

Détection des *Norovirus* dans les aliments au moyen de l'amplification en chaîne par polymérase (ACP).

DÉTECTION DES *NOROVIRUS* DANS LES ALIMENTS AU MOYEN DE L'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE – TRANSCRIPTASE INVERSE (ACP-TI).

1. AVERTISSEMENT ET PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

Les pratiques en matière de santé et sécurité rattachées à cette méthode sont conformes aux directives nationales sur la santé et aux mesures décrites au chapitre 3 du document 01-D-001 intitulé : « Manuel du programme d'assurance qualité du module de microbiologie ».

2. INTRODUCTION

Les *Norovirus* appartiennent à la famille des *Caliciviridae*. Ce sont des virus à ARN monocaténaire de polarité positive et dépourvu d'enveloppe. Ils ont été mis en évidence pour la première fois en 1968 suite à une épidémie de gastroentérites chez les habitants de la ville de « Norwalk » en Ohio. Jusqu'ici, ces virus n'ont pu être cultivés. Ils sont très résistants aux conditions environnementales. Les *Norovirus* sont l'une des causes les plus fréquentes de gastroentérites aiguës non bactériennes.

Le virus se retrouve dans le monde entier. Il est difficile de connaître les données exactes concernant la fréquence des infections à *Norovirus* puisque ce n'est pas une maladie à déclaration obligatoire et qu'il est peu recherché dans les selles. Les virus sont excrétés dans les selles et les vomissements. La transmission est principalement de personne à personne par voie fécale-orale. Une transmission peut survenir par l'intermédiaire de surfaces contaminées, ou encore par des aérosols produits lors des vomissements. Des aliments contaminés sont également à l'origine d'infections ou d'épidémies dont, principalement, les fruits de mer (moules). La dose infectante minimale est très faible (10-100 particules virales). La maladie débute de manière aiguë, avec des vomissements en jet, suivis ou accompagnés par des diarrhées. La maladie ne confère qu'une immunité partielle, de sorte qu'un nouvel épisode dû à un virus du même génotype peut être observé chez une même personne.

Jusqu'ici, le diagnostic était difficile, et ce n'est que depuis la mise au point des méthodes de biologie moléculaire qu'une vision épidémiologique et clinique plus complète peut être obtenue. Les *Norovirus* peuvent être divisés en 4 génogroupes GI, GII, GIII et GIV. Les génogroupes GI, GII et GIV infectent les humains et incluent plusieurs génotypes alors que le génogroupe GIII infecte les bovins et les porcs.

3. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détection des *Norovirus* isolés dans les aliments, au moyen d'une technique de concentration des *Norovirus*, suivi d'une détection par la formation d'un ADN complémentaire grâce à la transcriptase inverse puis une amplification en chaîne par polymérase (mieux connue sous l'appellation RT-PCR).

4. RÉFÉRENCES NORMATIVES

Cette méthode permet de déterminer s'il y a conformité à l'article 3 de la *Loi sur les produits alimentaires* (P-29). Il existe un critère d'absence non détecté pour ce micro-organisme dans les

denrées alimentaires ciblées tel que défini dans le document intitulé : « *Lignes directrices pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire* » (CQIASA/MAPAQ, 2003) www.agr.gouv.qc.ca/Fr/Restauration/Qualitedesaliments/laboratoireexpertise/lignesdirectrices/.

5. PRINCIPE

La première étape de la méthode consiste à extraire et concentrer le virus par élution-centrifugation-précipitation à partir des échantillons alimentaires. Par la suite, l'ARN viral simple brin est transcrit en ADN grâce à la transcriptase inverse pour être amplifié à deux reprises (ACP-gigogne). Les produits d'amplification sont finalement révélés sur gel de polyacrylamide. Les amorces utilisées ont été désignées sur la base d'une séquence de l'ARN polymérase pour les génogroupes I et II et non l'ensemble des *Norovirus*.

5.1 Extraction et concentration du virus

Cette étape permet la récupération des virus par élution-centrifugation-précipitation en présence de polyéthylène glycol.

5.2 Transcription de l'ARN viral en ADN complémentaire et amplification en chaîne par la polymérase

La synthèse de l'ADN complémentaire et l'amplification en chaîne par la polymérase (ACP) se font successivement dans un tube réactionnel, utilisant des amorces spécifiques tel que décrit plus haut.

Le fragment amplifié d'un poids moléculaire défini par les amorces est facilement identifié par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

5.3 Confirmation par amplification en chaîne par polymérase (ACP-gigogne « Nested-PCR »)

Les amplicons (produit de la première ACP) sont soumis à une deuxième amplification génétique. Les oligonucléotides servant d'amorces pour l'ACP-gigogne sont spécifiques à la séquence interne du premier amplicon. La sensibilité de détection est alors augmentée de sorte qu'une seule copie d'ADN cible peut-être détectée sans besoin d'hybridation avec une sonde marquée. De plus, la réamplification avec une 2^{ème} paire d'amorce interne permet de confirmer la spécificité du premier produit d'amplification. Cette 2^{ème} amplification entraîne également une dilution des inhibiteurs pouvant être présent dans l'amplicon initial.

6. TAMPONS ET RÉACTIFS

6.1 Solutions et réactifs

- Agarose LE (Boehringer ou équivalent)(Annexe B-1)
- Tampon Tris-Acide-Acétique-EDTA (TAE) 10 X (Boehringer 1660690 ou équivalent) (Annexe A-5)
- Tampon Tris-Acide Borique-EDTA (TBE) 10 X (Annexe A-8)
- Bleu de bromophénol (Sigma B-8026 ou équivalent)(Annexe A-6 et A-9)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP (dNTP Mix Boehringer 1581295 ou équivalent) (Annexe A-4.2)
- Bromure d'éthidium (Sigma E-7637 ou équivalent)(Annexe B-1)

