

Politique relative au contrôle des *E. coli* O157:H7 dans les produits de bœuf crus

Date d'entrée en vigueur:

Cette politique est effective en date de sa publication et tous les exploitants d'établissements agréés produisant ou manipulant du boeuf cru sont tenus de ré-évaluer leur système HACCP ou leur contrôles de procédés (voir point no. 1), de mettre en oeuvre une/des étape(s) de réduction des agents pathogènes si elles ne sont pas déjà en place, de valider leurs système HACCP et de mettre en oeuvre une procédure de vérification.

Politique:

À la lumière des données dont on dispose sur la présence d'*E. coli* O157:H7 chez les bovins, selon lesquelles les taux de contamination sont plus élevés qu'on croyait, les établissements qui produisent ou reçoivent du bœuf cru doivent réévaluer leur système HACCP pour prendre en considération les dangers associés à *E. coli* O157:H7 dans le bœuf cru. Aux fins de la présente politique, le terme bœuf cru comprend la viande de veau, le cœur, la viande de tête, la viande de bajoue, l'œsophage, etc. (c.-à-d. les muscles striés) mais exclut les queues et les langues de boeuf/veau puisque ces portions sont généralement entièrement cuites et n'ont jamais été liées à des toxi-infections alimentaires. Le bœuf cru comprend le bœuf cru intact et non intact. Une coupe de bœuf cru **INTACTE** est un morceau de viande dont l'intégrité n'a pas été modifiée, c'est-à-dire que les bactéries sont à la surface et que l'intérieur est probablement stérile. Le bœuf cru **NON INTACT** est constitué de bœuf qui a été attendri à l'aide d'aiguilles, soumis à des injections, coupé en cubes ou haché.

1. Les exploitants de tous les établissements qui produisent ou reçoivent des produits de bœuf crus pour la transformation doivent réévaluer leur système HACCP afin de déterminer si la contamination par *E. coli* O157:H7 constitue un danger possible pendant la production de ces produits et, si c'est le cas, si leur système HACCP permet de lutter efficacement contre ce danger. Si l'établissement ne possède pas de système HACCP, l'exploitant doit élaborer et mettre en oeuvre des mesures d'élimination étayées par des documents, validées et auditable pour réduire ce danger spécifique. Aux fins de la présente section, le terme « système HACCP » comprend tous les moyens de contrôle des processus fondés sur HACCP que doit utiliser l'exploitant pour lutter contre *E. coli* O157:H7 même s'il n'est pas encore reconnu par le PASA.
2. Selon les renseignements disponibles, il est évident que la contamination du bœuf cru par *E. coli* O157:H7 représente un danger possible pour la santé et qu'il est nécessaire de mettre en oeuvre des mesures pour réduire ce danger. Cependant, si un exploitant conclut, à la suite de la réévaluation, qu'il est peu probable qu'il existe un danger de contamination par *E. coli* O157:H7 des produits de bœuf crus produits à l'établissement, cette conclusion devra être appuyée par des preuves scientifiques (p. ex., littérature, données, etc.). L'information sera examinée par l'ACIA à la lumière des données scientifiques existantes. Il faut se rappeler qu'*E. coli* O157:H7 est considéré comme un adultérant dans le bœuf haché aux États-Unis et justifie un rappel lorsque des résultats positifs sont obtenus au Canada. Par ailleurs, on peut utiliser des produits de bœuf crus intacts ou non intacts pour produire du bœuf haché cru (voir l'introduction pour la définition ainsi que le paragraphe 11 pour de plus amples renseignements sur les produits de bœuf intacts). Ces exigences visent à s'assurer que les mesures appropriées de lutte contre la contamination sont adoptées à la suite de la réévaluation approfondie du système HACCP de l'établissement.

3. Lorsque l'exploitant a conclu, à la suite de la réévaluation, qu'il existe un danger probable de contamination par *E. coli* O157:H7 des produits de bœuf crus produits à l'établissement, on doit de revoir les formules du PASA (ou l'équivalent) portant sur l'identification du produit et l'usage prévu pour évaluer si les renseignements qu'ils renferment sont complets et exacts. Le danger associé à *E. coli* O157:H7 devrait être clairement indiqué sur la formule n° 5 du PASA. Ensuite, il faut évaluer le danger en se servant de l'arbre de décision (formule n° 8 du PASA). L'exploitant doit décider des moyens qu'il prendra pour éliminer le danger : soit CCP à l'établissement au cours de la production, lettre de garantie des fournisseurs à la réception de produits de bœuf crus ou autres mesures visant à empêcher la distribution de produits qui pourraient être contaminés. L'exploitant doit s'assurer que tous les volets du système HACCP de l'établissement sont mis à jour comme il se doit.
4. L'exploitant doit s'assurer que le taux d'*E. coli* O157:H7 dans les produits de bœuf distribués ailleurs que dans un établissement agréé par le gouvernement fédéral se situe **sous le seuil de détection** (c.-à-d. qu'aucune bactérie *E. coli* O157:H7 n'est détectée dans un échantillon analysé à l'aide d'une des méthodes de détection rapide (screening) reconnues officiellement par Santé Canada : p. ex. méthode MFLP-81 (BioControl Assurance), MFLP-87 (BioControl VIP), MFLP-94 & 95 (Reveal 8 hours and 20 hours) and MFLP-30 (Dupont BAX). et les tests de confirmation, pour les échantillons trouvés positifs à l'aide de l'une des méthodes de détection rapide seront complétés avec la méthode ci-jointe de séparation Immunimagnétique). Il est entendu que, dans tous les cas, des mesures doivent être en place dans l'établissement pour empêcher la croissance d'*E. coli* O157:H7 ou la contamination par cette bactérie.

Les mesures suivantes de lutte contre la contamination doivent être appliquées:

- a) Dans un **abattoir**, à la suite de la réévaluation du système HACCP de l'établissement, l'exploitant doit avoir recours à une ou plusieurs interventions validées (comme la pasteurisation à la vapeur, la vaporisation avec des acides organiques, etc... validés selon cette politique) au moment de l'abattage afin de réduire la contamination par *E. coli* O157:H7 à un niveau en deçà du seuil de détection.
- b) Dans un **établissement qui reçoit du bœuf cru**, à la suite de la réévaluation du système HACCP, l'exploitant peut :
 1. adopter des spécifications d'achat et déterminer qu'un CCP est nécessaire à l'étape de la réception pour s'assurer du respect de ces spécifications. Les spécifications doivent exiger de tous les fournisseurs qu'ils aient instauré un ou plusieurs CCP validés dans leur propre chaîne de production pour le bœuf cru expédié vers l'établissement et que leurs mesures de lutte contre la contamination soient efficaces et garantissent que le taux d'*E. coli* O157:H7 est en deçà du seuil de détection.
 2. déterminer que des CCP validés sont déjà en place dans l'établissement ou seront ajoutés aux mesures de réduction du danger associé à *E. coli* O157:H7 (p. ex. tout le bœuf cru reçu est utilisé pour la production de produits bien cuits).
- c) Dans un établissement qui produit du bœuf cru destiné **exclusivement** à la fabrication de produits bien cuits dans d'autres établissements agréés par le gouvernement fédéral, l'exploitant peut déterminer, à la suite de la réévaluation du système HACCP de l'établissement, qu'il existe un danger probable de contamination par *E. coli* O157:H7, mais qu'aucun nouveau CCP n'est nécessaire dans l'établissement parce que tous les produits sont expédiés vers un autre établissement agréé par le fédéral où des mesures seront prises pour éliminer le danger. L'exploitant doit alors fournir des détails sur les mesures d'élimination du danger qui seront mises en place : par exemple, le produit portant le sceau de l'entreprise est expédié vers un établissement agréé par le gouvernement fédéral et sera transformé tel qu'il est prévu (l'exploitant de l'établissement destinataire fournit une lettre de garantie selon laquelle la cuisson éliminera le danger) ou le produit porte une mention claire telle que « *Produit destiné à être transformé en un produit bien cuit* ». Les procédures doivent comprendre des activités de surveillance, de vérification et de tenue des dossiers ainsi que des procédures de rectification. De plus, ces procédures doivent être auditable et efficaces.

5. Lorsque l'exploitant décide que l'une des mesures de lutte à prendre à l'établissement est associée à des **spécifications d'achat**, les éléments suivants doivent être pris en considération et portés aux dossiers :

- a) Le dossier doit comporter une **lettre de garantie** des fournisseurs indiquant les interventions et les autres mesures qu'ils utilisent pour réduire, empêcher ou éliminer le danger associé à *E. coli* O157:H7 (c-à-d sous le seuil de détection). La lettre doit être datée et signée par l'exploitant, ou une personne désignée, de l'établissement expéditeur. La lettre doit comporter une déclaration selon laquelle, advenant que les interventions du fournisseur se révèlent inefficaces et qu'un résultat positif soit obtenu, l'inspecteur de l'ACIA de l'établissement fournisseur et tous les établissements qui ont reçu du produit impliqué seront avisés. Note: Lorsque du produit impliqué a été distribué, le Bureau de la salubrité et des rappels alimentaires doit être avisé (voir également le paragraphe 12).
- b) Comme étape de vérification du CCP de réception, l'établissement destinataire doit s'assurer que les interventions du fournisseur sont efficaces en effectuant des analyses aléatoires sur les produits qu'il reçoit. La fréquence de ces analyses est déterminée par l'exploitant et doit être fondée sur la connaissance de l'aptitude de leurs fournisseurs à rencontrer les spécifications d'achat. Une alternative acceptable aux analyses aléatoires à la réception serait d'exiger des certificats d'analyse des fournisseurs démontrant que le produit est sous le seuil de détection. Ces analyses devraient être effectuées dans un laboratoire indépendant utilisant les méthodes officielles.

