



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

IDENTIFICATION DU *E. COLI* O157 AU MOYEN D'ANTI-*E. COLI* O157 DYNABEADS®

Don Warburton  
et les membres du Comité des méthodes microbiologiques  
Division de l'évaluation  
Bureau de dangers microbiens  
Direction des aliments, Santé Canada  
Repère postal : 2204A1  
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Courriel : [Don.Warburton@hc-sc.gc.ca](mailto:Don.Warburton@hc-sc.gc.ca)

1. APPLICATION

La présente méthode s'applique à l'isolement du *Escherichia coli* O157 viable dans les aliments, afin d'en déterminer la conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*. Si des mesures de conformité fondées sur les produits sont prévues, et lorsque stipulé, les méthodes de la DGPS ou la procédure MFLP 80 (8.1) doivent être employées aux fins de confirmation définitive des isolats (voir le point 7). Cette méthode révisée remplace la procédure MFLP-90 (avril 1997).

2. PRINCIPE

L'épreuve *anti-E. Coli* O157 de Dynabeads® est une technique de culture rapide fondée sur l'enrichissement sélectif de la bactérie *E. coli* O157, effectuée directement à partir d'échantillons préenrichis au moyen de la technique de séparation immunomagnétique (SIM). La technique SIM est fondée sur une microsphère en polystyrène uniforme et superparamagnétique appelée Dynabeads®. Dans cet essai, on recouvre les microsphères Dynabeads® d'anticorps d'anti *E. coli* O157 absorbés et purifiés par affinité. On incube les microsphères avec 1,0 mL d'échantillon préenrichi. Au cours de l'incubation, la bactérie *E. coli* O157 présente dans l'échantillon se fixe à la surface de la microsphère. On sépare les complexes bille-bactérie de l'échantillon à l'aide d'un concentrateur de particules magnétiques (DynaL MPC®- M). Onensemence ensuite les complexes bille-bactérie sur des milieux de culture sélectifs dans des boîtes de Pétri. Après l'incubation, on examine les boîtes pour y repérer les colonies qui présentent des caractéristiques morphologiques typiques de la croissance de *E. coli* O157.

3. DÉFINITION

Voir l'annexe A du volume 3.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

Dynabeads® et Dynal MPC® sont des marques de commerce de Dynal A.S Oslo (Norvège). Les produits Dynal sont distribués par Invitrogen Canada inc., 2270, rue Industrial, Burlington (Ontario). Téléphone : 1-800-263-6236. Télécopieur : 1-800-387-1007.

## 5. FOURNITURES ET MATÉRIAUX SPÉCIAUX

**Nota :** Le superviseur du laboratoire doit veiller à ce que l'analyse décrite dans cette méthode soit appliquée conformément à la norme de l'Organisation internationale de normalisation intitulée « ISO/CEI 17025:2005 (ou la version la plus récente), Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ».

Les milieux énumérés ci-dessous sont disponibles sur le marché et doivent être préparés et stérilisés conformément aux instructions du fabricant. Consulter le volume 3 de l'annexe G pour les formules des milieux.

- 1) Le réactif *anti-E. coli* 0157 de Dynabeads® est disponible en deux formats contenant suffisamment de réactif pour effectuer 50 ou 250 analyses.
- 2) Il faut utiliser le concentrateur de particules magnétiques Dynal MPC®M pour effectuer l'analyse.
- 3) Bouillon d'enrichissement, milieux d'isolement et suppléments (voir la procédure MFLP-80).
- 4) Il faut aussi disposer d'un agitateur-mélangeur d'échantillons capable de mélanger par inclinaison, tournoiement ou rotation. L'agitateur- mélangeur d'échantillons Dynal est disponible chez Dynal Inc., mais on peut adapter des mélangeurs ordinaires de laboratoire à ce protocole.
- 5) Tampon de lavage PBS-Tween (distribué par Sigma - n° de produit P3563)
- 6) Micropipettes (10 µL à 100 µL)
- 7) Pipette distributrice (1,0 mL)
- 8) Microtubes à centrifuger (1,5 mL)
- 9) Écouvillons stériles
- 10) Appareil automatisé de séparation immunomagnétique BeadRetriever® (facultatif)

## 6. MARCHE À SUIVRE

### 6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

Voir la procédure MFLP-80

### 6.2 Préparation de l'analyse

Voir la procédure MFLP-80 (ou toute autre méthode du *Compendium* pour la bactérie *E. coli* O157, dont certaines utilisent différents protocoles d'enrichissement).