- EDTA (Sigma E-5513 ou équivalent) (Annexe A-5 et A-8.2)
- $MgCl_2$ 25 mM (QIAGEN ou équivalent) (Annexe A-4.1)
- Tampon PCR 10 X (QIAGEN ou équivalent) (Annexe A-4.1)
- Hot Star Taq polymérase 5 U/ μ L (QIAGEN ou équivalent) (Annexe A-7)
- Éthanol 100 % (Les Alcools de commerce inc.)
- Acrylamide (Pharmacia 17-1300-02) (Annexe A-8.1)
- Méthylènebisacrylamide (17-1304-902) (Annexe A-8.1)
- Colorant de repérage 10 X (Annexe A-6)
- Colorant de repérage 6 X (Annexe A-9)
- Persulfate d'ammonium 10 % dans l'eau (BRL 15523-012) (Annexe A-8.3)
- Temed (Sigma-T9281) (Annexe A-8.3)
- One Step RT-PCR kit (QIAGEN 210212)
- QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN 52906)
- RNA guard (Pharmacia 27-0815-01) (Annexe A-3)
- Bouillon tryptose phosphate (TPB) (Oxoid CM283) (Annexe A-2)
- Glycine (Sigma G4392) (Annexe A-1)
- Polyéthylène glycol Type 6000 (PEG) (BDH 192280010)
- Chlorure de sodium (BDH ACS 783)
- Tween 80 (ACPT-9820)
- Standard de poids moléculaire de 100 pb (XIV Roche 1721933) (Annexe A-11) et de 25 pb (BRL 10597-011)
- Eliminase (Sigma)
- H_2O DEPC (Annexe A-3 et A-7) (Omni Pur EM Science)
- Oligonucléotides spécifiques pour les 2 étapes (SR33, SR46 Annexe A-3) ; (MDRS 33N et MDSR 45N Annexe A-7))
- Eau distillée stérile
- Eau de javel 5 % diluée 1:10 (0,5 %)
- Désinfectant virucide (Conflikt – DECON)

Les tampons, l'eau distillée, les embouts de pipettes et autres matériaux qui viennent en contact avec les échantillons ou avec les réactifs de l'ACP doivent être stérilisés à l'autoclave avant usage afin d'éliminer toute DNase et autres contaminants. Les pipettes et les hottes sont désinfectées avec l'eau de javel 0,5 % et/ou éliminase.

À titre de recommandation, pour éviter les problèmes de contamination, tous les réactifs devraient être préparés dans une hotte à flux laminaire qui n'a jamais été exposée aux produits d'amplification de l'ACP. Il est très important d'analyser les produits de l'ACP dans une autre pièce que celle servant à préparer l'amplification.

7. APPAREILLAGE

7.1 Appareils

- Thermocycleur (PTC-200 de MJ Research ou autre)
- Hotte à flux laminaire Classe II
- Four à micro-ondes ou plaque chauffante
- Étuve ou bain-marie à $(35 \pm 1) ^\circ C$, $(43 \pm 1) ^\circ C$ et $(41,5 \pm 1) ^\circ C$
- Homogénéisateur de type péristaltique (Stomacher), avec des sacs stériles en plastique
- Stérilisateur à chaleur humide (autoclave)
- Appareil d'alimentation (BioRad 200/2.0, # 165-4762 ou l'équivalent) et peigne à 8 puits (BioRad 170-4333 ou l'équivalent) ou plus

- 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 ou appareil photomérique
- Centrifugeuse Beckman J2-HS
- Incubateur rotatif réfrigérant
- Microcentrifugeuse
- Agitateur Vortex

7.2 Matériel

- Support de coulage de gel et réservoir à tampon (BioRad 170-4307 ou équivalent)
- Table lumineuse à rayons UV à ondes courtes (transilluminateur) pour visualiser l'ADN coloré dans les gels d'agarose
- Pipettes sérologiques stériles de 2,0 mL graduées en unités de 0,01 mL
- Ustensiles de prélèvements stériles
- Micropipettes de capacité réglable : 0,5-10 µL (pour l'ajout de l'ADN-polymérase Taq); 0,5-10 µL (pour les échantillons de l'ACP); 10-100 µL; 200-1 000 µL
- Embouts de micropipettes (avec filtre)
- Tubes à centrifuger de 1,5 mL ou l'équivalent
- Tubes à centrifuger de 500 µL ou l'équivalent (Thin Wall Boehringer)
- Sac pour stomacher
- Erlenmeyer de 25 mL
- Module d'électrophorèse verticale Mini Protean 3 (Bio Rad)
- Coton fromage
- Bouteille à centrifuger (Beckman 356011)

8. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons sont analysés le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire. De façon générale, se référer au document 01-D-550 pour la préparation des échantillons.

8.1 Préparation de l'échantillon

- 8.1.1 Prélever aseptiquement différentes parties du produit à analyser. Si l'échantillon est liquide, l'agiter vigoureusement (en inversant le contenant 25 fois) ou jusqu'à ce que le contenu soit homogène.
- 8.1.2 Peser 25 g d'aliments dans un sac en plastique (Stomacher) ou un contenant de verre préalablement taré.
- 8.1.3 À chaque série d'échantillons et pour chaque nouvelle matrice d'aliments à analyser, un témoin positif constitué d'environ 25 g d'aliments à analyser auquel est ajouté 140 µL de *Norovirus* clarifié* (souche N417, N423 ou autres souches positives) est mélangé manuellement. Laisser absorber 30 minutes avant d'homogénéiser.

Norovirus clarifié* : Prélever les fèces à l'aide de l'extrémité d'un bâton de bois stérile ou s'ils sont liquides, pipetter 20 µL et déposer dans 500 µL d'eau DEPC. Bien mélanger au vortex.

Centrifuger à 2 706 x g, 4 minutes.

Transférer le surnageant dans un tube de 1,5 mL.

Centrifuger à 15 115 x g, 5 minutes.

Transférer le surnageant dans un tube stérile. Conserver jusqu'à son utilisation à -20 °C.

Évaluer la force du témoin positif par titre d'unités de PCR.