Nota : Le certificat d'analyse ne doit pas être considéré comme une lettre de garantie. La lettre de garantie confirme que le processus de fabrication du produit est maîtrisé et que les spécifications d'achat sont respectées. Le certificat d'analyse fournit des renseignements additionnels sur les résultats des analyses pour un lot précis. Bien qu'il augmente le niveau de confiance, le certificat d'analyse ne peut remplacer la lettre de garantie.

6. Lorsque l'établissement manipule à la fois des produits de bœuf crus dont le taux d'*E. coli* O157:H7 se situe en deçà du seuil de détection et des produits de bœuf pouvant être contaminés par *E. coli* O157:H7, l'exploitant doit élaborer et mettre en œuvre des mesures de ségrégation écrites qui prennent en compte l'état des différents produits. Les renseignements pertinents doivent être inscrits sur les formules du PASA (possibilité de contamination croisée). Les mesures de ségrégation doivent comprendre des activités de surveillance, de vérification et de rectification ainsi que des procédures de tenue des dossiers. De plus, ces mesures doivent être auditable et efficaces. Par exemple, il n'est nécessaire de fournir une lettre de garantie concernant *E. coli* O157:H7 que pour les produits reçus en vue de la fabrication de produits de bœuf crus et non pour les produits qui seront cuits. Des mesures de ségrégation doivent être adoptées afin que les produits de bœuf crus destinés à la cuisson ne soient pas utilisés dans la production de produits de bœuf crus finis et pour empêcher la contamination croisée.
7. Les mesures prises en vertu du système HACCP devraient être élaborées conformément aux lignes directrices du PASA. Lorsqu'*E. coli* O157:H7 est détecté, l'exploitant doit réévaluer le système HACCP de l'établissement, prendre les actions correctives qui s'imposent et mettre en œuvre des mesures préventives (voir le paragraphe 13).

Lorsque l'exploitant a conclu, à la suite de la réévaluation du système HACCP de l'établissement, que des mesures autres que des CCP sont nécessaires pour éliminer le danger associé à *E. coli* O157:H7 (voir le paragraphe 4c), ces autres mesures doivent comprendre des activités de surveillance, de vérification et de rectification ainsi que des procédures de tenue des dossiers. De plus, ces mesures doivent être auditable et efficaces.

8. La validation des étapes de réduction de pathogènes (CCP) de l'établissement doit être effectuée conformément à l'approche du PASA. Le PASA définit la validation comme suit : obtenir une confirmation que les éléments d'un système HACCP sont complets et permettent de maîtriser efficacement les dangers biologiques, chimiques et physiques. La confirmation peut nécessiter, notamment, un échantillonnage des ingrédients, des produits finis, etc. Dans le cas présent, il faut plus précisément faire ces 3 étapes :

- Étape 1** rassembler des données scientifiques publiées sur la réduction expérimentale obtenue avec la méthode choisie pour réduire le taux de l'agent pathogène et sur tous les facteurs critiques pertinents (p. ex. l'intervention « Y » devrait entraîner une réduction de 2,0 log selon les paramètres définis relativement aux conditions expérimentales comme la pression, la température, la durée, la concentration chimique, etc.);
- Étape 2** démontrer l'efficacité de la méthode pour réduire le taux d'une bactérie substitut acceptable de « X » log dans les conditions d'exploitation de l'établissement (c.-à-d. l'intervention « Y » permet de réduire de « X » log les taux d'*E. coli* génériques ou d'entérobactéries utilisés comme indicateurs) pour chacune des interventions que l'établissement a choisi de mettre en œuvre. Une bactérie substitut acceptable est un organisme qui a une résistance thermique, une plage de croissance, une plage de pH, une habilité de croître sur des milieux sélectifs etc. Qui sont similaires à *E. coli* O157:H7. Normalement, pour ce faire, on compare les taux de la bactérie substitut dans l'échantillon **avant et après** l'intervention. L'exploitant doit choisir un échantillon d'une taille statistiquement significative prélevé sur une période de 4 mois pour démontrer que l'intervention sur place permet d'obtenir la réduction de log visée. ***E. coli* O157:H7 ne doit pas être introduit à des fins expérimentales dans les établissements agréés** (voir l'annexe 4 pour obtenir des conseils sur la taille de l'échantillon et l'analyse statistique). L'échantillonnage des carcasses doit être effectué conformément à l'annexe T, section sur les États-Unis, chapitre 11 du Manuel des méthodes de l'hygiène des viandes.
- Étape 3** veiller à ce que, à la suite de toutes les réductions logarithmiques des interventions (CCP), le taux d'*E. coli* O157:H7 dans le produit final soit en deçà du seuil de détection. La démonstration devrait être fondée sur un nombre d'échantillons de produit fini statistiquement significatif, c'est-à-dire que le taux d'*E. coli* O157:H7 devrait être en deçà du seuil de détection, avec un niveau de confiance à 95 %. En raison de la variabilité attendue d'*E. coli* O157:H7, l'échantillonnage de validation devrait se faire en choisissant au hasard le nombre requis d'échantillons durant une période de production de un mois tel que l'indique le Tableau 1. L'échantillonnage minimal requis par l'ACIA est indiqué à la colonne correspondant au seuil de 1 %. L'échantillonnage des carcasses doit être effectué conformément à l'annexe T, section sur les États-Unis, chapitre 11 du Manuel des méthodes de l'hygiène des viandes.
- Nota 1 : Si la taille du lot (c.-à-d. le nombre d'animaux abattus par mois) se situe entre deux valeurs figurant à la colonne 1 du tableau 1, il faut choisir le nombre le plus élevé pour déterminer la taille de l'échantillon.*
- Nota 2 : Exceptionnellement, lorsqu'une méthode de transformation approuvée, comme la fermentation, cuisson et la mise en conserve, est déjà reconnue pour son pouvoir de létalité et mise en application en vertu des exigences réglementaires, il n'y a pas lieu de recourir à d'autres activités de validation comme celles décrites ci-dessus à l'établissement. D'autres processus pourraient faire l'objet d'exemptions à la suite d'une évaluation par l'Administration centrale.*
- Nota 3 : Il revient à chaque établissement de décider s'il désire recourir ou non aux services d'un laboratoire agréé pour les analyses requises pour la validation ou la vérification. Cependant, dans tous les cas, les laboratoires DOIVENT se servir d'une méthode reconnue officiellement par l'ACIA (voir point 4 de cette section). Les résultats de laboratoire (certificats d'analyse en laboratoire) doivent indiquer la méthode utilisée pour l'analyse des échantillons.*

La validation doit être complétée initialement afin de démontrer que les interventions mise en place par l'exploitant sont efficaces pour produire des produits de viande qui sont sous le seuil de détection de *E. coli* O157:H7. Une nouvelle validation doit être menée à nouveau lorsque l'exploitant a modifié les étapes de production et/ou qu'une étape de réduction des pathogènes a été modifiée/ajoutée lorsqu'un échantillon de produit s'est avéré positif à *E. coli* O157:H7, le système HACCP en entier doit être réévalué et, après que les changements nécessaires ont été mis en oeuvre, au moins la 3^{ième} étape de la validation doit être complétée afin de démontrer que l'établissement est de nouveau sous contrôle.

9. La vérification doit être effectuée conformément au PASA. Dans le cas présent, cela signifie plus précisément que :
- les dossiers sont examinés;
 - des examens sur place sont effectués de façon à s'assurer que le programme écrit est mis en oeuvre conformément aux plans;
 - le produit est soumis de façon aléatoire et routinière à un test de dépistage d'*E. coli* O157:H7 à une fréquence appropriée ou les certificats d'analyse se reçoivent;
 - un audit des fournisseurs (facultatif) peut aussi être effectué à titre d'activité de vérification.

Aucune fréquence n'est prévue pour ces activités. Il incombe à l'exploitant de procéder à ces activités à une fréquence qui permettra de garantir que le produit fini satisfait aux exigences applicables.

Nota : Les certificats d'analyse (effectués par un laboratoire indépendant) transmis par les fournisseurs peuvent remplacer les rapports sur les activités de vérification de l'établissement destinataire.

10. Les lignes directrices suivantes devraient être utilisées pour définir un lot lorsqu'une carcasse, des parures, du bœuf destiné à la transformation ou du bœuf haché sont positifs au test de dépistage d'*E. coli* O157:H7 :
- En ce qui concerne le bœuf haché, consulter la ligne directrice n° 10 de Santé Canada : (http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/rfao-aoca/f_lignes_directrices_sur_boeuf_hache.html).
 - En ce qui concerne les carcasses, les parures et le bœuf destiné à la transformation, l'ACIA se réfèrera à la ligne directrice n° 10 de Santé Canada. L'ACIA reconnaîtra la définition du lot soumis à l'échantillonnage fournie par l'établissement, pourvu que ce dernier ait un plan d'échantillonnage et se soit appuyé sur des données scientifiques pour définir ce lot. Cependant, l'ACIA tient à souligner que la définition de la taille du lot ne relève pas l'établissement de sa responsabilité qui consiste à examiner s'il existe des liens entre les lots. Par exemple, si de multiples lots de parures de bœuf ont été produits à partir de matériel source provenant du même lot de production d'un fournisseur unique et qu'une partie de ce lot est contaminée par *E. coli* O157:H7, l'ACIA s'attend à ce que l'établissement justifie, en s'appuyant sur des données scientifiques, pourquoi toutes les parures produites à partir de ce matériel source ne devraient pas être considérées comme contaminées. Si l'exploitant est incapable de fournir une justification scientifique satisfaisante, l'ACIA considérera que le lot par défaut englobe les produits transformés entre la séance de nettoyage et de désinfection précédente jusqu'à la suivante.
 - De même, en ce qui concerne les carcasses, si on détecte la présence d'*E. coli* O157:H7 dans une carcasse, l'ACIA s'attend à ce que l'établissement explique pourquoi il a pu déterminer que les autres carcasses produites le même jour, sur la même ligne, ne sont pas elles aussi contaminées par *E. coli* O157:H7.

