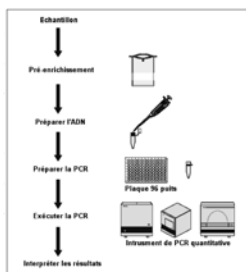
Le paramètre analytique mesuré par la machine sur chaque échantillon amplifié par PCR est dénommé « Cycle

Seuil » ou CT (Cycle Threshold). Il correspond aux nombres de cycles de PCR nécessaires à la réaction de PCR d'un échantillon pour s'extraire du bruit de fond fluorescent et atteindre un seuil de détection optique.

Lorsqu'en parallèle des échantillons à tester, sont dosés des échantillons étalons dont la quantité de cibles est connue, il est alors possible de réaliser une quantification absolue par comparaison des valeurs de CT des échantillons inconnus et étalons au travers d'une droite de calibration externe.

Méthode de détection des Salmonelles dans les matrices alimentaires par la méthode de PCR en Temps Réel TaqMan® (Salmonella enterica TaqMan® Food Pathogen Detection Kit)

1° Principe général de la méthode



2° Les 5 étapes de la détection de la Salmonelle

1ère étape : phase de pré-enrichissement (méthode ISO 6579)

- Dans un sac à filtre, introduire 25 g d'aliment dans 225 mL d'Eau Tamponnée Peptonée
- Incubation 18 + /- 2 h à 37 +/- 1°C

2ème étape : extraction de l'ADN à l'aide la solution PrepMan® Ultra

- Prélever 1 mL de milieu de pré-enrichissement le transférer dans un microtube 1.5 mL « nuclease free »
- Centrifuger le milieu à 16000 xg pendant 3 min. (afin de culotter les bactéries de l'échantillon)
- **Eliminer le surnageant**
- Resuspendre le culot bactérien avec 100 µL de PrepMan® Ultra
- Incuber le lysat à 100°C durant 10 min.
- Laisser revenir à température ambiante 2 min.
- Centrifuger le lysat bactérien à 16000 xg durant 3 min. (permet de culotter les débris bactériens)

- **Prélever 50 µL du surnageant** (contenant l'ADN bactérien) et le transférer dans un microtube neuf
- A partir des 50 µL, réaliser une dilution au 1/10ème (5µL de surnageant + 45 µL d'eau PCR)
- Utiliser cette dilution au 1/10ème pour l'amplification PCR

3ème phase préparation de la réaction de PCR

- Mélanger les différents composants du kit *Salmonelle*

	1 réaction (µL)	10 réactions (µL)
Master Mix TaqMan® Environnemental	15	150
Mix Essai TaqMan Salmonelle/CIP	3	30
Total	18	180

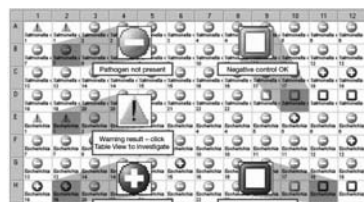
- Dans une microplaque 96 puits optique, répartir 18 µL du mélange réactionnel
- Ajouter 12 µL d'ADN de chaque échantillon

4ème phase lancement du run de PCR en Temps Réel

- Sceller la microplaque 96 puits à l'aide d'un film optique thermoadhésif
- Introduire la microplaque dans le thermocycleur Temps Réel
- Les paramètres de thermocyclage sont les suivants



5ème phase Analyse des résultats



Les résultats sont présentés par les icônes illustrant chaque puits. Chaque icône est fondée sur une analyse des valeurs de Ct selon le tableau suivant :

Les contrôles :

	icône	Détection de Salmonella spp (FAM:AGB) CI indéterminé	Détection du contrôle interne positif (VIC:MG5) 24- Ct < 32
Contrôle négatif			

Les échantillons :

Détection de Salmonella spp (FAM:AGB) CI indéterminé	Détection du contrôle interne positif (VIC:MG5) 24- Ct < 32	icônes	Interprétation
Ct-10	24- Ct < 32		Présence
Ct-10	CI indéterminé		Présence avec inhibition
CI indéterminé	CI indéterminé		Absence

En cas d'inhibition : tester cet échantillon dilué au 1/10

6ème phase Confirmation des résultats positifs

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les résultats positifs doivent être confirmés de la (l'une des) manière(s) suivante(s) :

1. Mise en oeuvre des **tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification)**.

Pour effectuer la confirmation, il faut répartir du bouillon d'enrichissement, ou bien des colonies isolées dans le cas des milieux chromogéniques.

2. Utilisation de **toute autre méthode bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION, de principe différent** de celui de la méthode validée dont on cherche à confirmer le résultat. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes (exemple : enrichissement commun avec un même milieu). Les deux méthodes validées (l'une utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronc commun.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

The PCR process and 5' nuclease process are covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F.

Hoffmann-La Roche Ltd. Applied Biosystems and PrepMan are registered

trademarks and AB (Design), Applera and RapidFinder are trademarks of Applera Corporation or its subsidiaries in the

US and/or certain other countries. TaqMan is a registered trademark of

Roche Molecular Systems, Inc. © 2005. Applied Biosystems. All Rights Reserved.