

# RECHERCHE DE SALMONELLA EN ENVIRONNEMENT HYDRIQUE

## LES AVANTAGES DE LA PCR EN TEMPS RÉEL

Généralement, la recherche de la bactérie Salmonella en environnement hydrique s'effectue grâce à des méthodes microbiologiques traditionnelles extrêmement longues et complexes. Pour optimiser les temps de réponse et réduire les phases d'opération, le secteur biologique des Laboratoires du Groupe Hera a introduit la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR, Polymerase Chain Reaction). L'étude de cette méthode démontre la sensibilité et la spécificité élevées de cette technique.

Elisa Cavallari, Laura de Lellis, Eva Balzani, Isotta Lorenzi, Gian Piero Stefanelli\*

Le secteur biologique des laboratoires du Groupe Hera (Holding Energia Risorse Ambiente) effectue des contrôles microbiologiques sur la qualité des eaux dans les différentes phases du service hydrique intégré. Parmi ces contrôles, la recherche de Salmonella revêt une importance particulière car sa présence dans l'environnement hydrique est signe d'une contamination fécale. Le genre Salmonella (famille des Entérobactéries, Enterobacteriaceae) comprend plusieurs micro-organismes aérobie et anaérobie facultatifs, à Gram négatif, C8 estérase positives et qui ne fermentent pas le lactose. Il comprend des espèces pathogènes pour l'homme, pouvant provoquer des infections aux symptômes très graves, comme la fièvre typhoïde. Ces pathogènes se transmettent à l'homme à travers l'eau et les aliments contaminés. Les caractéristiques de qualité de l'eau superficielle destinée à la production d'eau potable sont définies dans le tableau 1/A de l'annexe 2 du Décret législatif 258/2000 : « Disposizioni correttive e integrative del decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152, in materia di tutela delle acque dall'inquinamento, a norma dell'articolo 1, comma 4, della legge 24 aprile 1998, n. 128 ». L'indication de référence prévoit l'absence de Salmonella spp. dans 5 000 ml pour les eaux de catégorie A1, soumises au traitement physique simple et à la désinfection, ainsi que son absence dans 1 000 ml pour les eaux de catégorie A2, soumises aux traitements physiques et chimiques normaux et à la désinfection.

L'absence de Salmonella est également la valeur limite fixée pour les eaux usées dans le Décret ministériel 185/2003 qui établit les conditions requises pour les eaux épurées destinées à la réutilisation : « Regolamento recante norme tecniche per il riutilizzo delle acque reflue in attuazione dell'articolo 26, comma 2, del decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152 ». Concernant les eaux potables, la recherche d'entérobactéries pathogènes, qui comprennent la Salmonella, est considérée comme supplémentaire dans l'avertissement du Décret législatif 31/2001, « Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano ». La Salmonella doit être constamment absente dans 1 000 ml. Le secteur biologique des Laboratoires Hera a utilisé pendant des années les méthodes microbiologiques traditionnelles de référence pour déterminer la présence de Salmonelle : la méthode ISS A 011A - Rapports Istisan 07/5 pour les eaux potables [1] et la méthode APAT IRSA CNR 7080 pour les eaux usées et superficielles [2]. Ces méthodes sont extrêmement longues et difficiles : elles prévoient un enrichissement préalable suivi d'un enrichissement sélectif, une isolation et l'identification biochimique et/ou sérologique des colonies suspectes. Le résultat de positivité pour la Salmonella nécessite ainsi un total de 6 - 7 jours. Le « temps humain » s'avère être considérable. De plus, si l'on prévoit une occupation continue pour l'analyse, le personnel technique doit également être présent les jours fériés. C'est ainsi qu'est né le besoin d'estimation d'une méthode alternative fiable, rapide, sensible et facile d'emploi, avec une utilisation réduite des