Il faut souligner que si un exploitant possède un système HACCP validé et qu'il vérifie par des tests réguliers que des lots précis de produits sont exempts d'*E. coli* O157:H7, les données obtenues pourraient lui permettre de déterminer qu'un lot contaminé par *E. coli* O157:H7 est le seul lot contaminé impliqué de la journée.

11. Il faut mentionner que les produits de bœuf crus intacts utilisés tels quels par les consommateurs ne comportent pas le même niveau de risque que les produits non intacts. Contrairement aux produits de bœuf crus non intacts, l'intérieur des produits de bœuf crus intacts est considéré comme étant exempt d'agents pathogènes. Par conséquent, la cuisson habituelle de ces produits détruira tout *E. coli* O157:H7 qui pourrait être présent à la surface. L'exploitant devra déterminer si tout le bœuf cru intact produit à l'établissement demeurera intact jusqu'à sa consommation (p. ex. biftecks préemballés) ou s'il est possible qu'il soit utilisé pour la production de produits de bœuf crus non intacts (p. ex. coupes primaires dont les parures peuvent servir à la production de bœuf haché vendu au détail). Tout le bœuf cru non intact devra être produit dans des conditions contrôlées afin qu'on soit sûr qu'il ne renferme pas de quantités décelables d'*E. coli* O157:H7 ou il devra être utilisé, dans un établissement agréé par le fédéral, pour la production de produits prêts à manger bien cuits en vertu d'un plan HACCP qui élimine le danger de contamination par *E. coli* O157:H7. Comme tous les établissements qui produisent du bœuf cru, un établissement qui produit et distribue du bœuf cru intact (p. ex. bifteck) doit réévaluer son système HACCP pour ce produit à la lumière des données pertinentes sur *E. coli* O157:H7 afin de déterminer si le système permet d'éliminer adéquatement le danger. Un établissement qui produit et distribue des biftecks préemballés intacts pourrait conclure qu'il n'est pas nécessaire qu'il modifie son système HACCP pour ces produits.
12. À l'exception des cas couverts au point 4c), lorsqu'un établissement qui reçoit du bœuf cru fournit à son tour des produits de bœuf crus à un autre établissement, les lignes directrices suivantes s'appliquent :
- les deux établissements doivent adopter des spécifications d'achat pour empêcher l'introduction d'*E. coli* O157:H7 dans leurs installations et avoir un protocole de dépistage d'*E. coli* O157:H7 dans le cadre de leurs activités de vérification. Dans ce cas, la lettre de garantie fournie par l'établissement qui reçoit et expédie du bœuf cru devrait indiquer que:
 - l'établissement a instauré un CCP pour éliminer le danger associé à *E. coli* O157:H7 au moment de la réception et a en filière des lettres de garantie de tous ses fournisseurs;
 - des mesures sont en place dans l'établissement pour empêcher la croissance d'*E. coli* O157:H7 ou la contamination par cette bactérie après la réception du produit.
 - en plus d'adopter des spécifications d'achat pour lutter contre cette bactérie, les établissements destinataires doivent s'assurer que des mesures sont en place pour empêcher la croissance d'*E. coli* O157:H7 ou la contamination par cette bactérie après la réception du produit dans le cadre de leurs programmes préalables. Dans ce cas, aucun échantillonnage supplémentaire ne'est requis pour la vérification des produits finis.

Pour de plus amples renseignements sur la lettre de garantie, voir le paragraphe 5.

13. Détection d'*E. coli* O157:H7 à la suite des analyses de validation ou de vérification :

Avant de prélever un échantillon pour la recherche d'*E. coli* O157:H7, l'exploitant doit isoler et clairement identifier le lot à la satisfaction de l'inspecteur de l'ACIA de façon à s'assurer que le produit n'est pas incorporé dans un produit de bœuf cru fini. On recommande de retenir le lot en attendant les résultats du laboratoire. L'exploitant doit aussi indiquer le numéro de l'établissement expéditeur (si le produit provient d'un autre établissement), la date de production, le numéro de lot de production et toute autre information pertinente sur le lot.

S'il reçoit un résultat positif ou présumé positif, l'exploitant doit immédiatement retenir le lot et empêcher qu'il ne soit utilisé. L'exploitant doit également aviser immédiatement le fournisseur de ce lot et l'inspecteur responsable de l'ACIA. L'exploitant devra soit cuire entièrement le produit à la satisfaction de l'ACIA ou le condamner. Lorsque des analyses ont permis de détecter la présence d'*E. coli* O157:H7 dans un produit, l'inspecteur responsable déterminera les activités de réévaluation nécessaires et avisera le chef, Réseau de programmes (Produits d'origine animale), qui informera à son tour l'inspecteur responsable de l'établissement expéditeur. Si le produit a été importé, le Centre opérationnel avisera immédiatement par écrit le chef, Programmes d'importations, Division des aliments d'origine animale, à Ottawa. Le chef, Programmes d'importations, informera les autorités du pays exportateur pour qu'une enquête plus poussée soit entreprise. En résumé, il existe trois possibilités :

- a) **Lorsqu'un résultat présomptif ou positif est obtenu à la suite des analyses de validation ou de vérification des produits de l'établissement**, l'exploitant doit considérer ces résultats comme une preuve que son système HACCP ne permet pas d'obtenir un produit dont le taux d'*E. coli* O157:H7 soit en deçà du seuil de détection. Par conséquent, l'exploitant doit aviser immédiatement l'inspecteur responsable et prendre des actions correctives immédiates, y compris continuer de retenir le produit pour empêcher son utilisation, décider du sort qui doit lui être réservé (cuisson complète ou condamné et dénaturé) et réévaluer son système HACCP afin de déterminer la raison des écarts et les étapes nécessaires pour empêcher qu'ils ne se reproduisent. Il doit envisager sérieusement d'améliorer les étapes du système HACCP de façon à éliminer plus efficacement le pathogène. Après la mise en œuvre des changements, l'exploitant doit valider de nouveau le système en prélevant le nombre requis d'échantillons pendant un mois complet de production (c.-à-d. étape 3 de la validation, voir le paragraphe 8). L'ACIA vérifiera le plus tôt possible l'efficacité des actions correctives et préventives mises de l'avant par l'exploitant au moyen d'un audit de système ou d'une autre activité d'inspection (lorsque l'établissement n'est pas reconnu par le PASA) et d'un examen des données de validation. Les éléments applicables du système HACCP seront ciblés au cours de l'audit.
- b) **Lorsqu'un résultat présomptif positif est obtenu à la suite des analyses de vérification effectuées sur des produits reçus par un établissement spécifique**, l'exploitant doit aviser immédiatement l'inspecteur responsable et prendre des actions correctives immédiates, y compris continuer de retenir le produit afin d'empêcher son utilisation et décider du sort qui doit lui être réservé (cuisson complète, condamné et dénaturé ou retour au fournisseur sous scellé gouvernemental). De plus, l'exploitant doit communiquer avec l'établissement expéditeur pour l'informer des résultats des analyses. L'établissement expéditeur doit considérer cet avis comme une preuve que son système HACCP ne permet pas d'obtenir un produit dont le taux d'*E. coli* O157:H7 est en deçà du seuil de détection. (Voir le paragraphe précédent pour connaître les mesures que doivent prendre l'exploitant de l'établissement expéditeur et l'ACIA.)
- c) **Lorsque le produit trouvé positif (ou présomptif positif) à *E. coli* O157:H7 contient du matériel en provenance de divers établissements et qu'il est impossible de déterminer la source exacte de la contamination (p. ex. analyse de produits finis)**, l'exploitant doit aviser immédiatement l'inspecteur responsable et prendre des actions correctives immédiates, y compris continuer de retenir le produit afin d'empêcher son utilisation et décider du sort qui doit lui être réservé (cuisson complète ou condamné et dénaturé). De plus, l'exploitant doit informer tous les fournisseurs que leur produit était peut-être contaminé. Cette notification vise à s'assurer que les établissements expéditeurs savent qu'ils pourraient être à l'origine de la contamination par *E. coli* O157:H7. Chacun des fournisseurs doit examiner son système HACCP pour les lots en cause afin de vérifier si des données indiquent que le système n'a pas été mis en œuvre de façon adéquate. Par la suite, ils décideront si les résultats justifient la réévaluation du système HACCP et la prise d'actions correctives et préventives adéquates. L'ACIA évaluera les décisions des établissements à cet égard.

