

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires

CHINA B., GHAFIR Y., DAUBE G.

Département des Sciences des Denrées Alimentaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bâtiment B43bis, 4000 Liège.

Correspondance :

Dr. Bernard China

Tél. 04/366 39 73 Fax : 04/366 40 16 Email : bchina@ulg.ac.be

RESUME : La qualité des aliments constitue une préoccupation essentielle de notre société de consommation. La prise de conscience par le grand public que la nourriture n'est pas stérile renforce encore le besoin de recourir à une analyse microbiologique rigoureuse des aliments. Les techniques mises en œuvre jusqu'à présent nécessitent la culture du germe recherché sur un milieu sélectif permettant de le différencier des autres germes. Cette procédure peut dans certains cas se révéler longue et l'interprétation parfois difficile. Pour améliorer ces techniques classiques, les techniques de biologie moléculaire basées sur l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN sont en plein développement. De plus, l'avènement de la PCR en temps réel ouvre de nouvelles perspectives car elle permet de quantifier le nombre de germes présent dans un échantillon. Cet aspect quantitatif est très important en microbiologie des denrées alimentaires. Ainsi, les outils de la biologie moléculaire devraient permettre de développer des tests diagnostiques rapides, sensibles, spécifiques et quantitatifs pour venir confirmer les résultats obtenus par les méthodes traditionnelles mais aussi pour permettre le diagnostic de microorganismes dont la croissance s'avère fastidieuse ou l'identification incertaine par la voie classique.

INTRODUCTION

GENERALITES (Gélinas, 1995)

Chaque jour, nous ingérons un grand nombre de microorganismes dans nos aliments. De part leur taille microscopique, ils sont invisibles à l'œil nu et représentent donc un danger invisible. Une minorité de ces microorganismes est pathogène. Pour bien saisir l'action des microorganismes pathogènes il faut d'abord bien connaître leurs propriétés dans les aliments. Ces organismes sont présents partout et se multiplient rapidement. Les aliments destinés à l'homme représentent des milieux de culture exceptionnels pour les microorganismes en général. Tout comme les humains, ces organismes ont leurs préférences alimentaires, ce qui signifie que tous les aliments ne sont pas contaminés de façon uniforme. Comment éviter la

multiplication des microorganismes dans les aliments? La réponse est simple mais la mise en œuvre difficile: en empêchant la présence ou la multiplication de ces microorganismes et/ou en les détruisant avant de consommer les aliments.

Il existe cinq façons classiques de maîtriser des microorganismes dans les aliments: en agissant sur la température, la disponibilité en eau, le pH, les inhibiteurs chimiques et la composition atmosphérique. Le contrôle de la température est le moyen le plus utilisé; c'est pour cette raison que les aliments les plus périssables sont conservés à basse température, de l'ordre de 4°C. Il faut être conscient que la plupart des réfrigérateurs ménagers ont des variations de températures importante et que certaines bactéries pathogènes sont capables de se multiplier à 4°C (*Yersinia entero-*

colitica, *Listeria monocytogenes*,...).

Les contaminations microbiennes constituent le risque majeur pour la santé relié aux aliments. Les autres problèmes concernent les produits chimiques, les toxines naturelles végétales, les mycotoxines et les corps étrangers.

La majorité des cas de toxi-infection d'origine microbienne répertoriées (95%) sont provoqués par des aliments préparés à la maison, au restaurant ou en institution. On estime à 5% le nombre de cas provoqués par des aliments produits en industrie. Les causes majeures des accidents sont par ordre d'importance: 1) la mauvaise réfrigération des aliments, 2) la consommation d'aliments crus, 3) l'entreposage prolongé des aliments, 4) la manipulation des aliments par des employés infectés, 5) le réchauf-

fage insuffisant des aliments, 6) l'emploi d'ingrédients contaminés, 7) le nettoyage inadéquat des surfaces de travail et 8) l'utilisation de reliefs de repas contaminés.

Les microorganismes pathogènes proviennent surtout de l'environnement, des humains et des animaux. Dans l'ordre, les principales sources de microorganismes pathogènes sont: 1) les matières fécales animales et humaines, 2) les écoulements du nez et de la gorge chez les humains, 3) les mains et les bras des humains, 4) le sol, la boue, les eaux de surface et 5) l'eau de mer.

Les maladies transmises par les aliments sont de deux types: les infections et les intoxications. Lors d'une infection, le microorganisme vivant envahit l'organisme. Lors d'une intoxication, la toxine préformée dans l'aliment est consommée directement sans que le microorganisme soit nécessairement présent ou encore le microorganisme forme la toxine dans les intestins sans envahir les tissus. Les risques pour la santé que présentent les microorganismes pathogènes dépendent des caractéristiques du microorganisme (résistance, capacité d'adhésion, antigènes et toxines) et de l'hôte (âge, statut physiologique, fatigue, facteurs génétiques, etc).

La dose moyenne de cellules à ingérer pour être malade est variable selon l'espèce bactérienne (tableau I). Pour bon nombre de bactéries, la dose dangereuse est élevée, de l'ordre de 10^6 cellules, ce qui signifie que les toxi-infections supposent beaucoup de négligence lors de la manipulation de l'aliment.

Plus de 90% des toxi-infections d'origine alimentaire dont le déterminisme est connu sont dues à des bactéries. Parmi celles-ci, les plus fréquentes sont: *Salmonella choleraesuis*, *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus* qui représentent 75% des cas rapportés (Gélinas, 1995). Mais, il existe 16 espèces bactériennes pathogènes fréquemment isolées des aliments (tableau I).

LA SITUATION EN BELGIQUE

En guise d'introduction, quelques résultats des analyses réalisées sous l'égide du laboratoire de microbiologie des denrées alimentaires de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège pour les quatre

Tableau I: les principales bactéries responsables de toxi-infections d'origine

alimentaire

Espèce	Pathologie	fréquence	danger	dose infectieuse (Log10)
<i>Salmonella choleraesuis</i>	gastro-entérite, diarrhée, crampes abdominales, fièvre, nausées, vomissements, céphalées septicémie avec envahissement des tissus (rare) fièvre entérique grave typhoïde (très rare)	+++	++/+++	1 à 7
<i>Clostridium perfringens</i>	Diarrhée, douleurs abdominales entérite nécrosante (rare)	+++	++	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vomissements et crampes abdominales violentes diarrhée et céphalée (parfois)	+++	+	>6
<i>Bacillus cereus</i>	diarrhée, crampes abdominales (type A) Vomissement (type B)	++	+	5 à 9 4 à 5
<i>Campylobacter jejuni</i>	gastro-entérite, diarrhée, douleurs abdominales, fièvre, céphalées envahissement des tissus, méningites (rare) syndrome pseudoappendiculaire (rare)	++	++	3
<i>Shigella spp.</i>	shigellose: douleurs abdominales, diarrhée dysenterie bacillaire: fortes fièvres, vomissements, douleurs abdominales vives, dysenterie.	++	++	1 à 2
<i>Escherichia coli</i>	diarrhées des touristes (ETEC) vomissements, crampes abdominales, dysenterie, HUS (EHEC) fièvres, vomissements, crampes et diarrhées (EIEC) Diarrhée, nausées, vomissements, crampes abdominales, céphalée et fièvre (EPEC)	++	++/+++	6 à 10 3
<i>Streptococcus spp.</i>	groupe A: maux de gorge, fièvre, rougeurs cutanées, diarrhée, vomissements. Groupe C: pharyngites groupe G: pharyngites	++	+	>8
<i>Vibrio vulnificus</i>	fièvre, baisse de la pression sanguine, problèmes hépatiques.	++	+++	4 à 6
<i>Listeria monocytogenes</i>	fatigue, fièvre modérée, Individus immunodéprimés: avortement, méningites, encéphalites.	++	+++	faible mais variable
<i>Yersinia enterocolitica</i>	fièvre, douleurs abdominales, diarrhées, syndrome pseudoappendiculaire	++	+	6
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra: diarrhée abondante, crampes abdominales, vomissements, deshydratation.	++	++	6 à 10
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	diarrhées liquides, douleurs abdominales, nausées, vomissements	++	++	5 à 9
<i>Clostridium botulinum</i>	botulisme: problèmes de vision, nausées, douleurs abdominales, constipation, asphyxie, paralysie généralisée.	+	+++	
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Diarrhée, Dysenterie	+	+	6
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Diarrhée	+	+	6