9 MODE OPÉRATOIRE

9.1 Concentration et extraction des virus

- 9.1.1 Ajouter de façon aseptique 150 mL de bouillon tryptose phosphate 10 % (TPB) dans 0,05 M de glycine pH 9,0 (A-1) à l'unité d'analyse préalablement pesée.
- 9.1.2 À chaque série d'échantillons, un blanc est constitué de 150 mL de tampon TPB/glycine seul.
- 9.1.3 Également, un témoin positif de concentration et d'extraction de virus est constitué en ajoutant 140 µL de *Norovirus* clarifié* à 150 mL de TPB/glycine.
- 9.1.4 Mélanger au Stomacher ou à l'homogénéisateur rotatif pendant environ 2 minutes ou jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Éviter tout chauffage excessif de l'homogénat.
- 9.1.5 Filtrer à travers 3 couches de coton fromage stérilisé préalablement. Transférer dans une bouteille Beckman de 250 mL (bouteille stérile à centrifuger).
- 9.1.6 Équilibrer les bouteilles à l'aide du tampon TPB/Glycine. Centrifuger 10 minutes à 3 500 x g à 4 °C. Prélever le surnageant immédiatement après la centrifugation. Utiliser des bouteilles stériles de Beckman coniques de 250 mL. Ajuster le pH à 7,2-7,3 avec quelques gouttes de HCl concentré. Ajouter du NaCl de façon à obtenir une concentration finale de 0,3M (9,0 mL de NaCl 5M) et du PEG 6000 à une concentration finale de 6 % (9,0 g de PEG). Solubiliser et incuber à 4°C toute la nuit sous agitation (140 rpm).
- 9.1.7 Centrifuger à 3 500 x g, 20 minutes à 4 °C. Resuspendre le culot dans 12,5 mL de 50 mM Tris-0,2 % Tween 80 pH 9,0. Incuber 1 heure à température ambiante en agitant au vortex périodiquement.
- 9.1.8 Centrifuger 10 minutes à 5 000 x g à 4 °C. Prélever le surnageant. Ajuster le pH à 7,2-7,3 avec quelques gouttes de HCl concentré. Ajouter du NaCl à une concentration finale de 0,3 M (750 µL de NaCl 5M) et du PEG 6000 de façon à obtenir une concentration finale de 12 % (1,5 g de PEG). Solubiliser et incuber au minimum 2 heures à 4 °C sous agitation (140 rpm).
- 9.1.9 Centrifuger à 7 500 x g, 15 minutes à 4 °C. Jeter le surnageant. Ajouter 1,25 mL de 50 mM Tris-0,2 % Tween 80 pH 8,0 ou plus, de façon à bien resuspendre le culot et agiter au vortex vigoureusement. Conserver l'extrait de virus à - 20 °C jusqu'à l'extraction de l'ARN viral

Note : Les surfaces de travail doivent être désinfectées à l'aide du virucide après chaque manipulation du témoin de *Norovirus*.

9.2 Préparation des gabarits

Les gabarits d'ARN sont extraits à l'aide de la mini trousse de QIAGEN QIAampVIRAL RNA en appliquant les recommandations et le protocole du fabricant.

9.2.1 Préparation du tampon AVL

9.2.1.1 Ajout de l'ARN « Carrier » : Ajouter 1 mL de tampon AVL à un tube d'ARN « Carrier » lyophilisé. Bien dissoudre l'ARN « Carrier ». Le transférer à la bouteille AVL et bien mélanger avant son utilisation. Une fois l'ARN carrier ajouté au tampon de lyse, le conserver à 4 °C.

9.2.1.2 Si présence d'un précipité, chauffer le tampon à 80 °C jusqu'à sa dissolution. Ne pas incuber à 80 °C plus de 5 minutes. Ne pas chauffer le tampon AVL/ARN « Carrier » plus de 6 fois. Tout ceci afin d'éviter la dégradation de l'ARN « Carrier » réduisant ainsi les chances d'extraire l'ARN viral, surtout dans le cas d'échantillons à faible concentration virale.

9.2.2 Préparation des tampons AW1 et AW2

9.2.2.1 Les tampons AW1 et AW2 sont fournis sous forme concentrée. Avant de les utiliser pour la première fois, ajouter la quantité d'éthanol (96 – 100 %) tel qu'indiqué sur la bouteille. Inscrire sur la bouteille la date de l'ajout de l'éthanol. Les tampons AW1 et AW2 sont stables 1 an lorsqu'ils sont entreposés à température ambiante.

9.2.3 Manipulation des colonnes

9.2.3.1 Appliquer délicatement les échantillons aux colonnes sans mouiller l'anneau de la colonne. Changer d'embout entre chaque transfert de liquide. Utiliser des embouts avec filtre. Éviter de toucher à la membrane avec l'embout. Toujours porter des gants. Ouvrir les colonnes une à la fois en évitant les aérosols. Toutes les étapes de centrifugation se font à température ambiante.

9.2.4 Extraction de l'ARN

9.2.4.1 Pipeter 240 µL de tampon AVL contenant l'ARN « Carrier » dans un tube de 15 mL. Ajouter 560 µL d'échantillon. Mélanger au vortex 15 secondes.

9.2.4.2 À chaque série d'échantillons, ajouter un témoin positif d'extraction, i.e. : 140 µL de virus clarifié, et y ajouter 560 µL de tampon AVL. Faire de même pour le blanc. Cette proportion 1:4 doit être conservée.

9.2.4.3 Incuber à température ambiante 10 minutes (étape de lyse, les RNases sont inactivées dans le tampon AVL).

9.2.4.4 Ajouter 240 µL d'éthanol 100 % à l'échantillon. Agiter au vortex 15 secondes.

9.2.4.5 Déposer 630 µL de cette préparation à la colonne QIAamp (reliée à un tube collecteur de 2 mL) sans mouiller l'anneau. Fermer le couvercle. Centrifuger à 6 000 x g, 1 minute. Placer la colonne QIAamp dans un

autre tube contenant le filtrat (si la solution n'est pas complètement passée à travers la membrane, centrifuger encore à une vitesse supérieure).

- 9.2.4.6 Ouvrir délicatement les colonnes et répéter l'étape 9.2.4.5, 7 fois (jusqu'à ce que toute la préparation ait été fixée à la colonne).
- 9.2.4.7 Ouvrir délicatement les colonnes et ajouter 500 µL de tampon AW1 et fermer. Centrifuger à 6 000 x g, 1 minute. Placer les colonnes dans un tube collecteur propre et jeter le tube contenant le filtrat.
- 9.2.4.8 Ouvrir délicatement la colonne et ajouter 500 µL de tampon AW2 et fermer. Centrifuger à 20 000 x g, 4 minutes.
- 9.2.4.9 Placer la colonne dans un tube de 1,5 mL. Jeter le tube collecteur contenant le filtrat. Ouvrir délicatement la colonne et ajouter 40 µL de tampon AVE équilibré à la température ambiante. Incuber 1 minute à la température ambiante puis centrifuger à 6 000 x g, 1 minute.
- 9.2.4.10 Éluer une 2^e fois avec 40 µL de tampon AVE. Incuber 1 minute à la température ambiante avant de centrifuger à 6 000 x g, 1 minute.
- 9.2.4.11 Conserver l'ARN à -70 °C sans glycérol. Il est stable 1 an. Idéalement, procéder immédiatement à la transcription puisque l'ARN est très fragile.