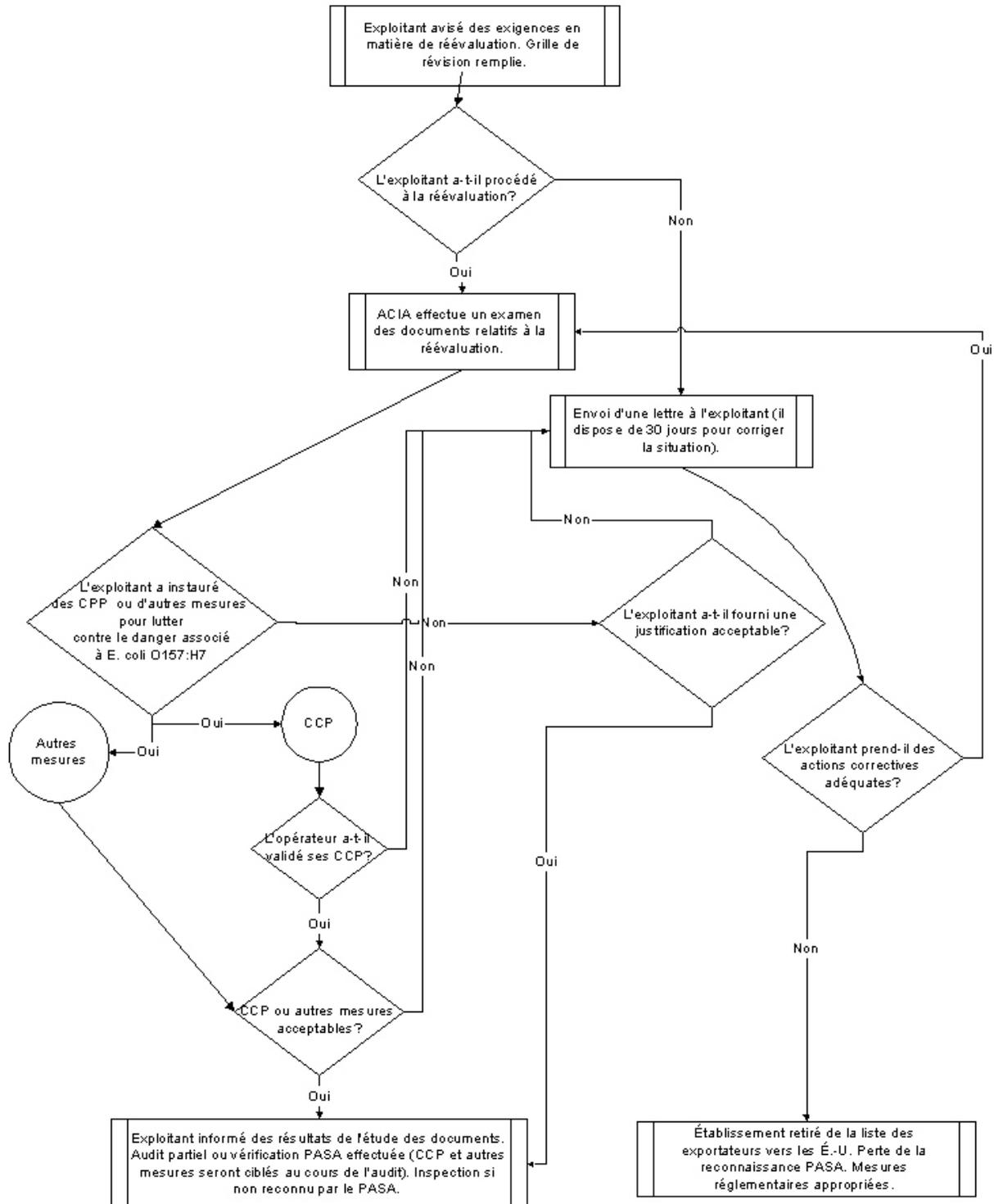
Selon les circonstances, les choix du sort réservé au produit, qui doivent être faits avec l'autorisation de l'ACIA et sous sa supervision, sont les suivants :

- incorporer le produit dans un produit fini bien cuit (si le produit fini est fabriqué dans un établissement différent, le produit contaminé transféré doit porter un sceau officiel du gouvernement, et il faut remplir la formule CFIA/ACIA 3256);
- condamner et dénaturer le produit sous la supervision de l'ACIA;
- dans le cas d'un produit reçu d'un autre établissement agréé, rejeter le produit, le retourner au fournisseur avec un sceau officiel du gouvernement et remplir la formule CFIA/ACIA 3256 pour indiquer le choix du sort réservé au produit.

14. L'ACIA effectuera un examen systématique (voir l'annexe 1 - *E. coli* O157:H7 diagramme de révision de la réévaluation) des données de réévaluation de l'exploitant pour déterminer si les mesures prises pour satisfaire à la présente politique sont acceptables et efficaces. Dans le cadre de ce processus, l'inspecteur responsable de l'ACIA complètera la grille de révision (voir l'annexe 2 - Grille de révision de la réévaluation en présence d'*E. coli* O157:H7 des établissements) et confirmera que les renseignements fournis par l'exploitant (p. ex. coordonnateur HACCP) sont complets et correspondent à la situation réelle au sein de l'établissement.

Si des lacunes sont identifiées, l'exploitant en sera informé par écrit par le coordonnateur PASA et devra déterminer et mettre en œuvre les actions correctives adéquates et fournir une réévaluation révisée dans les trente jours civils suivant l'émission de la lettre. Puisqu'il est nécessaire de recueillir des données de validation pendant une période dépassant les trente jours pour la nouvelle réévaluation, le chef du Réseau de programmes, aliments d'origine animale, du Centre opérationnel pourra accorder un délai supplémentaire après avoir évalué le protocole de validation de l'établissement. Un rapport de suivi doit être transmis chaque mois par le chef du Réseau de programmes, aliments d'origine animale, au gestionnaire national, Programme des viandes. Ce rapport devrait viser tous les établissements supervisés par le Centre opérationnel qui manipulent du bœuf cru et indiquer les résultats de leur réévaluation (voir l'annexe 3). Les exploitants qui ne se soumettront pas à ces exigences perdront leur privilège d'exporter aux États-Unis et, s'ils sont reconnus par le PASA, des étapes seront entreprises pour leur retirer la reconnaissance du PASA selon les procédures établies du programme. Dans le cadre d'une approche axée sur le risque et pour réduire le risque pour les consommateurs, le quartier général de l'ACIA pourrait aussi augmenter le nombre d'échantillons à prélever et à analyser pour la détection d'*E. coli* O157:H7 dans les établissements qui ne se seront pas pliés à ces exigences. La cote de l'établissement pourra également être abaissée en conséquence.

Annexe 1: Diagramme de révision de la réévaluation en présence d'*E. coli* O157:H7



ANNEXE 2 : GRILLE DE RÉVISION DE LA RÉÉVALUATION DES ÉTABLISSEMENTS
 EN PRÉSENCE D'*E. COLI* O157:H7

N° de l'établissement : Nom:

Inspecteur/vétérinaire en chef :

Partie A :

		OUI	NON
Q1	L'établissement reçoit-il ou prépare-t-il des produits de bœuf crus, dont des produits de bœuf intacts (carcasses, quartiers, coupes, etc.) ou d'autres produits non intacts (bœuf haché, VSM, VFT, viande attendrie, etc.)? Si NON, arrêter ici, si oui, passer à la Q2.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q2	L'établissement est-il autorisé à exporter vers les États-Unis?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q3	La taille de l'établissement a-t-elle été confirmée? Si oui, s'agit-il d'un établissement de grande taille, de taille moyenne ou de petite taille? (Encercler la réponse appropriée.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q4	L'établissement a-t-il terminé la réévaluation de son système HACCP basée sur les nouvelles données concernant <i>E. coli</i> O157:H7? Date : Identifier tous les plans HACCP concernant les produits de bœuf crus reçus ou transformés. 1. 2. 3. 4. 5.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q5	À quelle fréquence l'établissement revoit-il et met-il à jour le système HACCP : -annuellement (minimum acceptable) -lorsque des modifications apportées dans l'établissement rendent nécessaires une nouvelle analyse des dangers?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Date de l'examen par l'inspecteur/vétérinaire en chef : Date d'envoi au Centre opérationnel :

Signature de l'inspecteur/vétérinaire en chef :

Commentaires :

.....

Acceptable pour le Centre opérationnel

Signatures :

Date:

Spécialiste du programme:

Coordonnateur PASA:

N° de l'établissement :

Partie B : À remplir pour chacun des plans HACCP indiqués à la partie A - Q4.

Plans HACCP :

		OUI	NON
Q1	<p>L'établissement a-t-il indiqué, sur la formule n° 5, un (des) danger(s) expressément lié(s) à la présence d'<i>E. coli</i> O157:H7?</p> <p>Exemples :</p> <p>Produits de bœuf crus : présence d'<i>E. coli</i> O157:H7 dans le produit cru.</p> <p>Tri des animaux suspects : contamination par <i>E. coli</i> (dont <i>E. coli</i> O157:H7) ou d'autres agents pathogènes par contact avec des animaux souillés pendant l'éviscération.</p> <p>Écorchage : contamination croisée des carcasses par <i>E. coli</i> (dont <i>E. coli</i> O157:H7) ou d'autres agents pathogènes non producteurs de spores lors de l'écorchage (contamination fécale et/ou contact de la portion écorchée avec la peau).</p> <p>Ligature du rectum ou de l'œsophage : contamination par <i>E. coli</i> (dont <i>E. coli</i> O157:H7) ou d'autres agents pathogènes associée à des techniques de travail inadéquates.</p> <p>Éviscération : contamination par <i>E. coli</i> (dont <i>E. coli</i> O157:H7) ou d'autres agents pathogènes associée à des techniques de travail inadéquates.</p> <p>Parage : présence d'agents pathogènes (dont <i>E. coli</i> O157:H7) associée à un parage insuffisant de la région contaminée ou à des techniques ou méthodes de parage inadéquates.</p> <p>Douche finale : non-élimination des bactéries faiblement fixées sur les surfaces externes et internes.</p> <p>Lavage et application d'agents antimicrobiens (jets d'acide organique, chlore, dioxyde de chlore ou solution acidifiée d'hypochlorite de sodium) : survie d'agents pathogènes (dont <i>E. coli</i> O157:H7) en raison d'une désinfection inadéquate.</p> <p>Pasteurisation des carcasses : survie d'agents pathogènes (dont <i>E. coli</i> O157:H7) associée à des techniques inadéquates.</p> <p>Hachage/VSM/VFT/attendrissage : introduction d'agents pathogènes (dont <i>E. coli</i> O157:H7) dans le produit intact lors de la transformation en un produit non intact.</p> <p>Cuisson : survie d'agents pathogènes (dont <i>E. coli</i> O157:H7) associée à des techniques inadéquates (durée, température).</p> <p>Étapes du processus : re-contamination du produit par des agents pathogènes (dont <i>E. coli</i> O157:H7) ou croissance sur les surfaces due ;a une température inadéquate de réfrigération.</p>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