dernières années en ce qui concerne les agents zoonotiques suivants: *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *Escherichia coli* enterohémorragiques (EHEC) de sérotype O157H7 et *L. monocytogenes* sont présentés au tableau II.

Tableau II: Résumé des résultats obtenus au laboratoire de Microbiologie des denrées alimentaires

Germe	année	source	nombre d'analyses	nombre de positifs	pourcentage de positifs
salmonella spp	1997	porc	360	83	23
salmonella spp	1998	porc	454	87	19
salmonella spp	1999	porc	154	43	28
salmonella spp	2000	porc	991	211	21
salmonella spp	1997	volaille	120	34	28
salmonella spp	1998	volaille	151	35	23
salmonella spp	1999	volaille	139	31	22
salmonella spp	2000	volaille	254	33	13
salmonella spp	1997	bœuf	120	5	4,2
salmonella spp	2000	bœuf	488	30	6,1
Campylobacter spp	1997	porc	50	15	3
Campylobacter spp	1998	porc	145	7	5
Campylobacter spp	1999	porc	149	3	2
Campylobacter spp	2000	porc	308	4	1,3
Campylobacter spp	1999	volaille	402	247	61
Campylobacter spp	2000	volaille	764	201	26
Campylobacter spp	1997	bœuf	60	0	0
Campylobacter spp	2000	bœuf	488	3	0,6
E. coli O157	1998	bœuf	6010	27	0,45
E. coli O157	1999	bœuf	2958	80	2,7
E. coli O157	2000	bœuf	1988	7	0,3
Listeria monocytogenes	2000	bœuf	488	78	16
Listeria monocytogenes	2000	porc	1215	156	13

LE DIAGNOSTIC CLASSIQUE

La recherche d'un microorganisme dans un aliment est basée sur une méthodologie similaire. La première étape consiste en un pré-enrichissement : l'aliment est homogénéisé dans un milieu riche (eau peptonée tamponnée, etc.) et incubé de 12 à 24 h. A l'issue de cette étape, toutes les bactéries recherchées mais aussi les autres bactéries de l'échantillon se sont multipliées. Lors de l'enrichissement, il s'agit maintenant de minimiser la croissance des bactéries associées au prélèvement et de favoriser la multiplication de la bactérie recherchée. On utilise un milieu liquide sélectif et l'incubation dure environ 24 h à 48 h. L'isolement enfin, il s'agit également d'une phase sélective mais sur milieu solide en boîte de Pétri. Les boîtes sont ensuite incubées environ 24h à la température adéquate. L'identification, les souches pures se développant sur le milieu sélectif solide sont confirmées pour leur appartenance à l'espèce bactérienne recherchée soit en utilisant des galeries biochimiques, soit des tests sérologiques. Cette identification peut être longue (48 heures). Le diagnostic classique dure donc en moyenne une semaine. Pour dénom-

brer les germes, la technique consiste à inoculer sur un milieu solide sélectif une suspension réalisée à partir de l'aliment et de compter les colonies caractéristiques obtenues après incubation.

LES METHODES MOLECULAIRES

L'AMPLIFICATION GENETIQUE PAR PCR

En 1983, un processus simple dans le concept d'amplification du nombre de fragments d'ADN présents dans un échantillon fut développé par Mullis (1990). En 1989, cette technique fut décrétée "développement scientifique majeur" de l'année (Guyer et Koshland., 1990). Ce processus est appelé "*Polymerase Chain Reaction*" (PCR). Très rapidement, la PCR est devenue la méthode de choix pour l'amplification de l'ADN. La technique est basée sur la répétition d'un processus en trois étapes (figure 1): la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin, l'hybridation des amorces à l'ADN simple brin et l'extension enzymatique des amorces par une ADN polymérase

thermostable qui synthétise un brin d'ADN complémentaire à celui servant de cible pour les amorces oligonucléotidiques. Ce processus peut être cyclisé grâce à l'utilisation de la polymérase thermostable qui résiste à l'étape de dénaturation. Il en résulte une amplification de type exponentielle du fragment d'ADN bordé par les deux amorces (Van Brunt, 1990). Ainsi, l'utilisation d'une enzyme thermostable, la Taq polymérase isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, a permis une semi-automatisation du processus d'amplification qui est depuis largement utilisé dans les laboratoires de recherche (Innis, 1990). Les points faibles de la PCR sont : la susceptibilité aux contaminations par de l'ADN étranger qui peut être amplifié avec l'échantillon et la présence d'inhibiteurs (Cimino *et al.*, 1991). En effet, si on travaille à partir de matrices complexes comme la nourriture, le sang ou les matières fécales, il est possible que ces échantillons contiennent des inhibiteurs de la réaction de PCR qu'il faudra éliminer avant la PCR (Wilson, 1997). Les facteurs qui inhibent l'amplification des acides nucléiques par la PCR sont présents avec l'ADN isolé de sources