9.3 Transcription de l'ARN et amplification en chaîne par polymérase–transcriptase inverse (ACP-TI) en une étape (« One Step RT-PCR »)

- 9.3.1 Dégeler l'ARN, les amorces, mélange de dNTPs, tampon 5 X QIAGEN One Step RT-PCR, eau sans RNase. Bien mélanger chaque tube.
- 9.3.2 Préparer le mélange réactionnel pour l'ACP-TI (voir annexe A-3).
- 9.3.3 Bien mélanger à l'aide d'une pipette et ajouter 2 µL d'ARN extrait au mélange réactionnel pour l'ACP-TI. Conserver sur glace en attendant que le thermocycleur atteigne 43 °C pour y déposer les tubes.
- 9.3.4 À chaque série d'échantillons, préparer un témoin négatif constitué de 2 µL d'H₂O DEPC.
- 9.3.5 Placer les tubes dans un thermocycleur et procéder à l'ACP-TI conformément au programme décrit au point 9.5.2.

9.4 Électrophorèse sur gel d'agarose

- 9.4.1 Préparer le gel d'agarose à 2,0 % (p/v) dans du tampon TAE 1X. 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 1 à 2 minutes à puissance élevée. S'assurer que l'agarose est entièrement dissoute (liquide limpide, exempt de particules en suspension). En cas d'évaporation, ajouter du tampon pour ramener le volume au niveau voulu.

- 9.4.2 Laisser l'agarose refroidir à 50 °C (10 minutes), ajouter la solution de bromure d'éthidium afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 µg/mL (50 µL d'une solution 1 mg/mL par 100 mL de gel) puis la verser dans un support à gel dont les deux extrémités ont été scellées avec du ruban gommé. Ajouter le peigne pour la formation des puits et laisser le gel solidifier pendant environ 30 minutes à l'abri de la lumière.
- 9.4.3 Préparer les échantillons pour l'électrophorèse : dans des tubes à centrifuger propres, mélanger 2 µL de colorant marqueur 5 X avec 10 µL d'amplicons.
- 9.4.4 Une fois le gel d'agarose solidifié, enlever le peigne et le ruban, placer le support à gel dans l'appareil d'électrophorèse et remplir le réservoir avec du tampon TAE 1 X en quantité suffisante pour immerger le gel. Doucement, déposer 12 µL de mélange amplicon-colorant dans les puits du gel submergé (profondeur de 5 mm). Pour chaque rangée de puits, déposer un échantillon d'un standard de poids moléculaire (DNA Molecular Weight Marker XIV 100 pb ladder).
- 9.4.5 Brancher l'appareil à la source d'alimentation. Appliquer de 80 à 100 volts au gel et laisser fonctionner l'appareil pendant environ 1 heure ou jusqu'à ce que le colorant de repérage arrive à 1 cm du bas du gel. Ajuster le voltage et le temps selon le type d'appareil. Retirer le gel du support avec précaution.
- Note : Le bromure d'éthidium est un mutagène puissant, utiliser des gants de caoutchouc pour le manipuler.
- 9.4.6 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. Photographier les gels pour faciliter l'analyse et l'archivage.

9.5 Amorces et cycles de température de la l'ACP-TI

9.5.1 Amorces de l'ACP-TI

Le choix des oligonucléotides servant d'amorces pour l'ACP repose sur la séquence de nucléotides publiée par Ando et al. (1995). Pour l'amplification d'un fragment d'ADN de 123 pb spécifique, la séquence des amorces requises sont les suivantes :

Amorce SR33 = 5' TGTCACGATCTCATCATCACC 3' (spécifique pour les sérogroupes GI et GII);

Amorce SR46 = 5'TGGAATTCCATCGCCCACTGG 3' (spécifique pour les sérogroupes GII).

Note : La synthèse des oligonucléotides peut-être confiée en sous-traitance à une Université locale. En outre, de nombreuses entreprises de biotechnologie offrent des services de synthèse sur commande.

9.5.2 Programme des cycles de température pour l'ACP-TI.

Programme "One Step RT-PCR": Suivre le programme des cycles de température qui suit :

Étape 1	Transcription	60 minutes	43 °C
Étape 2	Pré-dénaturation	15 minutes	95 °C

Étape 3	30 cycles de :		
	Dénaturation	30 secondes	94 °C
	Attachement	45 secondes	50 °C
Étape 4	Extension	1 minute	72 °C
	Élongation finale	10 minutes	72 °C

L'usage de thermocycleur autres que le modèle précédemment mentionné peut modifier la performance de l'ACP. Il peut être nécessaire d'optimiser les paramètres des cycles pour des modèles différents. Le programme peut contenir une plage de 72 h à 4 °C à la fin de l'amplification. Ainsi, les amplifications peuvent débuter le vendredi et elles se maintiendront à 4 °C pour la fin de semaine. Idéalement, minimiser le temps où le thermocycleur devra fonctionner à 4 °C, puisque la réfrigération diminue la durée de vie de l'appareil.

Lorsque l'amplification est terminée, retirer chaque tube et les conserver à 4 °C jusqu'à l'analyse par électrophorèse. Si l'analyse des résultats de l'amplification (amplicons) ne peut être effectuée dans les 2 jours suivants, il est préférable de placer les tubes à -20 °C.

10. EXPRESSION DES RÉSULTATS

10.1 Interprétation des résultats

L'amplicon (produit d'ACP) est un fragment d'ADN spécifique de 123 pb de longueur. Par conséquent, une épreuve ACP positive donnera un fragment d'ADN de 123 pb qui apparaîtra sous forme d'une bande nette sur le gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. La taille moléculaire de la bande peut être vérifiée en comparant sa migration à celle de standard de poids moléculaire prédéterminée ayant parcouru la même distance et celle du témoin positif. Normalement, une épreuve ACP négative ne donnera pas de bande visible sur le gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. Dans les cas extrêmement rares où un échantillon a donné des bandes qui ne correspondent pas à un amplicon de 123 pb (produits d'amplification non spécifiques), l'échantillon est considéré comme étant négatif. Toute bande correspondant à l'amplicon de 123 pb produite par le témoin négatif indique une contamination provenant de l'eau distillée stérile, du mélange réactionnel ou de l'environnement. Toutes les analyses sont alors considérées suspectes et doivent être rejetées ; les échantillons doivent être réanalysés avec du nouveau matériel.