N° de l'établissement :

Q2	<p>A-t-on reporté sur la formule n° 8 les dangers indiqués sur la formule n° 5 et a-t-on déterminé les dangers en se servant de l'arbre de décision? Nota : Les programmes préalables ne permettent pas de réduire à un niveau acceptable les dangers associés à <i>E. coli</i> O157:H7.</p>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q3	<p>À la Q2 de la formule n° 8, en ce qui concerne <i>E. coli</i> O157:H7, considère-t-on comme « probable que la contamination associée au danger dépasse un niveau acceptable ou qu'il y ait accroissement jusqu'à un niveau inacceptable ? » Si on a déterminé que <i>E. coli</i> O157:H7 représentait un danger sur la formule n° 5, la réponse doit normalement être OUI.</p>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q4	<p>L'établissement a-t-il établi un CCP au moyen de l'arbre de décision?</p>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q5	<p>L'établissement avait-il déjà mis en place des mesures contre <i>E. coli</i> O157:H7?</p>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q6	<p>L'établissement a-t-il instauré des mesures additionnelles contre <i>E. coli</i> O157:H7?</p>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q7	<p>Si aucune mesure contre <i>E. coli</i> O157:H7 n'a été prise, avez-vous reçu une justification écrite de l'établissement expliquant pourquoi? -Arrêter ici si l'établissement n'a pris aucune mesure contre <i>E. coli</i> O157:H7 et n'a fourni aucune explication valable. Émettre une lettre (30 jours) à l'exploitant. -Faire suivre au Directeur, Division des aliments d'origine animale à <u>l'Administration centrale</u> la justification ainsi que tous les documents requis. Commentaires de l'inspecteur/vétérinaire en chef (joindre une annexe au besoin) : </p>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q8	<p>A. L'établissement a-t-il la preuve que tous ses fournisseurs de bœuf cru ont mis en œuvre un ou plusieurs CCP qui feront en sorte que la quantité d'<i>E. coli</i> O157:H7 dans le produit reçu sera en deçà du seuil de détection et l'établissement procède-t-il à des analyses microbiologiques de vérification des produits de bœuf crus qu'il reçoit (y compris les produits importés, le cas échéant) on reçoit des certificats d'analyse de ses fournisseurs (analyses complétées dans un laboratoire indépendant avec des méthodes officielles - voir la Politique de l'ACIA sur <i>E. coli</i> O157:H7)? Si non, passer à la question C. La réponse à la Q9 doit être OUI.</p> <p>B. Si le danger associé à la présence d'<i>E. coli</i> O157:H7 dans le produit cru reçu est contrôlé à une étape autre que la réception, est-ce que tous les produits passent par cette étape?</p>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Annexe 4 **Nombre (n) de carcasses de bœuf à sélectionner pour la validation des interventions de réduction microbiologique fondée sur le décompte des entérobactéries (EB)**

N	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
	n dans chaque groupe		
100000	15	133	237
50000	15	133	236
25000	15	133	235
10000	15	132	231
5000	15	130	226
1000	15	118	192
500	15	105	161
100	13	57	71
50	12	37	41
25	10	21	23
10 ou moins	6 ou moins	9 ou moins	10 ou moins

Intervalle de confiance +/- 0,5 log de la différence du décompte des EB avec un niveau de confiance de 95 %

n = nombre de carcasses de bœuf à échantillonner pendant une période de quatre mois selon le volume d'abattage des 4 mois (N)

N = volume d'abattage pendant quatre mois

Groupe 1 = interventions normalisées c-à-d équipement commercial complètement automatisé avec instruments de surveillance p.ex. Pasteurisateur à la vapeur

Groupe 2 = interventions pas complètement normalisées c-à-d, équipement impliquant des interventions manuelles ou n'ayant pas d'instruments de surveillance pour tous les paramètres p. Ex. Aspirateurs à vapeur, vaporisation d'acides organiques, etc...

Groupe 3 = nouvelle intervention ou toute autre intervention

Protocole d'échantillonnage

L'échantillonnage devrait être effectué sur une période de quatre mois. Il est recommandé d'effectuer l'échantillonnage durant les saisons où le taux de prévalence est le plus élevé.

Les carcasses doivent être choisies au hasard tout au long de la période de validation. Il faut déterminer d'avance les jours et les heures de façon à créer un plan d'échantillonnage. Au moment du prélèvement, il faut choisir les carcasses à l'aveugle (p. ex. la 5^e carcasse suivant une carcasse précise choisie expressément). Le prélèvement devrait se faire du côté A (droit ou gauche) pour l'évaluation des EB avant l'intervention prévue. Après l'intervention, le prélèvement devrait se faire du côté B (gauche ou droit) de la même carcasse. Pour la carcasse suivante choisie selon le plan d'échantillonnage, le prélèvement devrait d'abord se faire du côté B (avant), puis du côté A (après). En principe, pour l'évaluation des EB avant l'intervention prévue, il faut alterner entre les côtés A et B des carcasses choisies selon le plan d'échantillonnage.

Évaluation statistique

Pour évaluer l'efficacité de réduction de l'intervention au-delà du hasard, on recommande d'avoir recours au test d'égalité des espérances : observations paires (T-test). Ce test est offert dans Excel (macro complémentaire) dans Outils/Utilitaire d'analyse/Test d'égalité des espérances : observations paires. La plage pour la variable 1 devrait correspondre aux numérations des EB obtenues avant l'intervention. La plage pour la variable 2 devrait correspondre aux numérations des EB obtenues après l'intervention. La différence entre les moyennes (hypothèse) devrait être fixée à 0 et le seuil de signification (niveau alpha), à 0,05. Les interventions réussies devraient produire une valeur *p* inférieure à 0,05.

Tableau 1 : Taille de l'échantillon nécessaire pour obtenir un seuil en deçà de 1 %, de 0,5 % ou de 0,1 % de *E. coli* O157:H7 durant 1 mois avec un niveau de confiance à 95 %

Taille du lot (n ^{bre} d'animaux abattus par mois)	Taille de l'échantillon (seuil de 1,0 %)	Taille de l'échantillon (seuil de 0,5 %)	Taille de l'échantillon (seuil de 0,1 %)
10 - 69	Tous	Tous	Tous
70	69	Tous	Tous
80	78	Tous	Tous
90	87	Tous	Tous
100	95	Tous	Tous
110	103	Tous	Tous
120	110	119	Tous
130	117	129	Tous
140	123	138	Tous
150	129	147	Tous
160	135	156	Tous
170	141	165	Tous
180	146	174	Tous
190	150	182	Tous
200	155	190	Tous
300	189	259	Tous
400	210	310	Tous
500	224	349	499
600	235	378	596
700	243	402	690
800	249	421	781
900	254	437	868
1000	258	450	950
1100	261	461	1028
1200	264	471	1101
1300	266	479	1170
1400	268	486	1235
1500	270	493	1296
1600	272	499	1354
1700	273	504	1408

Taille du lot (n ^{bre} d'animaux abattus par mois)	Taille de l'échantillon (seuil de 1,0 %)	Taille de l'échantillon (seuil de 0,5 %)	Taille de l'échantillon (seuil de 0,1 %)
1800	275	508	1459
1900	276	513	1507
2000	277	517	1552
2100	278	520	1595
2200	279	523	1636
2300	280	526	1674
2400	280	529	1711
2500	281	532	1745
2600	282	534	1778
2700	282	536	1809
2800	283	538	1839
2900	283	540	1867
3000	284	542	1894
3200	285	545	1945
3500	286	549	2012
3800	287	553	2072
4200	288	557	2141
4600	289	560	2201
5100	290	564	2265
5700	290	567	2329
5800	291	568	2339
6700	292	572	2415
7900	293	576	2492
9700	294	580	2576
12 400	295	583	2660
17 200	296	587	2748
28 200	297	591	2841
77 300	298	595	2937
100 000	300	596	2950
125 000	300	600	2959
Plus de 125 000	300	600	3000

Annexe 5

USDA
Microbiology Laboratory Guidebook
Avis de modification

Chapitre nouveau, révisé ou archivé : MLG 5.03

Titre : *Detection, Isolation, and Identification of Escherichia coli O157:H7 and O157:NM (Nonmotile) from Meat Products* (Détection, isolement et identification de souches d'*Escherichia coli* O157:H7 et O157:NM (non mobile) dans les produits de viande)

Date d'entrée en vigueur : Le 25 octobre 2002

Description et objet des modifications :

Les chapitres du *Microbiology Laboratory Guidebook* consacrés aux méthodes sont actuellement en cours de révision. Le formatage sera modifié afin de répondre aux exigences du système de contrôle des documents du laboratoire. D'autres éléments seront ajoutés au contenu, p. ex. la section 5.1.2 : Limites de détection, pour satisfaire aux exigences ISO 17025. Des Mesures de sécurité ont également été insérées dans les chapitres révisés.