\*Laboratorio Unità Bologna  
Settore Ciclo Idrico, Hera Spa, Sasso Marconi (BO)

ressources humaines. Parmi les méthodes biomoléculaires alternatives, basées sur l'étude des séquences génétiques spécifiques de l'agent pathogène recherché, on s'est orienté vers la technique de la réaction en chaîne par polymérase (PCR, Polymerase Chain Reaction), déjà appliquée dans le domaine alimentaire [3], pour sa sensibilité élevée, sa spécificité, sa rapidité et sa possibilité d'automatisation. Les phases d'enrichissement, d'extraction et d'amplification de l'ADN prévues dans cette méthode nécessitent un temps total de deux jours pour l'obtention du résultat final, ainsi qu'une occupation réduite des opérateurs. La PCR est une réaction enzymatique d'amplification in vitro d'un segment d'ADN, que l'on obtient grâce à une Taq polymérase à partir d'une paire d'apprêts spécifiques, des séquences d'ADN à filament unique nécessaires pour l'amorce de la réaction. Cette technique permet d'amplifier un fragment d'ADN du micro-organisme cible, c'est-à-dire d'en créer in vitro un grand nombre de copies (jusqu'à plusieurs millions), rendant ainsi possible le relevé du pathogène de manière absolument spécifique. En particulier, la PCR en temps réel, adoptée par le Laboratoire Hera, permet d'amplifier les séquences d'ADN en suivant en temps réel la formation du produit d'amplification. Dans le système entièrement automatisé, le relevé des fragments d'ADN amplifiés s'effectue au moyen de l'enregistrement de l'émission de fluorescence générée au cours de la réaction d'amplification, grâce à l'hybridation de sondes hautement spécifiques (balises moléculaires, molecular beacons) marquées avec des fluophores (reporter), c'est-à-dire liées à des molécules fluorescentes (Figure 1 [4]). Les balises moléculaires ont une structure « en fourche », composée d'une anse (loop) et d'un trait à double hélice (stem) ; au moment où elles s'associent à la séquence complémentaire, elles s'ouvrent et émettent le signal de fluorescence, déclenché par l'éloignement du fluophore de son inhibiteur (quencher). On peut ainsi suivre seconde par seconde l'individualisation du pathogène. Le système adopté utilise deux niveaux de spécificité, des primers classiques et des balises, offrant un système unique de relevé extrêmement sensible.

### Matériel et méthodes

Les principes du protocole de validation pour le choix d'une nouvelle méthode peuvent se baser (UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 [5]) sur l'étude comparative entre la méthode alternative et la méthode de référence, réalisée à l'intérieur du laboratoire et/ou à travers des études interlaboratoires. Au sein du Laboratoire Hera, deux méthodes ont été comparées : la méthode de culture traditionnelle pour la recherche de Salmonella et la méthode PCR en temps réel qui utilise le thermocycleur Stratagene Mx3005P et le kit « Adiafood Rapid-Pathogen Detection system for Salmonella » d'AES CHEMUNEX

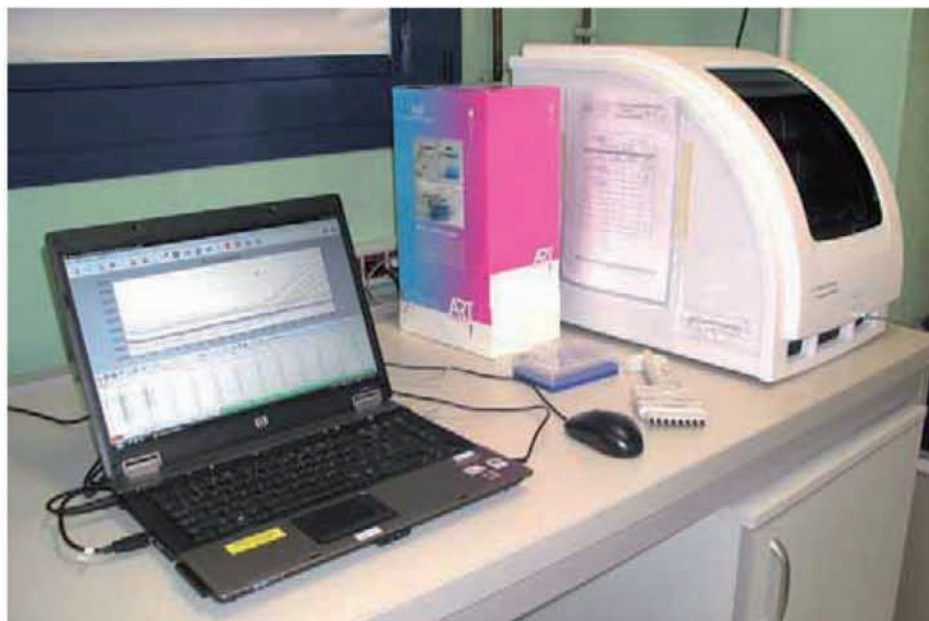
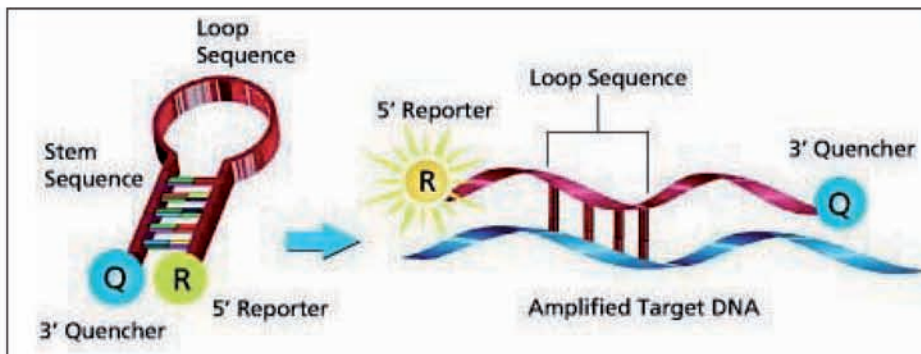