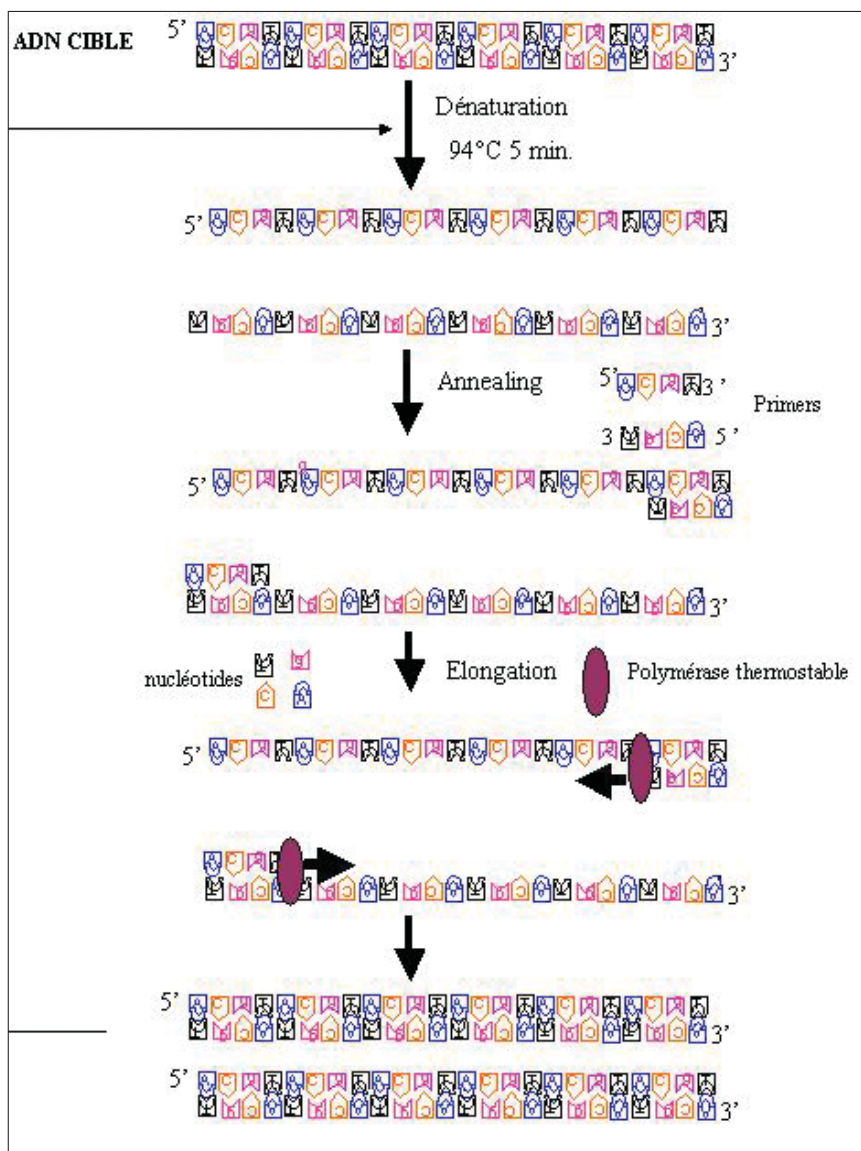


Figure 1: Principe de la PCR.

Il s'agit d'une réaction en trois étapes. (i) La dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin par la chaleur (ii) l'hybridation ou l'hybridation des amorces (primers) par diminution de la température sous leur température d'hybridation (iii) l'élongation des amorces par une ADN polymérase thermostable. Ce processus peut subir une "cyclisation" qui de traduit par une augmentation exponentielle du nombre de molécules d'ADN amplifiées.

diverses. Les inhibiteurs agissent principalement à une ou plusieurs des trois étapes essentielles: ils interfèrent avec la lyse de la cellule nécessaire à l'extraction d'ADN, ils interfèrent en dégradant ou en capturant l'ADN et ils inhibent l'activité de la polymérase. Bien qu'un grand nombre d'inhibiteurs ait été rapportés, leurs modes d'action restent pour la plupart obscurs. Ces effets peuvent avoir des implications importantes pour les investigations cliniques ou de santé publique, surtout si les études impliquent des analyses d'aliments ou à partir de l'environnement. Les inhibiteurs classiques regroupent différents composés des fluides corporels et des réactifs rencontrés en clinique ou en médecine légale (par

exemple: l'hémoglobine, l'héparine ou l'urée), les constituants alimentaires (composés organiques ou phénoliques, glycogène, graisse et Ca^{2+}) et des composés de l'environnement (composés phénoliques, métaux lourds, ...). D'autres inhibiteurs très répandus incluent les constituants de la membrane des bactéries, l'ADN étranger, et du matériel de laboratoire comme le pollen, le talc des gants, certains plastics et la cellulose.

Si la PCR est habituellement décrite comme une méthode sensible qui peut se révéler délicate en raisons des faux positifs résultant de contaminations, ceci peut être évité grâce à divers traitements (irradiation aux UV, utilisation d'hypochlorite de sodium ou par des méthodes photo-

chimiques et enzymatiques).

Un autre problème sous-estimé de la PCR est l'inhibition de la réaction. Elle peut être totale ou partielle et peut se manifester par une réaction totalement inefficace ou par une réduction de la sensibilité de la détection. Dans certains cas, l'inhibition peut donner naissance à des faux négatifs si on omet d'incorporer un contrôle interne de PCR. Rossen et collaborateurs (1992) contribuèrent à l'étude la plus complète en matière d'inhibition de la PCR, en identifiant les inhibiteurs des aliments, des milieux de culture et de divers composés chimiques. Ces inhibiteurs incluent des produits chimiques organiques et inorganiques, des détergents, des antibiotiques, des tampons, des enzymes, des polysaccharides, des graisses et des protéines. Il est possible de se débarrasser des inhibiteurs en utilisant une méthode de préparation de l'ADN basée sur la chromatographie d'affinité (billes magnétiques ou colonnes) ou en utilisant après une préparation d'ADN grossière (*boiling*) une résine fixant les inhibiteurs (Chelex 100).

La PCR a fait progressivement son apparition dans les laboratoires de diagnostic microbiologique (Hill, 1996; Whelen et Persing, 1996; Rodriguez, 1997).

L'analyse comprend diverses étapes: la préparation de l'ADN qui peut être directe à partir de l'aliment (Soumet *et al.*, 1994; Lampel *et al.*, 2000) ou plus classiquement après pré-enrichissement (Wang *et al.*, 1997). Les techniques d'extraction varient de la plus simple (pas d'extraction, on pique une colonie directement dans le mélange de PCR), à la plus poussée (utilisations de trousse d'extraction basées sur une chromatographie d'affinité). Les coûts de ces diverses méthodes ne sont pas non plus les mêmes, une extraction par trousse peut varier entre 1 et 4 euros. La seconde étape est de réaliser la réaction de PCR qui inclut: une ADN polymérase thermostable (de nombreuses variantes sont commercialisées avec des performances variables), des nucléotides (à une concentration finale de l'ordre de 200 mM), le tampon de l'enzyme, du MgCl_2 (entre 1,5 et 3 mM en concentration finale) qui sert de cofacteur à l'enzyme, des amorces oligonucléotidiques (entre 15 et 30 mers à une

concentration finale de l'ordre de 200 μ M), de l'ADN (environ 10 ng) et d'eau. Le choix des amorces est particulièrement important. Il faut partir d'une séquence d'ADN, mais les banques de séquences (GenBank, EMBL,...) sont de mieux en mieux fournies. De plus, des logiciels informatiques sont disponibles pour sélectionner les meilleures amorces (Oligo™, Primer3,...). Ils tiennent compte des facteurs suivants : absence de structures secondaires, absence de complémentarité entre amorces, température d'hybridation proche,... Le choix de la séquence est aussi important : gène de virulence ou gène de maintenance (*house keeping*

gene). Le tableau III reprend des exemples de PCR développées pour certains germes responsables de toxi-infections d'origine alimentaire. La réaction de PCR se déroule dans un *thermocycler* qui est composé d'un bloc chauffant dont la température est réglée le plus souvent par effet Peltier. Ceci permet au bloc de varier sa température très rapidement. L'efficacité de la PCR dépend aussi de la qualité du *thermocycler*. Dans le cadre du projet européen QLK1-CT-1999-00226 "*validation and standardisation of diagnostic polymerase chain reaction for detection of food-borne pathogens*" dont le laboratoire est partenaire, une étude sur six *ther-*