Approuvé: Phyllis Sparling, 10/17/02

Grandes lignes de la méthode

- 5.1 Introduction
 - 5.1.1 Généralités
 - 5.1.2 Limites de détection
- 5.2 Sécurité
- 5.3 Mesures de contrôle de la qualité
- 5.4 Équipement, matériel, milieux de culture, réactifs et trousse d'analyse
 - 5.4.1 Équipement
 - 5.4.2 Milieux de culture, réactifs et cultures
 - 5.4.3 Trousses d'analyse
- 5.5 Méthode de détection
- 5.6 Méthode d'isolement
- 5.7 Identification et confirmation
- 5.8 Conservation des cultures
- 5.9 Références

5.1 Introduction

5.1.1 Généralités

La méthode décrite ci-dessous est utilisée pour détecter la présence de *Escherichia coli* O157:H7 et O157:NM (O157:H7/NM) dans les produits de viande crus et prêts-à-manger. La méthode est fondée sur l'enrichissement dans un milieu de culture liquide sélectif, un test de dépistage rapide, la séparation immunomagnétique (SIM) sur des colonnes paramagnétiques et l'étalement sur gélose hautement sélective.

Les résultats sont exprimés en fonction des définitions qui suivent. Un échantillon potentiellement positif provoque une réaction positive au test de dépistage (trousse). Un échantillon présumé positif donne des colonies caractéristiques sur gélose Rainbow et réagit de manière spécifique avec l'antisérum O157. Le terme d'échantillon positif confirmé pour *E. coli* O157:H7 ou *E. coli* O157:NM s'applique à un échantillon pour lequel des épreuves biochimiques et sérologiques confirment l'identité de l'isolat, et dans lequel on a mis en évidence la présence de toxine(s) de Shiga ou de gène(s) codant cette toxine.

À moins d'indication contraire, toutes les mesures mentionnées dans la présente méthode ont une tolérance de $\pm 2\%$.

5.1.2 Limites de détection

Ce test fiable permet de détecter moins de 1 CFU/g (CFU = unité formatrice de colonie) dans un échantillon de 65 g.

5.2 Sécurité

La souche *E. coli* O157:H7/NM est pathogène pour les humains et sa dose infectieuse est faible. (L'ingestion de 100 cellules bactériennes peut suffire à causer la maladie.) Le port de gants et d'une protection pour les yeux est obligatoire, et toutes les surfaces de travail doivent être désinfectées avant et immédiatement après les manipulations. Le personnel de laboratoire doit se conformer aux lignes directrices des CDC (Centers for Disease Control) relatives à la manipulation d'agents pathogènes de la classe de biosécurité II. Une enceinte de biosécurité à flux laminaire de classe II est recommandée pour les manipulations d'agents pathogènes risquant de produire des aérosols. On devrait veiller à obtenir des fabricants et des distributeurs toutes les fiches signalétiques (FS) disponibles sur les milieux de culture, les produits chimiques, les réactifs et les microorganismes utilisés dans les analyses. Le personnel appelé à manipuler ces produits doit lire toutes les FS pertinentes.

5.3 Mesures de contrôle de la qualité

- a. Les géloses Rainbow[®] ont une durée de conservation de 2 semaines.
- b. Tous les milieux de culture et le tampon E doivent être préchauffés à 18-35 °C avant l'utilisation.
- c. La souche fluorescente de *E. coli* O157:H7 recommandée doit être utilisée dans la présente méthode pour détecter la présence de contamination croisée. Le protocole pour l'utilisation des souches fluorescentes de *E. coli* O157:H7 comme témoins positifs est le suivant :

Les souches sauvages de *E. coli* O157:H7 transformées avec le pGFP produisent une protéine verte fluorescente. Grâce à cette transformation, les souches fluorescentes de *E. coli* O157:H7 possèdent la propriété unique d'émettre une fluorescence vert clair visible dans l'obscurité lorsqu'elles sont éclairées au moyen d'une lumière UV de grande longueur d'onde. Cette propriété, qui les distingue des souches typiques de *E. coli* O157:H7, en fait des témoins positifs utiles pour détecter la présence de *E. coli* O157:H7/NM dans les échantillons de viande. À différentes étapes de la méthode, on vérifiera la présence de fluorescence vert clair dans les échantillons et chez les témoins positifs (fluorescents), ce qui constitue une mesure de contrôle de la qualité permettant d'assurer que les isolats d'échantillons positifs proviennent vraiment de l'échantillon et non d'une contamination accidentelle par les témoins positifs.

Les résultats des études effectuées au laboratoire des microorganismes pathogènes du FSIS (Food Safety and Inspection Service) de Beltsville, aux États-Unis, ont montré que ces cultures fluorescentes peuvent être soumises aux techniques d'isolement et d'identification de *E. coli* O157:H7/NM sans perdre leur capacité de fluorescence. Ces souches conservent leurs propriétés de fluorescence lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu SOB additionné d'ampicilline (SOB + A). Tous les 7 jours, elles doivent être repiquées dans du milieu SOB + A frais, tel qu'indiqué ci-dessous. Les colonies fluorescentes peuvent être utilisées comme témoins positifs dès le jour 3 du protocole décrit ci-après, et pendant les 6 jours suivants, sans perdre leurs propriétés de fluorescence. Les cultures peuvent également être conservées pendant 1 mois au réfrigérateur sur des géloses SOB + A placées dans des sacs « zip-lock » ou dans des boîtes de Petri scellées avec du Parafilm[®]. Lorsqu'on en a besoin, il suffit d'ensemencer un bouillon SOB + A frais, 2 jours avant l'utilisation. Il est essentiel de suivre le protocole suivant à la lettre pour assurer que les souches fluorescentes ne perdent pas leur capacité d'émettre la fluorescence verte.

- i. Vérifier la fluorescence de la souche *E. coli* O157:H7 (souche n°EC 465-97 du FSIS ou la souche témoin désignée) sur gélose SOB + A en éclairant les colonies au moyen d'une lampe UV à grande longueur d'onde, dans l'obscurité.
- ii. Ne choisir que des colonies fluorescentes pour ensemencer des tubes contenant 10 mL de bouillon SOB + A. Incuber les tubes à 35 ± 2 °C pendant la nuit.
- iii. À partir des cultures en bouillon, ensemencer en stries des géloses SOB + A. Incuber les boîtes de Petri à 35 ± 2 °C pendant la nuit.
- iv. Vérifier la fluorescence des colonies. À cette étape, on peut utiliser les colonies fluorescentes pour ensemencer du bouillon EC modifié et additionné de novobiocine (mEC+n). Ces cultures sur gélose SOB + A peuvent être conservées au réfrigérateur et utilisées comme témoins positifs pendant 6 jours encore. Incuber les bouillons mEC+n ensemencés au moyen des témoins positifs à 35 ± 2 °C pendant la nuit avec les échantillons à vérifier.
- v. Passer aux sections 5.5 et 5.7 pour poursuivre l'analyse et vérifier la fluorescence des témoins positifs et des cultures d'échantillons positifs sur gélose au sang.

5.4 Équipement, matériel, milieux de culture, réactifs et trousse d'analyse

5.4.1 Équipement

- a. Balance, précision 0,1 g
- b. Homogénéisateur Stomacher^{MC} 400 ou 3500 et sacs Stomacher^{MC} stériles de capacité appropriée, avec ou sans sac-tamis interne (Tekmar Co., Cincinnati, Ohio) ou l'équivalent
- c. Étuve, 35 ± 2 °C
- d. Micropipettes pour des volumes de 15 à 1000 µL, et embouts stériles jetables munis de filtres
- e. Pipetteur et pipettes stériles de 1,0 mL, 5,0 mL et 10,0 mL
- f. Anses à inoculer, étaioirs et aiguilles
- g. Lampe UV (à grande longueur d'onde, ex. VWR 36553-124 ou l'équivalent)
- h. Unité de filtration stérile, filtre en nylon 0,2 µm
- i. Thermomètre à infrarouge
- j. Agitateur LabQuake^{MC} (ou l'équivalent) avec pinces pour tenir les microtubes à centrifugation
- k. Tubes en polypropylène (12 x 75 mm), stériles, jetables (ex. Fisher n° 14-956-1B ou l'équivalent)
- l. Microcentrifugeuse et tubes à microcentrifugation stériles de 1,5 mL
- m. Tubes coniques stériles de 50 mL (ex. Falcon[®] n° 2070 ou l'équivalent) ou bouteilles stériles
- n. Tamis pour suspension cellulaire, stérile (Falcon[®] n° 2340 ou l'équivalent)
- o. Colonnes de séparation MACS[®] pour grosses cellules (Miltenyi Biotec n° 422-02 ou l'équivalent)
- p. Aimant de séparation OctoMACS[®] (Miltenyi Biotec n° 421-09 ou l'équivalent)
- q. Support pour l'aimant de séparation OctoMACS[®] (Miltenyi Biotec n° 423-03 ou l'équivalent)
- r. Plateau autoclavable, environ 130 mm x 83 mm (ex. VWR n° 6266-222 ou l'équivalent) pour utilisation avec l'aimant OctoMACS[®]