Figura 2 - Termociclature e PC con software integrato.

(Figure2).

### Méthode traditionnelle de référence

Enrichissement préalable : comprend l'enrichissement de 100 ou 1 000 ml de l'échantillon, selon la réglementation de référence, en eau peptonée tamponnée (EPT) pendant 18-24 heures à 36±1°C, après filtrage sur membrane stérile. Enrichissement sélectif : transfert d'une partie du bouillon d'enrichissement préalable dans le bouillon sélectif Rappaport Vassiliadis (RV) et incubation pendant 24+24 heures à 42±1°C. Isolation et identification : à partir du bouillon RV, on réalise deux sous-cultures successives pour des bandes multiples sur terrain d'isolement gélose entérique Hektoen (HEA, Hektoen Enteric Agar), la première après 24±2 heures d'incubation, la seconde après 48±2 heures d'incubation ; les plaques d'isolement sont ensuite mises en incubation pendant 24 heures à 36±1°C.

En cas de colonies présumées de Salmonella, vertes avec ou sans centre noir, on réalise l'essai du cytochrome oxydé, de la C8 estérase et de l'identification biochimique suivante avec les systèmes miniaturisés.

### Méthode alternative avec PCR en temps réel

Enrichissement préalable : identique à celui de la phase traditionnelle. Extraction de l'ADN : pour chaque échantillon, on soumet

à extraction deux prélèvements de 10 µl d'EPT sur la plaque de 96 petits puits en 90 µl du « mélange d'extraction » du kit. La réaction d'extraction, d'une durée de 20 minutes, se produit dans le thermocycleur Stratagene Mx3005P. Elle prévoit une première phase de 10 minutes à 40°C et une deuxième phase de 5 minutes à 95°C. À la fin, on effectue une centrifugation de 5 minutes à 1 800 rpm. Amplification et révélation (détection) : 10 µl de chaque prélèvement de l'ADN extrait sont insérés dans les bandes Flexiwell fournies dans le kit, reconstitués avec 15 µl de « mélange pour détection » contenant une Taq polymérase, des nucléotides et un tampon de réaction. Chaque échantillon est traité en double, sur la plaque d'extraction et sur la bande de détection : dans le premier petit puits, on retrouve des apprêts et une balise moléculaire spécifiques au pathogène ; dans le deuxième petit puits, on contrôle l'éventuelle inhibition de réaction (les apprêts et la sonde spécifiques au pathogène sont absents). Pour chaque cycle d'analyse, on insère 6 contrôles de réaction, fournis dans le kit et constitués de 3 contrôles négatifs (pour exclure les contaminations), 2 contrôles positifs (pour vérifier l'amplification survenue de l'ADN) et 1 contrôle d'inhibition (pour vérifier les inhibitions dues à l'effet matrice). Les bandes, fermées avec les bouchons optiques appropriés, doivent d'abord être agitées manuellement, puis avec le vortex pendant 1 minute, centrifugées pendant 1 minute à 1 800 rpm et insérées dans le thermocycleur pendant 1 heure et 30 minutes. Les conditions de réaction sont : 1 cycle d'activation de 15 minutes à 95°C et 40 cycles de dénaturation (15 secondes à 94°C), association (30 secondes à 55°C) et extension (15 secondes à 72°C). Au final, en vidéo, la plaque avec les résultats est mise en évidence. Si la réaction s'est bien produite, les contrôles sont indiqués en vert. Les échantillons négatifs sont indiqués en vert, tandis que le rouge signale les échantillons positifs. On retrouve en jaune les éventuels échantillons non amplifiés ou les doutes, pour lesquels il est nécessaire d'effectuer d'autres évaluations (répétition de l'analyse, etc.). Selon la spécificité du fournisseur, le kit utilisé permet l'amplification et le relevé de 166 souches de Salmonella. Il est intéressant de noter que, dans le cas où il ne serait pas possible d'effectuer immédiatement l'extraction de l'ADN à partir des échantillons, des parties du bouillon enrichi peuvent être conservées au réfrigérateur pendant une semaine. L'ADN extrait, s'il n'est pas immédiatement amplifié, peut lui aussi être conservé au réfrigérateur pendant une semaine.