mocyclers a été réalisées. Les performances des 6 *thermocyclers* sont très différentes surtout en terme de différence entre la température à atteindre et la température réellement atteinte dans les tubes ainsi qu'en ce qui concerne l'uniformité de la température sur l'ensemble du bloc (Hoorfar, 2001). Enfin, la dernière étape consiste en la détection du produit de PCR. Dans les laboratoires de recherche, la technique la plus utilisée est l'électrophorèse en gel d'agarose suivie de la détection du produit par coloration de l'ADN au bromure d'éthidium et visualisation au transilluminateur aux UV. Le bromure d'éthidium est une substance intercalaire qui se fixe à l'ADN absorbe la lumière vers 300 nm et émet dans l'orange. Cette technique a comme avantage de permettre l'estimation de la taille des produits de PCR par rapport à un standard de poids moléculaires ainsi que de pouvoir vérifier la présence de produits d'amplification non spécifiques. Le problème majeur de cette technique est l'usage du bromure d'éthidium qui est un carcinogène puissant. Son usage dans les laboratoires de routine reste problématique. D'autre part, la procédure de détection est longue et fastidieuse surtout si on a beaucoup d'échantillons à analyser. Des gels précolés existent et le bromure d'éthidium peut être remplacé efficacement par le nitrate d'argent par exemple ou d'autres colorants (sybrgreen®). Pour les laboratoires de routine, d'autres techniques plus adaptées sont envisagées comme la PCR-ELISA ou la PCR en temps réel.

Tableau III: Exemples de PCR pour la détection de bactéries responsables de toxi-infections d'origine alimentaire

Bactérie	Gène cible	Références
Bacillus cereus	Hly	Wang <i>et al.</i> , 1997 ; Kim <i>et al.</i> , 2000
Campylobacter jejuni	flaA	Waage <i>et al.</i> , 1999
Campylobacter jejuni	16S	Waller et Ogata, 2000
Clostridium perfringens	cpe	Miwa <i>et al.</i> , 1998 ; Ridell <i>et al.</i> , 1998 ; Schoepe <i>et al.</i> , 1998
EHEC*	eae	Meng <i>et al.</i> , 1996; Oberst <i>et al.</i> , 1998; Fratamico <i>et al.</i> , 2000
EHEC	fliC	Fratamico <i>et al.</i> , 2000
EHEC	stx1	Jinneman <i>et al.</i> , 1995, Weagant <i>et al.</i> , 1999; Fratamico <i>et al.</i> , 2000
EHEC	stx2	Jinneman <i>et al.</i> , 1995, Weagant <i>et al.</i> , 1999; Fratamico <i>et al.</i> , 2000
EHEC	hly	Fratamico <i>et al.</i> , 2000
EHEC	HlyA	Wang <i>et al.</i> , 1997
Listeria monocytogenes	HlyA	Fluit <i>et al.</i> , 1993
Listeria monocytogenes	Dth-18	Wernars <i>et al.</i> , 1991
Listeria monocytogenes	HlyA	Furrer <i>et al.</i> , 1991; Bansal, 1996; Bickley <i>et al.</i> , 1996; Nogva <i>et al.</i> , 2000
Listeria monocytogenes	prfA	Dickinson <i>et al.</i> , 1995
Salmonella	16S	Lin et Tsen, 1996
Salmonella	invA	Rahn <i>et al.</i> , 1992; Cocolin <i>et al.</i> , 1998
Salmonella	ompC	Kwang <i>et al.</i> , 1996
Salmonella	ompC	Kwang <i>et al.</i> , 1996
Shigella	ipaH	Sethabutr <i>et al.</i> , 1993
Vibrio cholerae	ctx	Fields <i>et al.</i> , 1992
Yersinia enterocolitica	yst	Ibrahim <i>et al.</i> , 1997; Vishnubatlal <i>et al.</i> , 2000
Yersinia enterocolitica	ail	Fenwick et Murray, 1991; Bhaduri <i>et al.</i> , 1997; Jourdan <i>et al.</i> , 2000
Yersinia enterocolitica	virF	Bhaduri <i>et al.</i> , 1997; Weagant <i>et al.</i> , 1999
Yersinia enterocolitica	yadA	Fredriksson <i>et al.</i> , 1999; Weagant <i>et al.</i> , 1999

*EHEC: Escherichia coli enterohémorragique

La PCR-ELISA

Cette technique permet une détection du produit de PCR en utilisant un lecteur de microplaques utilisés pour les tests ELISA. La PCR est classique si ce n'est l'utilisation d'une des amorces qui est biotinylée. Le produit de PCR est immobilisé dans des plaques multipuits recouvertes de streptavidine (grâce à l'affinité entre la streptavidine et la biotine). La détection du produit de PCR se fait en utilisant une sonde spécifique du produit recherché. Cette sonde est marquée avec une molécule cible (digoxigénine, fluorescéine,...). L'hybridation de la sonde est mise en évidence en utilisant un anticorps couplé à une enzyme (peroxydase,

phosphatase alcaline) et dirigé contre la molécule cible de la sonde. La fixation de l'anticorps est alors révélée et par une réaction enzymatique. Cette technique est assez fastidieuse car elle implique plusieurs opérations postérieures à la PCR mais elle permet de tester de nombreux échantillons dans un format de microplaques et en utilisant le matériel de détection de type ELISA. Il en résulte que c'est une technique facilement utilisable dans la plupart des laboratoires de routine (Fach *et al.*, 2001).

LA PCR QUANTITATIVE (Orlando *et al.*, 1998)

L'application directe des tests d'analyse génétique au diagnostic des maladies infectieuses sans amplification préalable a souvent le désavantage d'être peu sensible. Les techniques d'amplification de l'ADN augmentent considérablement la sensibilité tout en gardant une bonne spécificité. La PCR décrite en 1985 (Saiki *et al.*, 1985) est la méthode la plus utilisée pour l'amplification d'ADN, elle a conquis un rôle central dans les laboratoires d'analyses cliniques. Cependant, les caractéristiques de la PCR, telle qu'elle est traditionnellement utilisée ne permettent pas de quantifier le nombre de molécules d'ADN cible présente dans l'échantillon de départ. Même de faibles différences dans l'efficacité de l'amplification peuvent grandement affecter la quantité de produits finaux en raison de la nature exponentielle du processus (Zimmermann et Mannhalter, 1996). A côté des paramètres contrôlables (ADN cible, Taq polymérase, dNTPs, MgCl₂, amorces, tailles et nombres des cycles, température d'hybridation, etc), un certain nombre de variables incontrôlables principalement liées à la qualité de l'ADN peuvent aussi exister (Diviacco *et al.*, 1992).

Récemment, plusieurs approches ont permis de réaliser des PCR quantitatives (Foley *et al.*, 1993; Ferré, 1994; Cross, 1995).

De quoi s'agit-il ? Ce terme désigne toute technique de PCR qui permet une mesure fiable de la quantité d'une cible spécifique d'ADN dans un échantillon biologique. On distingue la PCR quantitative relative de la PCR quantitative absolue.