10.2 Confirmation des résultats

Dans le cas d'une faible bande ou d'une absence de bande, faire une seconde amplification (ACP-gigogne) afin d'augmenter la sensibilité et de confirmer les résultats. Dans le cas d'une bande nette, diluer l'amplicon 1:10 ou 1:100 selon l'intensité de la bande en question avant de procéder à l'ACP-gigogne.

10.2.1 Amplification en chaîne par polymérase (ACP-gigogne)

10.2.1.1 Dégeler les amorces, dNTP mélange, tampon 10 X, l'eau exempte de RNase. Bien mélanger chaque tube.

10.2.1.2 Préparer le mélange réactionnel dans des tubes de 200 µL (voir annexe A-7).

Un témoin négatif à partir de l'étape de la concentration virale (H₂O distillée et réactifs) doit être intercalé régulièrement entre les échantillons afin de contrôler la possibilité de contamination (1 témoin négatif par 5 échantillons).

Centrifuger brièvement (quick spin) les amplicons de façon à faire descendre le liquide dans le fond du tube afin de réduire la contamination par aérosol. Ajouter 2 µL d'amplicon sous une hotte à flux laminaire (préalablement décontaminée aux ultraviolet) différente de celle utilisée pour la première amplification, avec une pipette dédiée à l'ACP-gigogne. Déposer dans un thermocycleur dédié à l'ACP-gigogne, situé dans un local distinct. Les puits du thermocycleur étant nettoyés à l'alcool 70 %.

10.2.2 Amorces et programme des cycles de température

10.2.2.1 Amorces de l'ACP Nested

Amorce MDSR33N = 5' CCATAAAAGGAGAAGAGGGAAT 3'

Amorce MDSR46N = 5' CTGGCTTCTCACTCTCTGTGCGCT 3'

10.2.2.2 Programme des cycles de températures

La Hot Star Taq DNA Polymerase est fournie sous forme inactive ayant aucune activité à température ambiante. Ceci prévient le mauvais appariement des amorces et la formation de « primer dimer » à basse température. La Hot Star Taq DNA Polymerase est activée dans le mélange réactionnel par une étape d'incubation à 95 °C pendant 15 minutes. Par conséquent, le programme des cycles de température doit reposer sur la séquence suivante (Appareil PTC-200 de MJ Research).

Étape 1	Activation	15 minutes	95 °C
Étape 2	30 cycles de :		
	Dénaturation	40 secondes	94 °C
	Attachement	1 minute	55 °C
	Extension	1 minute	72 °C
Étape 3	Élongation finale	10 minutes	72 °C

Lorsque l'amplification est terminée, retirer chaque tube et les conserver à 4 °C jusqu'à l'analyse par électrophorèse. Si l'analyse des résultats de l'amplification (amplicons) ne peut être effectuée dans les 2 jours suivants, il est préférable de placer les tubes à -20 °C.

10.2.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

10.2.3.1 Préparation du montage pour couler le gel de polyacrylamide 12 %.

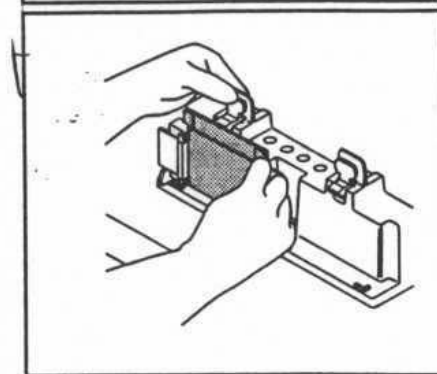
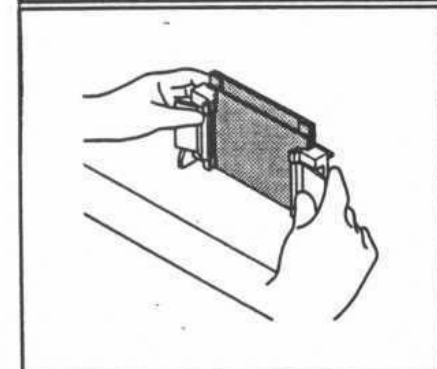
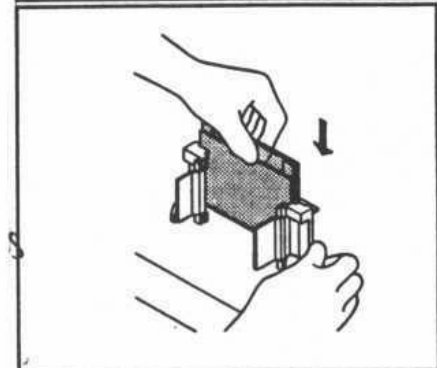
10.2.3.1.1 Placer la plaque de verre la plus courte sur la plaque « Spacer ».

10.2.3.1.2 Glisser les 2 plaques sur le montage vert de façon à ce que la plaque la plus courte soit face à vous.

10.2.3.1.3 S'assurer que les plaques soit appuyées sur la surface du comptoir.

10.2.3.1.4 Fermer les pinces à pression pour sceller les plaques.

10.2.3.1.5 Sécuriser le montage en l'engageant sur le portoir. Le levier maintient les plaques appuyées sur le joint d'étanchéité en caoutchouc gris.