5.4.2 Milieux de culture, réactifs et cultures

- a. Bouillon EC modifié additionné de novobiocine (mEC+n) ou l'équivalent
- b. Gélose Rainbow[®] O157 (Biolog Inc., Hayward, Californie, 94545) contenant 10 mg/L de novobiocine et 0,8 mg/L de tellurite de potassium, ou un milieu sélectif équivalent
- c. Gélose trypticase-soja additionnée de 5 % de sang de mouton
- d. Milieu SOB + A
- e. Tampon E, environ 7 mL par échantillon (eau peptonée tamponnée, albumine bovine Sigma n° 7906 [ou l'équivalent] et Tween-20[®] ou l'équivalent)
- f. Désinfectant (Lysol[®] CI 20 % ou l'équivalent)
- g. Billes Dynal[®], n° 710.04, paramagnétiques recouvertes d'anticorps anti-*E. coli* O157 (Dynal Inc., Lake Success, NY 11042) ou l'équivalent
- h. Souche *E. coli* O157:H7 n° 465-97 (témoin positif utilisé dans la méthode)
- i. Souche *E. coli* n° 25922 de l'ATCC (témoin négatif pour les tests de dépistage et de captation par les billes)

5.4.3 Trousse d'analyse

- a. Le test de dépistage de la présence de *E. coli* O157:H7/NM doit satisfaire ou dépasser les exigences suivantes :

Sensibilité	≥ 98 %
Spécificité	≥ 90 %
Taux de faux négatifs	≤ 2 %
Taux de faux positifs	≤ 10 %

- b. Trousse de vérification de l'agglutination au latex pour *E. coli* O157:H7 (RIM[®] *E. coli* O157:H7, REMEL, 12076 Santa Fe Drive, Lenexa, KS 66215, ou l'équivalent)
- c. Trousse et systèmes d'analyses biochimiques (cartes GNI et GNI Plus, Vitek[®] [bioMérieux Vitek Inc., 595 Anglum Drive, Hazelwood, MO 63042-2395] ou l'équivalent)
- d. Trousse de détection de la toxine de Shiga (Premier[®] EHEC, n° 608096 [Meridian Diagnostics Inc., 3471 River Hills Dr., Cincinnati, OH, 45244]) ou l'équivalent

5.5 Méthode de détection

- a. Préparation de l'échantillon
 - i. Analyses microbiologiques des échantillons de bœuf haché cru.
Prélever au hasard cinq sous-échantillons de 65 ± 2 g (total de 325 ± 10 g) représentatifs de l'échantillon entier. Mettre chaque sous-échantillon de 65 ± 2 g dans un sac Stomacher^{MC} stérile muni d'un sac-tamis interne. Ajouter 585 mL de bouillon mEC+n et homogénéiser pendant 2 minutes au moyen de l'appareil Stomacher^{MC}.
 - ii. Galettes de viande cuite et saucissons fermentés secs ou demi-secs.
Préparer au hasard cinq sous-échantillons de 65 ± 2 g (total de 325 ± 10 g) représentatifs de l'échantillon entier. Lorsque approprié, prélever des échantillons représentatifs de la surface extérieure et de la portion intérieure de produits prêts-à-manger, particulièrement les saucissons fermentés secs et demi-secs. Mettre chaque sous-échantillon de 65 ± 2 g dans un sac Stomacher[®] stérile. Ajouter 585 mL de bouillon mEC+n et homogénéiser pendant 2 minutes au moyen de l'appareil Stomacher^{MC}.
 - iii. Échantillons associés à des éclosions.
Prélever au hasard treize sous-échantillons de 25 ± 1 g (total de 325 ± 10 g) représentatifs de l'échantillon entier. Mettre chaque sous-échantillon de 25 ± 1 g dans un sac Stomacher^{MC} stérile muni d'un sac-tamis interne, puis ajouter 225 mL de bouillon mEC+n. Homogénéiser pendant 2 minutes au moyen de l'appareil Stomacher^{MC}.
- b. Incuber tous les sacs (sans agitation) à 35 ± 2 °C, pendant 20 à 24 h. Inclure des témoins positif et négatif, ainsi qu'un témoin de milieu de culture non ensemencé pour chaque group d'échantillons vérifiés. Utiliser la souche fluorescente *E. coli* O157:H7 (n° EC 465-97 du FSIS) comme témoin positif et la souche *E. coli* ATCC n° 25922 comme témoin négatif.
- c. Utiliser les cultures d'enrichissement en sac Stomacher[®] pour faire le test de dépistage de *E. coli* O157:H7/NM selon les instructions du fabricant. La culture d'enrichissement peut être analysée immédiatement après l'incubation sans qu'il soit nécessaire d'attendre qu'elle refroidisse et atteigne la température ambiante. Pour éviter que les embouts de pipette ne s'obstruent, s'assurer de prélever le volume approprié d'échantillon à partir du bouillon de culture se trouvant à l'extérieur du sac-tamis interne.
- d. Noter les échantillons négatifs au test de dépistage, puis s'en débarrasser.
- e. Noter les échantillons positifs au test de dépistage comme des échantillons potentiellement positifs. Commencer la technique d'isolement à partir des cultures d'enrichissement en sac Stomacher^{MC}.

5.6 Méthode d'isolement

Note : Les étapes « a à l » peuvent être effectuées dans l'ordre qui convient le mieux au personnel de laboratoire.

- a. Préparer le tampon E en mélangeant 0,5 g d'albumine bovine et 50 µL de Tween-20[®] dans 100 mL d'eau peptonée tamponnée. Stériliser par filtration (0,2 µm) et conserver à 2-8 °C.
- b. Sortir les géloses Rainbow[®] du réfrigérateur (2-8 °C); prévoir 3 boîtes de Petri pour chaque culture positive au test de dépistage et chaque témoin. S'assurer que les géloses ne présentent aucun signe d'humidité à la surface au moment de l'utilisation. Au besoin, les sécher (ex. jusqu'à 30 minutes sous une hotte à flux laminaire, les couvercles enlevés) avant l'utilisation. Inscrire « séchées » sur les boîtes de géloses séchées non utilisées, les placer dans un sac et les remettre à 2-8 °C.

- c. Sortir une bouteille de tampon E du réfrigérateur (2-8 °C). Pour chaque culture et chaque témoin, verser 7 mL de tampon E dans un tube ou une bouteille stériles, et laisser réchauffer jusqu'à 18 °C, au moins. (Remettre la solution-mère de tampon E à 2-8 °C.)
- d. Pour chaque témoin positif et négatif, ainsi que chaque culture ayant donné un résultat positif au test de dépistage, étiqueter des tubes à centrifugation coniques de 50 mL et les placer dans l'ordre suivant : d'abord le témoin positif, puis le témoin négatif suivi de toutes les cultures à vérifier. Conserver cet ordre pour les étapes subséquentes.
- e. Pour chaque témoin positif et négatif, et chaque culture ayant donné un résultat positif au test de dépistage, étiqueter deux microtubes à centrifugation stériles de 1,5 mL (pour les étapes « g » et « s »), un tube à centrifugation conique de 50 mL (pour l'étape « h ») et deux tubes de 12 x 75 mm munis d'un bouchon (l'un de ces tubes servira pour l'étape « p »). Étiqueter l'un des tubes de 12 x 75 mm et y verser 0,9 mL de tampon E (pour l'étape « q »).
- f. Préparer la suspension de billes immunomagnétiques Dynal n° 710.04 *E. coli* O157:H7 selon les indications du tableau 1 ci-dessous. S'assurer d'inclure les témoins positif et négatif dans le nombre total de cultures à vérifier. Utiliser la suspension de billes immédiatement (étape « g »), ou la conserver à 2-8 °C. Remettre la suspension-mère de billes immunomagnétiques Dynal n° 710.04 *E. coli* O157:H7 à 2-8 °C.
- g. Vortexer brièvement la suspension de billes (2-3 secondes), puis en distribuer des aliquotes de 50 µL dans les microtubes à centrifugation étiquetés à l'étape « e » (soit un tube pour chacun des témoins et chacune des cultures ayant donné un résultat positif au test de dépistage). Utiliser immédiatement ou conserver à 2-8 °C.
- h. lacer un tamis pour suspension cellulaire de 40 µm sur un tube à centrifugation conique de 50 mL étiqueté à l'étape « e ». Pipetter 5 ± 1 mL de chaque témoin et culture d'enrichissement, et déposer les suspensions sur les tamis appropriés. Recueillir au moins 1,0 mL de filtrat.
- i. Ne pas utiliser plus de tubes que ne peut en contenir un aimant OctoMACS®. Transférer 1,0 mL de filtrat (étape « h ») dans le microtube à centrifugation correspondant contenant la suspension de billes immunomagnétiques (étape « g ») et placer les microtubes dans les pinces de l'agitateur-rotateur de tubes LabQuake®. Mélanger par rotation pendant 10-15 min à 18-30 °C.
- j. Fixer l'aimant OctoMACS® au support.
- k. Placer un plateau sur la base du support afin d'y recueillir les filtrats après leur passage sur colonne. Ajouter suffisamment de désinfectant Lysol® à CI de 2 % (ou l'équivalent) pour recouvrir le fond du plateau (environ 300 mL).
- l. Étiqueter le nombre approprié de colonnes pour la séparation de grosses cellules et les placer sur l'aimant OctoMacs®. Insérer les colonnes par l'avant en veillant à ce que la pointe ne touche aucune surface. Laisser les pistons dans les sacs afin d'en maintenir la stérilité.
- m. Déposer au moins 0,5 mL de tampon E sur chaque colonne et laisser passer le volume sur la colonne.
- n. Remettre les cultures en suspension, puis déposer chaque témoin et chaque culture (de l'étape « i ») sur la colonne appropriée.
- o. Une fois les cultures passées sur les colonnes, laver ces dernières avec 1,0 mL de tampon E. Laisser couler le tampon. Répéter 3 fois pour un total de 4 lavages.