La PCR quantitative relative

La quantification relative est utilisée pour comparer les différences entre acides nucléiques cibles dans un échantillon biologique. Ceci est particulièrement pertinent quand la PCR quantitative est surtout appliquée à la mesure des variations temporelles et fonctionnelles des molécules d'ARN messagers (Haberhausen *et al.*, 1998) chez les eucaryotes ou les procaryotes. La mesure de l'expression d'un gène dans des cellules en culture est un exemple typique où la quantification absolue n'est pas nécessaire. Dans des cellules en culture, la quantité totale d'ARN produite est fonction de multiples variables et une quantification satisfaisante peut être obtenue par comparaison avec un contrôle interne ou avec un échantillon de calibration. C'est aussi le cas si on s'intéresse au rapport existant entre deux types de bactéries présentes dans un même échantillon.

Un gène de référence peut être testé séparément ou ensemble avec une cible inconnue et leurs rapports finaux peuvent être évalués. Le gène de référence peut être un acide nucléique endogène ou exogène. Dans les deux cas, cette approche a l'avantage de compenser les grandes variabilités de l'efficacité de la transcription inverse qui doit transformer l'ARNm en ADN avant PCR. L'expression d'un gène de maintien (actine, GAPDH, ARN ribosomal,...) est communément utilisée comme référence endogène. Mais certains auteurs rapportent des différences dans l'expression de ces gènes selon les lignées cellulaires, les tissus ou les cycles cellulaires. De plus, leur expression est souvent élevée par rapport à l'expression du gène étudié et, dans ce cas, l'efficacité de l'amplification peut différer entre le gène de référence et le gène étudié. Alternativement, on peut utiliser un ARNm exogène qui sera amplifié en même temps que la cible avec comme avantage que la quantité d'ARNm de référence peut être ajustée pour obtenir une efficacité d'amplification proche de celle de la cible. Dans chacun des cas, l'utilisation d'un gène de référence est basée sur l'utilisation de paires d'amorces différentes qui peuvent causer des différences dans l'efficacité de l'amplification. Il est donc important de réaliser la comparaison en phase exponentielle et d'analyser les deux gènes dans le même tube,

afin de minimiser les causes de variabilités.

L'utilisation de la quantification relative pour les mesures d'ADN est limitée à certaines études cliniques. Dans ces cas, la co-amplification de deux gènes dans le même tube avec deux paires d'amorces (PCR différentielle) permet de mesurer leur rapport. Cette approche a été utilisée pour détecter des délétions et des duplications dans le gène de la dystrophine (Abbs et Bobrow, 1992), pour détecter le virus HIV-1 (Pang *et al.*, 1990) ou de l'ADN tumoral (Frye *et al.*, 1989).

La quantification absolue

La mesure dans la PCR du nombre exact de copies d'une cible d'acide nucléique peut être réalisé en utilisant un matériel de référence doté de propriétés spécifiques. Il doit être le plus proche possible en taille et en structure et en concentration de la cible de manière à avoir une efficacité d'amplification similaire. Ceci peut se réaliser si le matériel de référence est amplifié avec les mêmes amorces que la cible mais peut être distingué de celle-ci par quelques modifications biochimiques mineures (Gilliland *et al.*, 1990). Ce réactif appelé le compétiteur est la base des méthodes de PCR compétitive (Siebert et Larrick, 1993; Clementi *et al.*, 1994). Dans ce cas, la quantité d'ADN cible est exprimée non plus sous forme d'un rapport mais d'une concentration ou d'un nombre de copies.

La PCR compétitive

Il s'agit d'ajouter à l'échantillon un ADN compétiteur, agissant comme standard interne, qui est amplifié par les mêmes amorces et qui se comporte de la même façon que l'ADN cible durant la réaction de PCR. Il faut cependant pouvoir différencier les deux produits d'amplification. La quantification se déroule en comparant le signal de la cible à celui du compétiteur dont la quantité est connue. L'idée est que si l'efficacité de la PCR est identique pour les deux amplicons, on peut déduire la concentration du produit de PCR cible en se basant sur le rapport des signaux et la quantité de compétiteur ajouté. La détection peut se faire sur gel d'agarose et densitométrie ou par PCR-ELISA en utilisant des sondes spécifiques différentes pour chaque

amplicon. L'important est de bien choisir son ADN compétiteur. Les ADN compétiteurs proviennent en général d'une manipulation de génie génétique. On peut par mutagenèse dirigée introduire un site de restriction dans l'ADN cible. Après amplification, on fait la différence entre l'ADN cible et le compétiteur par digestion du produit de la PCR au moyen de l'enzyme de restriction. Mais il faut être sûr du bon fonctionnement de cette digestion. Une variante consiste à introduire une ou plusieurs petites modifications par mutagenèse dirigée. Après amplification, ces modifications seront détectées par hybridation en utilisant des sondes spécifiques ou en utilisant des techniques électrophorétiques comme la SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). L'approche la plus simple est d'introduire une petite délétion ou insertion au centre de l'amplicon. La variation en taille ne doit pas excéder 15% de la taille originale pour conserver la même efficacité de PCR.

Les compétiteurs peuvent être utilisés comme standards externe ou interne. Dans le premier cas, on réalise une courbe de calibration, mais il faut se méfier des variations de tube à tube durant la PCR.

Toutes ces techniques décrites sont des méthodes en point final, on analyse les résultats en fin de PCR. De nouveaux développements technolo-

giques permettent de réaliser la PCR en temps réel en suivant l'amplification au cours des cycles.

La PCR en temps réel (Jung *et al.*, 2000)

La PCR en temps réel permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification. Le principe est d'utiliser un marquage fluorescent du produit de PCR. Le fluorochrome est ajouté à la réaction de PCR. La réaction de PCR et la détection du produit de PCR sont donc simultanées. L'appareil de PCR en temps réel n'est autre qu'un *thermocycler* classique sur lequel vient s'ajouter un détecteur de fluorescence. L'appareil mesure l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. On réalise une courbe d'étalonnage avec des échantillons de concentrations connues. On réalise une courbe du "cycle *threshold*" (Ct) en fonction du logarithme du nombre de copies (Figure 2). Le Ct est défini comme le cycle de PCR auquel on observe une augmentation du signal de égale à 10 fois la déviation standard de la ligne de base (cycle 3 à 15).

Habituellement on observe une excellente linéarité sur sept ordres de grandeur ce qui permet de mesurer le nombre de copies dans une gamme très large de quantités. Pour la détection de l'amplicon, on peut utiliser un marquage non spécifique ou spécifique.

Le marquage non spécifique utilise comme fluorochrome le SybrGreen® (Schneeberger *et al.*, 1995) qui se lie spécifiquement à l'ADN bicaténaire. L'avantage de cette méthode est son faible coût. Le désavantage de ce processus est son manque de spécificité dû au fait que le fluorochrome se liera indifféremment aux produits de PCR spécifiques et non spécifiques. On peut circonscrire ce problème en réalisant après la PCR une courbe de dissociation. On augmente progressivement la température et on observe la diminution de la fluorescence due à l'apparition d'ADN monocaténaire en fonction de la température. La dérivée première de cette courbe permet de déterminer le Tm (température de fusion) du produit de PCR, on peut ainsi comparer ce Tm au Tm théorique du produit attendu.