## Résultats

L'étude menée par le Secteur biologique du Laboratoire Hera pour la validation de la méthode alternative avec la technique PCR en temps réel a prévu l'évaluation des éléments suivants : sensibilité, spécificité, limite minimale de relevé (détection), correspondance des résultats avec la méthode de référence, participation à des circuits interlaboratoires.

## Sensibilité et spécificité

L'évaluation de la technique PCR commence par la vérification de l'attribution correcte au groupe exact d'appartenance des échantillons positifs et négatifs selon la description de la norme Iso/Tr 13843 [6]. La sensibilité (fraction du nombre total d'échantillons positifs attribués de façon correcte au groupe d'appartenance) a été déter-

A		
Bacterial strain	Origin	PCR result
Salmonella typhimurium Atcc 14028	Hera collection	Present
Salmonella typhimurium Atcc 14028 a titolo noto		
Salmonella oranienburg	Ring study trial Lgc	
Salmonella infantis	Afnor	
Salmonella abony	Ring study trial Senate	
Salmonella nottingham	Ring study trial Unichim	
B		
Bacterial strain	Origin	PCR result
Enterococcus faecalis Atcc 29212	Hera collection	Absent
Escherichia coli Atcc 25922		
Staphylococcus aureus Atcc 25923		
Escherichia coli	Ring study trial Unichim 4	
Klebsiella pneumoniae		
Escherichia coli Atcc 13706	Hera collection	
Pseudomonas aeruginosa Atcc 27853		
Escherichia coli	Senate	
Escherichia coli	Ring study trial Senate 04	
Escherichia coli Nctc 9001	Ring study trial Unichim 5	

Table 1 - Quality Control using certified strains

Recovery trials				
	Nominal value (UFC)	Traditional YEA (UFC)	Traditional HEA (UFC)	PCR
Trials with pure culture	1	1	0	Present
	1	1	0	
	1	1	0	
	1	1	1	
	0,5	0	0	Present
	0,5	0	0	
	0,5	0	0	
	0,5	0	0	
	0,5	0	0	
	0,5	0	0	
	0,5	0	0	
	0,1	0	0	Present
	0,1	1	0	
	0,1	0	0	
0,1	0	0	Absent	
Trials with artificially contaminated samples	0,5 UFC/100 ml	0	0	Present
	0,1 UFC/100 ml	0	0	Absent
	0,05 UFC/100 ml	0	0	Absent
	0,01 UFC/100 ml	0	0	Absent

Table 2 – Recovery trials using pure cultures and artificially contaminated sa

minée grâce à l'analyse des échantillons artificiels préparés en laboratoire, au moyen de l'utilisation de souches connues de Salmonella, provenant de circuits interlaboratoires ou de l'American Type Culture Collection (ATCC), répertoriés dans le Tableau 1A. La spécificité (fraction du nombre total d'échantillons négatifs attribués de manière correcte) a été évaluée grâce à l'amplification de l'ADN extrait de souches connues non cibles (Tableau 1B). Les essais réalisés ont mis en évidence les sensibilité et spécificité extrêmes de la technique et du kit utilisés : aucun cas faussement positif ou faussement négatif ne s'est présenté, pas même en présence de micro-organismes semblables à la Salmonella.