10.2.3.2 Préparation du gel de polyacrylamide 12 % (voir l'annexe A)

10.2.3.3 Préparation du montage pour l'électrophorèse

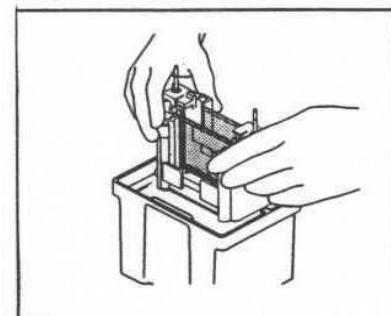
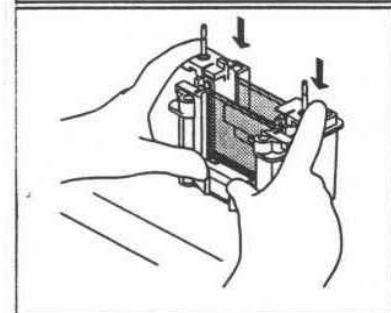
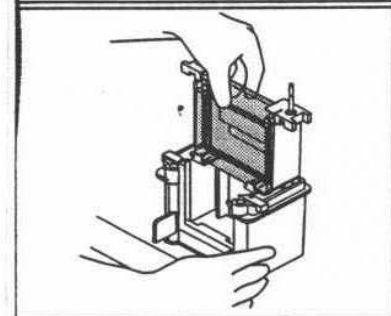
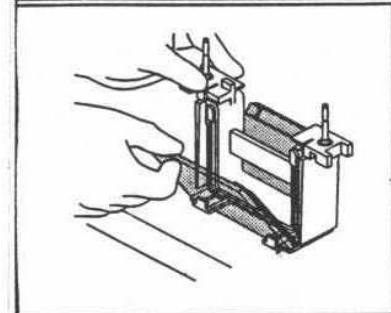
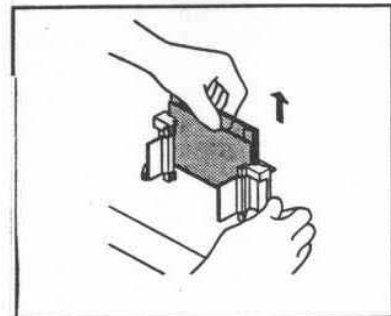
10.2.3.3.1 Retirer les 2 plaques du montage vert en ouvrant les pinces. Retirer également le peigne.

10.2.3.3.2 Placer les plaques dans le montage d'électrodes avec la plaque courte face à l'intérieur.

10.2.3.3.3 Glisser le montage d'électrode dans le montage à clip.

10.2.3.3.4 Fermer les 2 clips.

10.2.3.3.5 Déposer la chambre interne dans le mini réservoir.



10.2.3.3.6 Préparer le tampon d'électrophorèse TBE 1,5 X (voir annexe A-10).

10.2.3.3.7 Remplir la chambre interne avec 125 mL de tampon TBE 1,5 X (jusqu'à ce que le niveau atteigne la moitié du chemin entre le haut de la grande plaque et celui de la plus courte).

Note : Ne pas trop remplir la chambre interne. Un excès de tampon peut causer un siphon de tampon et entraîner une interruption de l'électrophorèse.

Verser 475 mL de tampon d'électrophorèse TBE 1,5 X dans le mini réservoir. Chasser les bulles d'air présentes dans le tampon à l'extrémité inférieure des plaques, à l'aide d'une pipette recourbée.

Rincer les puits du gel avec le tampon TBE 1,5 X. Bien vérifier l'état des puits.

10.2.3.3.8 Préparer les échantillons

100 µL d'échantillons(amplicons) + 16,6 µL colorant de repérage 6 X (voir annexe-B).

10.2.3.3.9 Préparer le standard de poids moléculaire de 25 pb.

4 µl de standard 25 pb + 4,0 µl H₂O + 4 µL colorant de repérage 6 X.

10.2.3.3.10 Déposer doucement 12 µL du mélange amplicons-colorant à la pipette avec un embout à pointe fine.

10.2.3.3.11 Placer le couvercle sur le mini réservoir. Brancher à un appareil d'alimentation à 20mA, 160 volts.

10.2.3.3.12 Poursuivre la migration jusqu'à ce que le front bleu sorte du gel (durée environ 1 h 20 pour 1 gel et de 1 h 25 pour 2 gels).

10.2.3.3.13 Fermer le courant. Retirer la chambre intérieure et vider le tampon avant de retirer le gel. Démouler le gel en soulevant délicatement une plaque à l'aide de la petite spatule verte.

10.2.3.3.14 Colorer le gel dans une solution contenant 100 µl de bromure d'éthidium (1mg/mL) dans 100 mL d'eau, 10 minutes à l'obscurité sous agitation. Examiner le gel sous éclairage ultraviolet. Prendre une photo. Les produits amplifiés peuvent être conservés à 4 °C ou à -20 °C pour utilisation ultérieure.

11. EXPRESSION DES RÉSULTATS

11.1 Interprétation des résultats

L'amplicon (produit d'ACP) est un fragment d'ADN spécifique de 87 pb de longueur. Par conséquent, une épreuve ACP-gigogne positive donnera un fragment d'ADN de 87 pb qui apparaîtra sous forme d'une bande nette sur le gel de polyacrylamide coloré au bromure d'éthidium. La taille moléculaire de la bande peut être vérifiée en comparant sa migration à celle du standard de poids moléculaire prédéterminé ayant parcouru la même distance. Normalement, une épreuve ACP-gigogne négative ne donnera pas de bande visible sur le gel de polyacrylamide coloré au bromure d'éthidium. Dans les cas extrêmement rares où un échantillon a donné des bandes qui ne correspondent pas à un amplicon de 87 pb (produits d'amplification non spécifiques), l'échantillon est considéré comme étant négatif. Toute bande correspondant à l'amplicon de 87 pb produite par le témoin négatif indique une contamination provenant de l'eau distillée stérile, du mélange réactionnelle ACP ou de l'environnement. Tous les résultats sont alors considérés douteux et doivent être rejetés; les échantillons doivent être analysés avec du nouveau matériel.

Comme pour tout résultat analytique, les résultats positifs doivent être interprétés en fonction du contexte pour déterminer les interventions à réaliser sur le produit alimentaire.

12. ANNEXES

ANNEXE A - SOLUTIONS ET RÉACTIFS

Note : Sauf avis contraire, le pH final des solutions peut varier de $\pm 0,2$.

A-1 Glycine 0,05 M pH 9,3

Mesurer 250 mL de Glycine 0,2 M. Ajouter 44 mL de NaOH 0,2N. Ajuster le pH à 9,3. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

A-2 Tampon TPB 10 % Glycine 0,05 M

Dissoudre 2,95 g de bouillon Tryptose Phosphate dans environ 500 mL de Glycine 0,05 M pH 9,3. Compléter à 1 litre avec de la Glycine 0,05 M pH 9,3. Verser 150 mL dans des bouteilles stériles. Autoclaver 15 minutes à 121 °C.