Une autre méthode est d'utiliser une détection spécifique du produit de PCR recherché. Parmi ces techniques spécifiques, on trouve l'utilisation des sondes TaqMan (*Applied Biosystems*) basée sur l'activité exonucléasique 5'-3' de la Taq polymérase (Holland *et al.*, 1991). La sonde spécifique est marquée deux fois : un fluorochrome quencher situé en 3' et un fluorochrome reporter en 5' (Figure 3). Dans cette configuration, la fluorescence émise par le reporter est absorbée par le quencher situé dans son voisinage et aucune fluorescence n'est détectée. Au cours de la polymérisation, la Taq polymérase

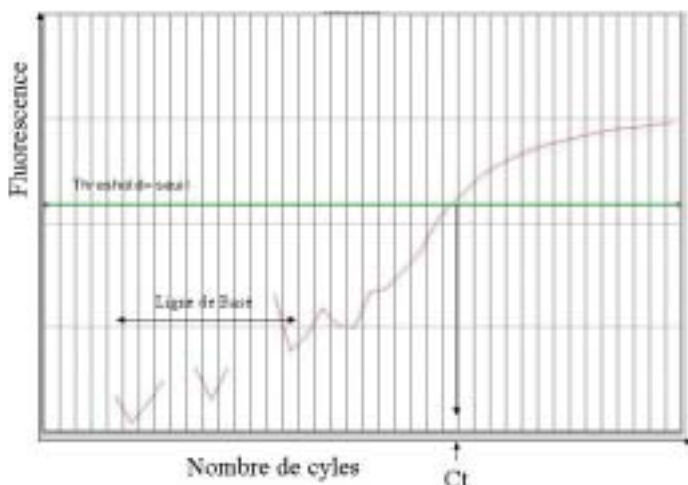


Figure 2 : Principe de la PCR en temps réel. La fluorescence associée au produit de PCR est mesurée au cours des cycles, c'est-à-dire au cours du temps. On calcule le moment, c'est-à-dire le cycle (Ct) où la fluorescence dépasse un seuil donné. Le Ct est directement proportionnel à la quantité d'ADN.

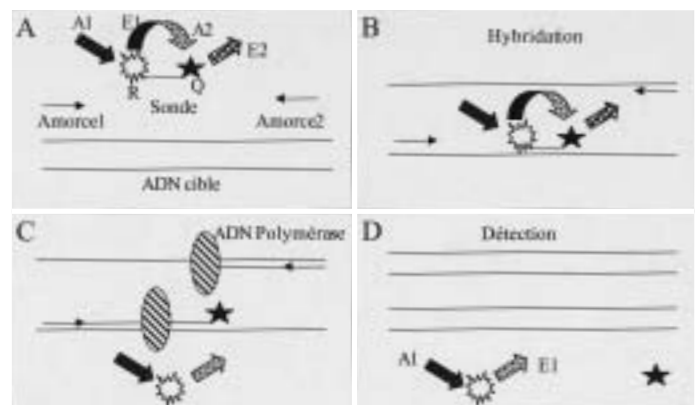


Figure 3 : Fonctionnement d'une sonde Taqman. A : La sonde est marquée par un fluorophore reporter (R) et un fluorophore "quencher" (Q). La sonde est libre en solution, la fluorescence émise par le reporter (E1) est absorbée par le quencher (A2) qui émet de la lumière (E2) à une longueur d'onde différente de celle du détecteur. Le bilan de l'opération est que très peu de fluorescence est détectée par l'appareil. B : La sonde se fixe sur l'ADN cible entre les positions de fixation des amorces de la PCR. Le détecteur n'enregistre toujours pas de fluorescence car le reporter et le quencher sont physiquement proches. C : Lors de l'étape d'élongation, l'ADN polymérase par son activité exonucléasique 5' à 3', va dégrader la sonde, il en résulte que le reporter se trouve éloigné du quencher qui ne peut plus absorber la fluorescence qui peut être détectée par l'appareil. D : En fin d'élongation, la fluorescence E1 est mesurée. On constate que la fluorescence sera directement proportionnelle au nombre de molécules d'ADN amplifié.

dégrade la sonde située sur son chemin et libère le reporter du *quencher*. La fluorescence associée au fluorochrome reporter ainsi mesurée est proportionnelle à la quantité de produit généré (Livak *et al.*, 1995). Une autre technologie utilisée est appelée le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (Figure 4) (Wittwer *et al.*, 1997). Deux oligonucléotides spécifiques du produit de PCR s'hybrident en tandem sur le produit de PCR durant l'étape d'hybridation. La sonde amont est marquée en 3' avec un fluorochrome (F1) et la sonde aval est marquée en 5' avec un fluorochrome reporter (F2). Les deux fluorochromes sont donc proches l'un de l'autre. Après hybridation des deux sondes, l'excitation de F1 entraîne le transfert de l'énergie émise par F1 à F2 qui va émettre à son tour et la fluorescence de cette émission est mesurée. Ce signal est proportionnel aux nombres de molécules cibles présentes. Une troisième technologie utilise des sondes particulières appelées

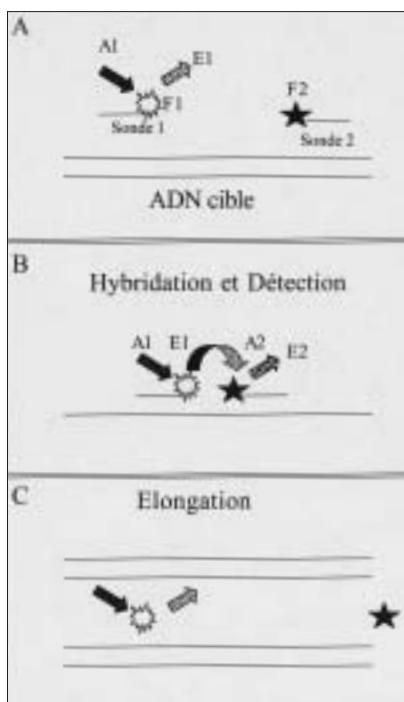


Figure 4 : Principe du FRET : A : Les deux sondes sont en solution, l'une marquée par le fluorophore 1 (F1), l'autre par le fluorophore 2 (F2). On choisit, le fluorophore 2 de telle manière qu'il absorbe la fluorescence émise par le fluorophore 1 (E1=A2). B : Les deux sondes s'hybrident à l'ADN cible, plaçant le fluorophore 1 à côté du fluorophore 2. La machine excite le fluorophore 1 (A1) qui émet de la fluorescence (E1) absorbée par le second qui émet de la fluorescence de longueur d'onde plus élevée (E2). C'est cette dernière fluorescence qui est mesurée. C : Les sondes sont dégradées par l'ADN polymérase et plus aucune fluorescence n'est émise par le fluorophore 2, en raison de son éloignement par rapport au fluorophore 1

les "molecular beacons" (Tyagi et Kramer., 1996; Tyagi *et al.*, 1998). Les "molecular beacons" (Figure 5) possèdent trois domaines fonctionnels (i) un quencher et un reporter aux extrémités 3' et 5' de la molécule (ii) de courtes séquences complémentaires aux extrémités 5' et 3' de la molécule permettant la formation d'une structure en épingle à cheveux, (iii) un région centrale complémentaire du produit de PCR à détecter. En dessous de la température d'hybridation la molécule se trouve en position fermée, le *quencher* se trouve proche du reporter et aucune fluorescence n'est détectée. Si le *molecular beacon* s'associe au produit de PCR ou est détruit, le *quencher* est éloigné du reporter et la fluorescence peut être mesurée. Ce type de sonde augmente grandement la spécificité de l'hybridation (Bonnet *et al.*, 1999).