Detection limits: sterile water contaminated with certified strain of Salmonella typhimurium				
Nominal value	No.Replicates	No. positive results PCR	No. positive results PCR	Note
0,5	10	10	0	positive samples = 100%
0,1	10	7	3	positive samples = 70%
Detection limits: Surface matrix contaminated with certified of Salmonella typhimurium				
Valore nominale	N° Repliche	N° Risultati positivi PCR	N° Risultati negativi PCR	Note
0,5	20	20	0	Campioni positivi = 100%
0,1	20	11	9	Campioni positivi = 55%

Table 3 - Limits of detection

## Essais de récupération et limite de relevé

Essais avec culture pure - Des dilutions scalaires de la souche ATCC 14028 de Salmonella typhimurium ont été réalisées dans le bouillon Brain Heart Infusion (Bhi), de façon à obtenir des solutions contenant des valeurs théoriques de 100 à 0,01 Unités Formant une Colonie (UFC)/10 µl : on a donc obtenu un signal positif en PCR jusqu'à la concentration de 0,1 UFC. On a ensuite procédé à l'exécution d'une autre série d'essais pour vérifier la récupération dans l'intervalle de 1 à 0,1 UFC (théorique), en comparant la méthode traditionnelle par rapport à la PCR en temps réel. On a analysé en PCR 4 répliques de la solution

Comparison: traditional method of detection HEA (APAT IRSA CNR 7080) vs. real-time PCR

Sample.#	Sample matrix	HEA traditional method	Rt - PCR
1	Drinking water	Absent	Absent
2		Absent	Absent
3		Absent	Absent
4		Absent	Absent
5		Absent	Absent
6	Natural underground water	Absent	Absent
7		Absent	Absent
8		Absent	Absent
9	Natural surface water	Present	Present
10		Present	Present
11		Present	Present
12		Present	Present
13		Absent	Absent
14		Present	Present
15		Absent	Present
16		Absent	Absent
17		Absent	Absent
18		Absent	Absent
19		Absent	Absent
20	Absent	Absent	
21	Absent	Present	
22	Waste water	Present	Present
23		Present	Present
24		Absent	Absent
25		Absent	Absent
26		Absent	Absent
27		Absent	Absent
28		Absent	Absent
29		Absent	Absent
30		Absent	Absent
31		Absent	Absent
32		Absent	Present
33		Absent	Absent
34		Absent	Absent
35		Absent	Present
36		Absent	Absent
37	Present	Present	

Table 4 - Comparison between traditional method using HEA isolation and real-time PCR

contenant 1 UFC, 7 répliques de la solution contenant 0,5 UFC et 4 répliques de celle contenant 0,1 UFC. Simultanément, on a réalisé des bandes multiples des 3 solutions sur terrain nutritif non sélectif d'agar à l'extrait de levure (YEA, Yeast Extract Agar) et sur terrain sélectif gélose entérique Hektoen (HEA, Hektoen Enteric Agar). Comme on peut le constater dans le tableau 2, la PCR, avec une concentration théorique de 0,1 UFC, offre une positivité dans 75 % des cas, contre seulement dans 25 % des cas en YEA et dans 0 % des cas en HEA, plus sélectif. Avec les concentrations de 1 et 0,5 UFC/10 µl, la PCR en temps réel a offert 100 % de positivité, contrairement aux autres méthodes. Les essais menés ont ainsi mis en évidence la très grande sensibilité de la technique alternative utilisée : le signal d'amplification s'approche de la limite théorique de 0,1 UFC. Un autre essai avec dix répliques d'un échantillon d'eau stérile contaminée avec 0,5 et 0,1 UFC de souche certifiée a confirmé que la limite de relevé (95 % de répliques positives) se vérifie entre ces deux concentrations (tableau 3). Essais avec échantillons artificiels - Pour évaluer l'effet de matrice également, on a réalisé des essais à l'aide d'échantillons artificiels constitués de 100 ml d'eau superficielle, déterminée comme négative avec la technique traditionnelle et la technique PCR, contaminée avec la souche ATCC 14028 de Salmonella typhimurium ; on a procédé de manière à avoir des niveaux de contamination bas (nombre théorique compris entre 0,01 et 0,5 UFC/100 ml). Au terme de l'enrichissement, on a prélevé une partie du bouillon pour l'analyse avec la PCR en temps réel. Une autre partie a été utilisée pour l'analyse traditionnelle, où on a utilisé, pour l'isolation, le terrain nutritif non sélectif YEA et le terrain sélectif HEA. Les résultats obtenus indiquent que seule la PCR relève la présence de Salmonella à la concentration théorique de 0,5 UFC (tableau 2). Dans le cas des échantillons artificiels également, on a réalisé l'analyse avec la technique PCR de vingt répliques à diverses concentrations (0,5 et 0,1 UFC) et on a pu noter que la limite de relevé (95 % de répliques positives) se vérifie entre ces deux concentrations (tableau 3).