Les directives complètes sont décrites dans le cahier de procédures 01-D-100 (01-D-039A, B et C).

A-3 Mélange réactionnel pour l'ACP-TI

Solution mère par tube d'amplification : (À préparer le jour de l'analyse)

H ₂ O DEPC (sans RNase)	32,4 µL
Tampon 5 X QIAGEN One Step RT-PCR	10,0 µL
dNTP 10 mM	2,0 µL
Amorce SR 33 50 µM	0,6 µL
Amorce SR 46 50 µM	0,6 µL
QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix	2,0 µL
RNase inhibiteur RNA Guard 8 Unités/tube	0,4 µL

Volume final 48,0 µL

A-4 Mélange pour l'ACP-gigogne

Les mélanges à réaction de l'ACP peuvent être préparés en grande quantité et des aliquots de 98 µL sont alors distribués dans des tubes à centrifuger de 200 µL bien à l'avance.

A-4.1 Tampon 10 X pour ACP et solution MgCl₂

Le tampon PCR 10 X et la solution de MgCl₂ 25 mM sont habituellement fournis à l'achat de Hot Star Taq DNA polymérase 5 U/µL de QIAGEN (cat. n° 203203).

A-4.2 Solution de nucléotides (dNTP)

On peut se procurer cette solution chez Boehringer Mannheim en concentration 10 mM, prêt à utiliser (PCR Nucléotide Mix 1581295). Des solutions de nucléotides sont aussi disponibles chez d'autres fournisseurs.

A-5 Tampon TAE 50 X

TRIS base	242 g/l
Acide acétique glaciaire	57,1 mL/l
EDTA 0,5 M	100 mL/l

Utiliser une concentration 1 X dans les gels et comme tampon d'électrophorèse ou acheter le tampon TAE 10 X (Boehringer n° 1666690).

A-6 Colorant de repérage 10 X (pour gel d'agarose)

Glycérol	50 %
SDS	1 %
EDTA	0,1 M
Bleu de bromophénol	0,1 %

Bien mélanger, utiliser en concentration 5 X.

A-7 Mélange réactionnel pour l'ACP-gigogne Solution mère par tube d'amplification :

Tampon 10X	10,0 µL
MgCl ₂ 25 mM	6,0 µL
dNTP 10 mM	2,0 µL
MDSR 33 N 50 µM	1,0 µL
MDSR 45 N 50 µM	1,0 µL
Hot Star Taq polymérase 5U/µL	0,5 µL
H ₂ O DEPC stérile	77,5 µL

	98,0 µL

A-8 Gel de polyacrylamide 12 %

A-8.1 Préparer l'acrylamide 30 %

Peser 30,0 g d'acrylamide
0,8 g de méthylènebisacrylamide.

Compléter à 100 mL avec de l'eau distillée. Se conserve 3 mois à l'obscurité.

A-8.2 Déposer dans un erlenmeyer de 25 mL à vide :

H₂O distillée 3685 µL
*TBE 10 X 750 µL
Acrylamide 30 % 3000 µL

* Le TBE 10 X (Tris 0,89 M, acide borique 0,89 M, EDTA disodium 0,02 M à 8,4.
Le tampon TBE 10 X se conserve 1 mois à la température ambiante.

A-8.3 Dégazer le gel 15 minutes sous vide. Pour plus de sûreté, conserver le gel sur la glace. La chaleur augmente la vitesse de polymérisation.

Ajouter ensuite les agents polymérisateurs :

Temed 6,0 µL
**Persulfate d'ammonium 10 % 60,0 µL

Manipuler le temed sous une hotte chimique. **Le persulfate d'ammonium doit être préparé frais du jour.

A-8.4 Couler le gel entre les 2 vitres avec une pipette Pasteur sans faire de bulles. Placer le peigne en s'assurant que les 2 petites coches soient bien insérées à l'intérieur des 2 vitres. Essuyer l'excédent de polyacrylamide. Laisser le gel polymériser de 30 à 60 minutes. Ne pas excéder 60 minutes.

A-9 Colorant de repérage 6 X (pour gel de polyacrilamide)

Glycérol 30 %
Bleu de bromophénol 2,5 %

A-10 Tampon d'électrophorèse TBE 1,5 X

Mesurer 90 mL de TBE 10 X et ajouter 510 mL d'H₂O déminéralisée.

A-11 Standard de poids moléculaire de 100 pb

1,0 µL de standard de poids moléculaire de 100 pb + 9,0 µl H₂O + 2 µL colorant de repérage 5X.

ANNEXE B

B-1 Tableau de préparation des gels d'agarose pour l'électrophorèse

Gel	Agarose	Tampon TAE 1 X	Bromure d'éthidium
Petit	0,8 g	40 mL	20 µL
Grand	4,0 g	200 mL	100 µL

B-2 Tableau de préparation des échantillons pour l'électrophorèse sur gel d'agarose

Préparation du mélange	Mélange à injecter
Colorant marqueur 5X 2 µL Amplicons 10 µL	Petit puits : 8 µL Grand puits : 12 µL

B-3 Tableau des répartitions dans les gels d'électrophorèse

Répartition par rangée		
Gel	Standard	Témoin +
Petit	1	1 ou +
Grand	2	2 ou +

B-4 Tableau de préparation des échantillons pour l'électrophorèse sur gel de polyacrilamide

Préparation du mélange	Mélange à injecter
Colorant marqueur 6X 16,6 µL Amplicons 100 µL	Puits : 12 µL