Des sondes Taqman ont été utilisées pour détecter diverses bactéries pathogènes isolées d'aliments : *L. monocytogenes* (Nogva *et al.*, 2000b), *Bacillus cereus* (Kim *et al.*, 2000), *E. coli* O157H7 (Oberst *et al.*, 1998), EHEC (Chen *et al.*, 1998), *Campylobacter jejuni* (Nogva *et al.*, 2000a), *Y. enterocolitica* (Vishnubhatla *et al.*, 2000) ou *Salmonella* (Hoorfar *et al.*, 2000).

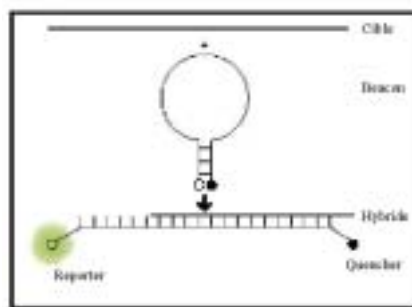


Figure 5 : Principe de fonctionnement d'un "molecular beacon" : Dans sa position fermée, le reporter et le quencher sont proches de telle manière que la fluorescence émise par le reporter est absorbée par le quencher et aucune fluorescence n'est détectée par la machine. Lorsque la sonde s'hybride à la cible, le quencher et le reporter se trouvent éloignés et la fluorescence émise par le reporter est détectée par l'appareil.

CONCLUSIONS

La qualité et la sécurité des aliments est une préoccupation essentielle de notre société. L'analyse microbiologique occupe dans ce secteur une place de choix. Il s'agit d'évaluer la quantité totale de bactéries présentes ou la présence d'une contamination d'origine fécale dans un souci d'hygiène ou encore de détecter des bactéries pathogènes dans un souci de santé publique. Le laboratoire de microbiologie alimentaire est soucieux de ces deux aspects. Jusqu'ici, la plupart des laboratoires ont utilisé des méthodes normalisées ou validées de microbiologie classique (ISO, AFNOR,...) sous accréditation. Mais dans le domaine agro-alimentaire, une réponse rapide est souvent nécessaire que se soit pour éviter le blocage des denrées alimentaires ou dans les cas de toxi-infections pour en déterminer la cause. C'est pourquoi, un programme de recherche utilisant l'amplification génétique par PCR a débuté pour déterminer la charge bactérienne ainsi que la présence de bactéries pathogènes. L'avènement de la PCR en temps réel devrait aussi permettre d'avoir une estimation quantitative des bactéries présentes dans l'aliment. On peut ainsi espérer disposer d'outils de diagnostic : rapides, sensibles, reproductibles et quantitatifs, permettant de répondre le plus vite possible à l'attente du secteur agro-alimentaire. De plus, ces outils seront aussi très utiles dans la confirmation de diagnostics obtenus par les techniques classiques.

REMERCIEMENTS

Ce projet bénéficie du soutien du Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture (convention n° S6050) et de la Communauté européenne (convention n° QLK1-CT-1999-00226).

SUMMARY

Food quality is a major concern of our modern society. The sudden awareness that food is not sterile underlines the need of a rigorous microbiological analysis of foodstuffs. The techniques developed until now require the growth of the microorganism on a selective medium allowing to differentiate it from other bacteria. This procedure could be long and difficult for the analysis. To improve these classical methods, molecular biology techniques based on the specific amplification of a

DNA sequence are in development. Moreover, the apparition of real time PCR allows new future prospects since it allows to quantify the number of bacteria present in a sample. This quantitative aspect is very important in food microbiology. In this way, the molecular biology tools should allow to develop fast, sensitive, specific and quantitative diagnosis tests to confirm the results obtained by classical methods but also to allow the diagnosis of fastidious bacteria.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBS S., BOBROW M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers of dystrophin gene. *J. Med. Genet.*, 1992, **29**, 191-196.
- BANSAL N. S., McDONNELL F. H., SMITH A., ARNOLD G., IBRAHIM G.F. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **33**, 293-300.
- BHADURI S., COTTRELL B. Direct detection and isolation of plasmid-bearing virulent serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 4952-4955.
- BICKLEY J., SHORT J. K., McDONNELL D. G., PARKES H. C. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996, **22**, 153-158.
- BONNET G., TYAGI S., LIBCHABER A., KRAMER F. R. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 6171-6176.
- CHEN X., KWOK P.Y. Template-directed dye-terminator incorporation (TDI) assay : a homogeneous DNA diagnostic method based on fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 347-353.
- CIMINO G.D., METCHETTE K. C., TESSMAN J. W., HEARST J. E., ISAACS S. T. Post PCR sterilization : a method to control carry-over contamination for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 1991, **19**, 99-107.
- CLEMENTI M., MENZO S., MANZIN A., BAGNARELLI P. Quantitative PCR : validation of the use of a multispecific internal control. *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**, 2712-2713.
- COCOLIN L., MANZANO M., CANTONI C., COMI G. Use of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis to directly detect and identify *Salmonella typhimurium* in food. *J. Appl. Microbiol.*, 1998, **85**, 673-677.
- CROSS N. C. Quantitative PCR techniques and applications. *Br. J. Haematol.*, 1995, **89**, 693-697.
- DICKINSON J.H., KROLL R.G., GRANT K.A. The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1995, **20**, 212-216.
- DIVIACCO S., NORIO P., ZENTILIN L., MENZO S., CLEMENTI M., BIAMONTI G., RIVA S., FALASCHI A., GIACCA M. A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene*, 1992, **122**, 313-320.
- FACH P., PERELLE S., DILASSER F., GROUT J. Comparison between a PCR-ELISA test and vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of isolated strains. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **90**, 809-818.
- FENWICK S. G., MURRAY A. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction. *Lancet*, 1991, **337**, 496-497.
- FERRE F., MARCHESE A., PEZZOLI P., GRIFFIN S., BUXTON E., BOYER V. Quantitative PCR : an overview. In Mullis KB, Ferré F., Gibbs R.A. Editors. The polymerase chain reaction. Basel, Berlin : Birhauser Boston, 1994, 67-88.
- FIELDS P.I., POPOVIC T., WACHSMUTH K., OLSVIK O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the latin America cholera epidemic. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 2118-2121.
- FLUIT A.C., TORENSMA R., VISSER M. J., AARSMAN C. J., POPPELIER M. J., KELLER B. H., KLAPWIJK P., VERHOEF J.. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 1289-1293.