## Correspondance entre la méthode traditionnelle et la PCR

On a analysé en parallèle 37 échantillons de diverses matrices (eaux superficielles, potables, profondes et usées) pour comparer la méthode PCR par rapport à la méthode classique, généralement employée pour le relevé de Salmonella dans les eaux. Comme on peut l'observer dans le tableau 4, on a obtenu une correspondance entre la technique traditionnelle et la PCR dans 89 % des échantillons ; dans les 11 % restants (4 échantillons), on a obtenu des résultats positifs avec la PCR et négatifs avec la méthode traditionnelle, ce qui confirme la récupération majeure de la PCR, déjà mise en évidence dans les essais précédemment décrits.

## Essais interlaboratoires

La norme UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 [5], p 5.4.5, comprend les comparaisons interlaboratoires entre les techniques utilisées pour déterminer les prestations d'une méthode, à

Ring study trials			
Sample	Date	PCR	Expected result
Unichim waste water	mar-10	Absent	Absent
Unichim waste water A6	mar-10	Absent	Absent
Lgc waste water surface	mar-10	Present	Present
Senate drinking W1-04-6	ott-10	Present	Present
Senate drinking1-04-65	ott-10	Presente	Present
Senate drinking W1-04-66	ott-10	Absente	Absent
Unichim wastte Mias 5A	ott-10	Absent	Absent
Unichim waste Mias 5B	ott-10	Present	Present

Table 5 - Ring study results

des fins de validation. La participation aux cycles d'essais inter-laboratoires « Agenti microbiologici nelle acque di scarico », gérés par Unichim, « Quality in Water Analysis scheme », gérés par Lgc, et « Senate Water Microbiology scheme », gérés par Did, a offert des résultats pleinement satisfaisants (tableau 5).

### Confirmation de culture des échantillons positifs en PCR

Tous les bouillons d'enrichissement préalables dérivés d'échantillons réels positifs avec la PCR en temps réel (jusqu'à présent, 38 échantillons) ont été isolés pour confirmation sur terrain sélectif gélose entérique Hektoen (HEA) et les colonies suspectes ont été confirmées par la présence de C8 estérase, via la réaction au 4-méthyl-umbelliféryl caprylate. Avec ces essais de confirmation sur 6 échantillons d'eau naturelle profonde, 23 échantillons d'eau superficielle e 9 reflux d'épuration, on a obtenu une correspondance du résultat dans 100 % des cas.

### Conclusions

En plus de donner d'excellents résultats, la technique de la PCR en temps réel, avec l'utilisation du kit « Adiafood Rapid-Pathogen Detection system for Salmonella » d'Aes Chemunex et du thermocycleur Stratagene Mx3005P, a pu analyser des échantillons d'eau de provenances diverses (superficielles, potables, profondes, usées) avec une avance considérable par rapport à la méthode traditionnelle. Rappelons en effet que l'obtention d'une réponse pour cette dernière nécessite 4 jours en cas d'absence de Salmonella et 6-7 jours de travail en cas d'échantillons avec résultat positif. Des tests de confirmation sont également nécessaires, exigeant des terrains sélectifs et des tests biochimiques et/ou sérologiques, avec des phases à cadence journalière.

### BIBLIOGRAPHY

- [1] Istisan reports 07/5. Analytical methods for water destined for human consumption pursuant to Legislative Decree 31/2001. Microbiological methods.
- [2] Apat Irsa Cnr 29/2003 Manual: Analytical methods for water, Vol.3.
- [3] AOAC Certificate of Performance Tested SM Status No. 070402 - Adiafood Rapid Pathogen Detection System for Salmonella.
- [4] [www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/DNA-probes/product-lines/molecular-beacons.html](http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/DNA-probes/product-lines/molecular-beacons.html).
- [5] UNI IEC EN ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- [6] ISO/TR 13843: 2000 Guidance on validation of microbiological methods



[www.aeschemunex.com](http://www.aeschemunex.com)