- p. Après le dernier lavage, enlever les colonnes de l'aimant OctoMACS[®]. Insérer la pointe d'une colonne dans un tube vide de 12 x 75 mm étiqueté à l'étape « e ». Déposer 1,0 mL de tampon E sur la colonne, et à l'aide du piston fourni avec la colonne, expulser *immédiatement* les billes dans le tube. Faire glisser le piston de manière continue pour éviter les éclaboussures. Boucher les tubes. Répéter pour chaque colonne. Avant de réutiliser l'aimant OctoMACS[®] pour une deuxième série de cultures, le décontaminer en suivant la méthode décrite à l'étape « u » ci-dessous. Répéter les étapes « j à s » pour les autres cultures.
- q. Vortexer brièvement les tubes de l'étape « p » pour remettre les billes en suspension. Préparer une dilution 1:10 de chaque suspension de billes traitées en ajoutant 0,1 mL de la suspension à 0,9 mL de tampon E contenu dans un tube de 12 x 75 mm préparé à l'étape « e ».
- r. Vortexer brièvement pour maintenir les billes en suspension, puis étaler 0,1 mL de chaque tube (étapes « p et q ») sur une gélose Rainbow[®]. Utiliser un étaloir pour bien étaler les billes et veiller à ne pas les étaler contre les parois du Petri.
- s. Vortexer les tubes contenant la suspension de billes non diluée (étape « p ») et transférer celle-ci dans un microtube à centrifugation de 1,5 mL étiqueté à l'étape « e ». Centrifuger pendant au moins 1 minute dans une microcentrifugeuse de table pour sédimenter les billes. Retirer et éliminer le surnageant sans déranger les billes. Ajouter 1,0 mL de tampon E aux billes, les remettre en suspension et les étaler sur une gélose Rainbow[®], tel qu'indiqué à l'étape « r ».
- t. Dès qu'il n'y a plus de trace d'humidité à la surface de la gélose, inverser les boîtes de Petri et les incuber à 35 ± 2 °C pendant 24-26 h.
- u. Pour décontaminer l'aimant OctoMACS[®], verser une solution de Lysol[®] à Cl de 2 % directement sur l'aimant. Laisser agir la solution pendant une dizaine de minutes, puis rincer avec de l'eau désionisée ou de l'eau du robinet. Laisser sécher l'aimant à l'air ou l'essuyer avec du papier essuie-tout.

TABLEAU 1

N° de culture	Billes* (µL)	Tampon (µL)	N° de culture	Billes* (µL)	Tampon (µL)
1	15	135	26	145	1305
2	20	180	27	150	1350
3	25	225	28	155	1395
4	30	270	29	160	1440
5	35	315	30	165	1485
6	40	360	31	175	1575
7	45	405	32	180	1620
8	50	450	33	185	1665
9	55	495	34	190	1710
10	60	540	35	195	1755
11	65	585	36	200	1800
12	70	630	37	205	1845
13	75	675	38	210	1890
14	80	720	39	215	1935
15	85	765	40	220	1980
16	90	810	41	230	2070
17	95	855	42	235	2115
18	100	900	43	240	2160
19	105	945	44	245	2205
20	110	990	45	250	2250
21	120	1080	46	255	2295
22	125	1125	47	260	2340
23	130	1170	48	265	2385
24	135	1215	49	270	2430
25	140	1260	50	275	2475

*Billes Dynal® paramagnétiques recouvertes d'anticorps anti-*E. coli* O157:H7 (vortexer brièvement avant l'utilisation)

5.7 Identification et confirmation

- a. Après l'incubation, les colonies de *E. coli* O157:H7 sont de couleur noire ou grise sur gélose Rainbow[®]. Lorsque les colonies de *E. coli* O157:H7 sont entourées de colonies roses ou magenta, elles peuvent présenter une teinte bleutée. Marquer les colonies caractéristiques de *E. coli* O157:H7, puis procéder aux tests d'agglutination au latex pour O157 en suivant les instructions du fabricant. Ensemencer en stries des géloses au sang avec toutes les colonies ayant présenté un test positif d'agglutination au latex jusqu'à un maximum de 5 colonies par échantillon (une colonie par sous-échantillon, si possible). Incuber les boîtes de Petri à 35 ± 2 °C pendant 16 à 24 h.

Note : S'il n'y a aucune colonie caractéristique de *E. coli* O157:H7 sur les géloses Rainbow[®], laisser les boîtes de Petri à 20-24 °C pendant 6 à 24 h de plus, puis les examiner de nouveau.

- b. Après l'incubation, vérifier la pureté des cultures sur les géloses au sang à la lumière visible, puis vérifier la présence de contamination croisée par le témoin positif à la lumière UV de grande longueur d'onde. Seul le témoin positif, la souche 465-97 de *E. coli* O157:H7 devrait émettre de la fluorescence. Si les cultures sur les géloses au sang semblent pures et non contaminées, procéder aux épreuves de confirmation suivantes.
 - i. Confirmation biochimique
Ensemencer des cartes GNI ou GNI Plus, Vitek[®], ou utiliser un système équivalent d'épreuves d'identification. L'épreuve de la cytochrome oxydase et la coloration de Gram sont facultatives.
 - ii. Confirmation sérologique
Pour confirmer l'absence ou la présence des antigènes O157 et H7, utiliser une trousse d'agglutination au latex pour *E. coli* O157:H7 (RIM[®] ou l'équivalent) et les cultures sur gélose au sang (de l'étape « b »).
 - iii. Confirmation de la présence de toxine de Shiga ou de gènes codant celle-ci.
La présence de toxine(s) de Shiga dans un isolat doit être confirmée au moyen d'une épreuve de détection, p. ex. la trousse Premier[®] EHEC de Meridian ou l'équivalent. Lorsque aucune toxine de Shiga n'est détectée, recourir à la PCR pour confirmer la présence d'au moins un gène codant une toxine de Shiga. Le témoin positif *E. coli* O157:H7 ne produit pas de toxine.
- c. Si les tests confirment qu'il s'agit de *E. coli* O157:H7 ou de *E. coli* O157:NM (ou encore une souche O157 à l'antigène H indéterminé) et que la ou les toxines de Shiga et/ou un ou des gènes codant ces toxines sont détectés, l'échantillon sera considéré comme positif pour *E. coli* O157:H7, et des mesures réglementaires seront prises. On vérifiera également la possibilité d'association épidémiologique entre les cultures au moyen de l'électrophorèse sur gel en champs pulsés.

5.8 Conservation des cultures

Pour les exigences relatives à la conservation de la souche fluorescente *E. coli* O157:H7 (n° EC 465-97 du FSIS ou la souche témoin désignée), consulter la section 5.3.c du présent chapitre.

Conserver les cultures « de travail » de *E. coli* sur des géloses nutritives en pente. Repiquer les cultures une fois par mois, en duplicata, sur des géloses nutritives en pente, les incubent à 35 ± 1 °C pendant la nuit, puis les conserver à 4-8 °C. Utiliser l'une des géloses en pente comme culture de travail et l'autre pour le repiquage afin de réduire le risque de contamination. Les cultures peuvent être repiquées jusqu'à 5 fois. Ensuite, il faut confirmer leur identité de nouveau au moyen d'épreuves biochimiques ou partir une nouvelle culture.

Pour conserver les cultures pendant de longues périodes, les congeler au moyen de billes de congélation, ex. CryoStor^{MC}, ou les lyophiliser.

5.9 Références

- Ewing, W. H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th Ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
- Fratamico, P. M., M. Y. Deng, T. P. Strobaugh, and S. A. Palumbo. 1997. Construction and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains expressing firefly luciferase and green fluorescent protein and their use in survival studies. *J. Food Prot.* **60**:1167-1173.
- Harrison, B. and D. Warburton. 1997. Identification of *Escherichia coli* verotoxins by the Meridian Premier EHEC kit®. Laboratory procedure MFLP-93 *In* The Compendium of Analytical Methods, Vol. 3. Health Protection Branch, Health Canada, Ottawa, Canada
- Hitchins, A. D., P. Feng, W. D. Watkins, S. R. Rippey, and L. A. Chandler. 1995. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Chapter 4 *In* FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th ed., p. 4.23. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Hitchins, A. D., P. A. Hartman, and E. C. D. Todd. 1992. Coliforms-*Escherichia coli* and its toxins, p. 325-369. *In* C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser (ed.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd Edition. Amer. Publ. Hlth. Assoc., Washington, D.C. 20005.
- Okrend, A. J. G., B. E. Rose, and B. Bennett. 1990a. A research note: A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J. Food Prot.* **53**:249-252.
- Park, C. H., K. M. Gates, N. M. Vandl, and D. L. Hixon. 1996. Isolation of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (O157 and non-O157) in a community hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **26**:69-72.
- Richmond, J.Y. and R.W. McKinney (ed.). 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Sharar, A. K. and B.E. Rose, 1998. Detection, isolation, and identification of *Escherichia coli* O157:H7 AND O157:NM (nonmotile) from meat products. Chapter 5 in the Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd ed. USDA Food Safety Inspection Service.
- Taormina, P. J., M. Rocelle, S. Clavero, and L. R. Beuchat. 1998. Comparison of selective agar media and enrichment broths for recovering heat-stressed *Escherichia coli* O157:from ground beef. *Food Microbiol.* **15**:631-638.
- Weagant, S. D., J. L. Bryant, and K. G. Jinneman. 1995. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* from foods. *J. Food Prot.* **58**:7-12.