- FOLEY K.P., LEONARD M.W., ENGEL J.D. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction, *Trends Genet.*, 1993, **9**, 380-385.
- FRATAMICO P. M., BAGI L. K., PEPE T. A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feces. *J. Food Prot.*, 2000, **63**, 1032-1037.
- FREDRIKSSON-AHOMAA M., HIELM S., KORKEALA H. High prevalence of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland. *J. Food Prot.*, 1999, **62**, 123-127.
- FRYE R.A., BENZ C.C., LIU E. Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. *Oncogene*, 1989, **4**, 1153-1157.
- FURRER B., CANDRIAN U., HOEFELIN C., LUETHY J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. *J. Appl. Bacteriol.*, 1991, **70**, 372-379.
- GELINAS, P. Répertoire des microorganismes pathogènes transmis par les aliments. Fondation des gouverneurs et edisem, Saint-Hyacinthe, Canada, 1995, 208 p.
- GILLILAND G., PERRIN S., BLANCHARD K., BUNN H. F. Analysis of cytokine mRNA and DNA : detection and quantification by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1990, **87**, 2725-2729.
- GUYER R. L., KOSHLAND D. E. Jr. The molecule of the year. Glittering prize for materials science. *Science*, 1990, **250**, 1640-1643
- HABERHAUSEN G., PINSL J., KUHN C. C., MARKERT-HAHN C. Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 628-633.
- HILL W.E. The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1996, **6**, 123-173.
- HOLLAND P.M., ABRAMSON R.D., WATSON R., GELFAND D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 7276-7280.
- HOORFAR J., AHRENS P., RADSTROM P. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 3429-3435.
- HOORFAR J. Validation and standardisation of diagnostic polymerase chain reaction for detection of foodborne pathogens. Contract number QLK1-CT-1999-0026. First annual report, 2001. <http://www.pcr.dk>.
- IBRAHIM A., LIESACK W., GRIFFITHS M.W., ROBINS-BROWNE R.M. Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (yst). *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 1636-1638.
- INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J. PCR protocols : a guide to methods and application. San Diego, Academic press, 1990.
- JINNEMAN K.C., TROST P.A., HILL W. E., WEAGANT S. D., BRYANT J. L., KAYSNER C. A., WEKELL M. M. Comparison of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia coli* O157 shiga-like toxins type I and II by multiplex Polymerase Chain reaction. *J. Food Prot.*, 1995, **58**, 722-726.
- JOURDAN A. D., JOHNSON S. C., WESLEY I. V. Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the ail gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 3750-3755.
- JUNG R., SOONDRUM K., NEUMAIER M. Quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2000, **38**, 833-836.
- KIM Y. R., CZAJKA J., BATT C. A. Development of a fluorogenic probe-based PCR assay for detection of *Bacillus cereus* in normal dry milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 1453-1459.
- KWANG J., LITLEDIKE E. T., KEEN J. E.. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996, **22**, 46-51.
- LAMPEL K. A., ORLANDI P. A., KORNEGAY L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 4539-4552.
- LIN C. K., TSEN H. Y. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 1996, **80**, 659-666.
- LIVAK K. J., MARMARO J. A., TODD J. A. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genet.*, 1995, **9**, 341-342.
- MENG J., ZHAO S., DOYLE M. P., MITCHELL S. E., KRESOVICH S. Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food. Microbiol.*, 1996, **32**, 103-113.
- MIWA N., NISHINA T., KUBO S., ATSUMI M., HONDA H. Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **42**, 195-200.
- MULLIS K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.*, 1990, **240**, 56-65.
- NOGVA H. K., BERGH A., HOLCK A., RUDI K. Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000a, **66**, 4029-4036.
- NOGVA H. K., RUDI K., HOLCK A., LILLEHAUG D. Application of 5' nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000b, **66**, 4266-4271.
- OBERST R. D., HAYS M. P., BOHRA L. K., PHEBUS R. K., YAMASHIRO C. T., PASZKO-KOLVA C., FLOOD S. J., SARGEANT J. M., GILLESPIE J. R. PCR-based DNA amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5' nuclease (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 3389-3396.

- ORLANDO C., PINZANNI P., PAZZAGLI M. Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab.*, 1998, **36**, 255-269.
- PANG S., KOYANAGI Y., MILES S., WILEY C., VINTERS H.V, CHAEN I. S. Y. High level of integrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature*, 1990, **343**, 85-89.
- RAHN K., DE GRANDIS S. A., CLARKE R. C., McEWEN S. A., GALAN J. E., GINOCCHIO C., CURTISS R. III, GYLES C. L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Mol. Cell. Probes*, 1992, **6**, 271-279.
- RIDELL J., BJORKROTH J., EISGRUTER H., SCHALCH B., STOLLE A., KORKEALA H. Prevalence of the enterotoxin gene and clonality of *Clostridium perfringens* strains associated with food-poisoning outbreaks. *J. Food Prot.*, 1998, **61**, 240-243.
- RODRIGUEZ J.M. Detection of animal pathogens by using the polymerase chain reaction (PCR). *Vet J.* 1997, **153**, 287-305.
- ROSSEN L., NORSEKOV P., HOLMSTROM K., RASMUSSEN O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.*, 1992, **17**, 37-45.
- SAIKI R. K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K. B., HORN K. B., ERHLICH H. A., ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, **230**, 1350-1354
- SCHNEEBERGER C., SPEISER P., KURY F., ZELLINGER R. Quantitative detection of reverse transcriptase PCR product by mean of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl.*, 1995, **4**, 234-238
- SCHOEPE H., POTSCHEKA H., SCHLAPP T., FIELDER J., SCHAU H., BALJER G. Controlled multiplex PCR of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in food samples. *Mol. Cell. Probes*, 1998, **12**, 359-365.
- SETHABUTR O., VENKATESAN M., MURPHY G. S., EAMPOKALAP B., HOGE C. W., ECHEVERRIA P. Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J. Infect. Dis.*, 1993, **167**, 458-461.
- SIEBERT P.D., LARRICK J.W. PCR mimics : competitive DNA fragments for use as internal standard in quantitative PCR. *Biotechniques*, 1993, **14**, 244-249
- SOMET C., ERMEL G., FACH P., COLIN P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of Salmonella from chicken products by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1994, **19**, 294-298.
- TYAGI S., BRATU D., KRAMER F.R. Multicolor beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnol.*, 1998, **16**, 49-53.
- TYAGI S., KRAMER F.R. Molecular Beacons : probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol.*, 1996, **14**, 303-308.
- VAN BRUNT J. Amplifying genes : PCR and its alternatives. *Biotechnology*, 1990, **8**, 291-294.
- VISHNUBHATLA A., FUNG D.Y., OBERST R.D., HAYS M.P., NAGARAJA T.G., FLOOD S.J. Rapid 5' nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 4131-4135.
- WAAGE A.S., VARDUND T., LUND V., KAPPERUD G. Detection of small numbers of *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by seminested PCR assay. *Appl. Environm. Microbiol.*, 1999, **65**, 1636-1643.
- WALLER D.F., OGATA S.A. Quantitative immunocapture PCR assay for detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 4115-4118.
- WANG R.F., CAO W. W., CERNIGLIA C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.*, 1997, **83**, 727-736.
- WEAGANT S.D., JAGOW J.A., JINNEMAN K.C., OMIECINSKI C.J., KAYSNER C.A., HILL W.E. Development of digoxigenin-labeled PCR amplicon probes for use in the detection and identification of enteropathogenic *Yersinia* and Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* from foods. *J. Food. Prot.*, 1999, **62**, 438-443.
- WERNARS K., HEUVELMAN C.J., CHAKRABORTY T., NOTERMANS S.H. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.*, 1991, **70**, 121-126.
- WHELEN A.C., PERSING D.H. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1996, **50**, 349-373.
- WILSON I.A. Inhibition and facilitation of nucleic acid research. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 3741-3751.
- WITTEWER C.T., HERRMANN M. G., MOSS A.A., RASMUSSEN R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 1997, **130**, 134-138.
- ZIMMERMANN K., MANNHALTER J.W. Technical aspects of quantitative PCR. *Biotechniques*, 1996, **21**, 268-279.