13. BIBLIOGRAPHIE

- Atmar, R.L. et al., 1996, Collaborative Evaluation of Method for the Detection of Norwalk Virus in Shellfish Tissues by PCR, *App. and Environ. Microbiol.*, 62(1) :254-258.
- Ando, T., S.S. Monroe, J.R. Geutsch, Q.I. Jin, D.C. Lewis and R.I. Glass, 1995, Detection and Differentiation of Antigenically Distinct Small Round-Structured Virus (Norwalk-Like Virus) by INVERSE Transcription-PCR and Southern Hybridization, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1) : 64-71.
- Beller, M. et al., 1997, Outbreak of Viral Gastroenteritis Due to Contaminated Well, *JAMA*, August 20, 278(7) : 563-568.
- Boher, S. & L. Schwartzbrod, 1993, Study of Viral Purification of Oysters, *Water Science Technology*, 27(3-4), 55-60.
- Bouchriti, N. & S.M. Goyal, 1993, Methods for Concentration and Detection of Human Enteric Viruses in Shellfish : A review, *Microbiologia*, 16 : 105-114.
- Croci, L., et al., 1999, Detection of Hepatitis A Virus in Shellfish by Nested INVERSE Transcription-PCR, *J. Food Microbiol.*, 48 :67-71.
- De Leon, *et al.*, 1992, Detection of Norwalk Virus in Stool Specimen by INVERSE Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and Non-Radioactive Oligoprobes, *Journal of Clinical Microbiology*, 30(12) : 3151-3157.
- Detection and Quantitation of Hepatitis A Virus in Shellfish by the Polymerase Chain Reaction, *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, U.S. Food, & Drug. Administration, Janvier 2001, 5 p.
- Dix, B.D. & L.-A. Jaykus, 1998, Virus Concentration Method for the Detection of Human Enteric Viruses in Extracts of Hard-Shelled Clam, *Journal of Food Protection*, 61(4) : 458-465.
- Gonin, P., M. Couillard et M.-A. d'Halewyn, 2000, Genetic Diversity and Molecular Epidemiology of Norwalk-Like Viruses, *The Journal of Infectious Diseases*, 182 : 691-697.
- Green, J. *et al.*, 1998, A Nested INVERSE Transcriptase PCR Assay for Detection of Small Round-Structured Viruses in Environmentally Contaminated Molluscan Shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (3) : 858-863.
- Jiang, X., *et al.*, 1993. Sequence and Genomic Organisation of Norwalk Virus, *Virology*, 195 :51-61.
- Jaykus, L.-A., R. De Leon & M.D. Sobsey, 1996, A Virion Concentration Method for Detection of Human Enteric Viruses in Oysters by PCR and Oligoprobe Hybridization, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (6) : 2074-2080.
- Jothikumar, N. *et al.*, 1998, Immunomagnetic Capture PCR for Rapid Concentration and Detection of Hepatitis A Virus from Environmental Samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2) : 504-508.
- Kellogg, J.S. *et al.*, 2001, Development of a INVERSE Transcription – PCR-DNA Enzyme Immunoassay for Detection of « Norwalk-Like » Viruses and Hepatitis A Virus in Stool and Shellfish, *Appl. Environ. Microbiol.* 67(2) : 742-749
- Lees, D.N. *et al.*, 1994, Development of a Method for Detection of Enteroviruses in Shellfish by PCR with Poliovirus as a Model, *App. Environ. Microbiol.* 57 : 2963-2968.

Lees, D.N. K. Henshilwood & W.J. Doré, 1994, Development of Method for Detection of Enteroviruses in Shellfish by PCR with Poliovirus as Model, *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8) : 2999-3005.

Le Guyader, F., *et al.*, 1994, Detection of Hepatitis A Virus, Rotavirus and Enterovirus in Naturally Contaminated Shellfish and Sediment by INVERSE Transcription-Seminested PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (10) : 3665-3671.

Lewis G.D. & T.G. Metcalf, 1988, Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A, A Virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water and Sediment Samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (8) : 1983-1988.

Medici De, D., *et al.*, 1998, Application of INVERSE Transcriptase-Nested-PCR for detection of poliovirus in mussels, *International Journal of Food Microbiology*, 40 :51-56.

Method for the Recovery and Assay of Enteroviruses from Sewage Sludge, Appendix H, Environmental Regulations and technology, EPA, EPA/625/R-92/013, 1992.

Pina, S. *et al.*, 1998, Viral pollution in the Environment and in Shellfish : Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9) : 3376-3382.

Remoulade, J.L., 1996, New Molecular Methods for the Detection of Hepatitis A and Norwalk Viruses in Shellfish, *Microbiologia SEM*, pp 1-10 (<http://morgat.udg.es/microbesem/>)

Richard, G.P., *et al.*, 1982, Rapid Methods for Extraction and Concentration of Poliovirus from Oyster Tissues, *Journal of Virological Methods*, 5 : 285-291.

Romero, J.R. & H.A. Rotbart, 1993, PCR Detection of Human Enterovirus, *Molecular Microbiology-Principles & Application*, ASM, Washintton, DC.

Rosenfield, S.I. and L.-A. Jaykus, 1999, A Multiplex INVERSE Transcription Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of Food borne Viruses, *J.Food Prot.* 62(10) : 1210-1214.

Schwab, K.J., R. De Leon & M.D. Sobsey, 1995, Concentration and Purification of Beef Extract Mock Eluates from Water Samples for the Detection of Enteroviruses. Hepatitis a Virus and Norwalk Virus by INVERSE Transcriptase-PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2) : 531-537.

Severini, G.M. *et al.*, 1993, Nested Polymerase Chain Reaction for High-Sensitivity Detection of Enteroviral RNA in Biological Samples, *J. Clin. Microbiol.*, 31(5) : 1345-1349.

Sobsey, M.D. *et al.*, 1978, Improved Methods for Detecting Enteric Viruses in Oysters, *Applied and Environmental Microbiology*, 36(1) : 121-128.

Traore, O. *et al.*, 1998, INVERSE Transcritase PCR Detection of Astrovirus, Hepatitis A Virus, and Poliovirus in Experimentally Contaminated Mussels : Comparison of Several Extraction and Concentration Methods, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8) : 3118-3122.

Vander Poel, W.H.M. *et al.*, 2000, Norwalk-Like Calicivirus Genes in Farm Animals, *Emerging Infections Diseases*, 6(1) : 36-41.

Yang, F. & X.Xun, 1993, A New Method of RNA Preparation for Detection of Hepatitis A Virus in Environmental Samples by Polymerase Chain Reaction, *Journal of Virological Mehtods*, 43 : 77-84.

14. APPROBATION

Christine Barthe, microbiologiste

Christine Duhaime, chargé qualité du module de microbiologie

Pierrette Cardinal, chef du Service de la microbiologie, des toxi-infections alimentaires et plaintes