### 6.3 Préparation de l'échantillon

Voir la procédure MFLP-80. En plus du protocole de la procédure MFLP-80, l'échantillon enrichi peut être incubé pendant de plus courtes périodes (p. ex. entre 6 et 18 heures), si la méthode de dépistage le prévoit. Le cas échéant, respecter les instructions précises fournies avec la méthode de dépistage

pour les types de produits qui peuvent être analysés pendant de plus courtes périodes d'incubation que celles recommandées dans la procédure MFLP-80.

#### **6.4 Technique automatisée de SIM**

L'utilisateur doit transférer de façon aseptique tous les réactifs et tous les échantillons séquentiellement dans les tubes lorsque les languettes de tubes ont été insérées dans le support. Placer une languette de 5 tubes jetables dans un support BeadRetriever® pour chaque échantillon à analyser et transférer de façon aseptique les réactifs dans chaque tube. L'onglet sur la rangée de tubes peut servir pour l'étiquetage des échantillons.

- 6.4.1 Transférer de façon aseptique 10 µL du réactif anti-E. coli 0157 de Dynabeads® bien mélangé dans les tubes d'échantillon n° 1 et 2 de la languette de tubes.
- 6.4.2 Transférer de façon aseptique 500 µL du tampon de lavage PBS-Tween dans les tubes d'échantillon n°s 1 et 2 de la languette de tubes.
- 6.4.3 Transférer de façon aseptique 1 mL du tampon de lavage PBS-Tween dans les tubes d'échantillon n°s 3 et 4 de la languette de tubes.
- 6.4.4 Transférer de façon aseptique 100 µL du tampon de lavage PBS-Tween dans le tube d'échantillon n° 5 de la languette de tubes.
- 6.4.5 Retirer le tube sélectionné du support A et le placer dans le support B (à un mètre de distance pour éviter toute éventuelle contamination croisée). Transférer 500 µL d'un échantillon à éprouver dans les tubes n°s 1 et 2 et placer le tube inoculé dans le support A. Répéter cette procédure pour tous les autres échantillons.
- 6.4.6 Insérer de façon aseptique les peignes d'embout de protection stériles dans l'appareil.
- 6.4.7 Insérer le support de tubes remplis dans l'appareil et le verrouiller en place.
- 6.4.8 Vérifier le bon alignement du support et fermer la porte de l'appareil.
- 6.4.9 Sélectionner la séquence de programme EPEC/VTEC en défilant vers le bas à l'aide de la touche fléchée et appuyer sur le bouton **START (démarrer)**.
- 6.4.10 La porte de l'appareil doit demeurer fermée lorsque l'appareil est en fonction. Chaque étape du traitement et le temps total restant s'affichent sur l'écran à cristaux liquides.
- 6.4.11 Dès que le programme est terminé, retirer de l'appareil le support de tubes et ensemercer les complexes bille-bactérie du tube n° 5, conformément au point 6.6.
- 6.4.12 Retirer les peignes d'embout et les jeter, ainsi que les languettes de tubes, dans un contenant de matières infectieuses.

#### **6.5 Technique manuelle de SIM**

Pour éviter toute contamination croisée et à des fins de sécurité, il est conseillé d'effectuer la séparation immunomagnétique à l'aide de l'appareil BeadRetriever®. Si ce dernier n'est pas disponible, l'utilisateur doit rigoureusement observer les bonnes pratiques de laboratoire et suivre à la lettre les instructions du fabricant pour obtenir des résultats valides.

- 6.5.1 Retirer la plaque magnétique et charger le nombre nécessaire de tubes à microcentrifuge (1,5 mL) dans le concentrateur de particules magnétiques Dynal® MPC-S.

- 6.5.2 À l'aide d'un agitateur-mélangeur vortex, bien mélanger le réactif *anti-E. coli* 0157 de Dynabeads® et ce, jusqu'à la re-suspension complète du culot. À l'aide d'une pipette, transférer 20 µL du réactif *anti-E. coli* 0157 de Dynabeads® dans chaque tube.
  - 6.5.3 Ajouter 1,0 mL de l'aliquote d'échantillon préenrichi (voir le point 6.3) et refermer le tube. Utiliser un embout de pipette neuf pour chaque échantillon.
  - 6.5.4 Inverser à quelques reprises le support du concentrateur de particules magnétiques Dynal MPC-S®. Incuber à la température ambiante pendant 10 minutes en agitant doucement et de façon continue pour prévenir le dépôt des billes au fond du tube.
  - 6.5.5 Insérer la plaque magnétique dans le concentrateur de particules magnétiques Dynal MPC-S®. Inverser le support à plusieurs reprises pour concentrer les billes en amas sur les parois du tube. Attendre 3 minutes pour assurer une bonne récupération.
  - 6.5.6 Ouvrir les bouchons des tubes à l'aide d'un ouvre-tube et aspirer soigneusement le surnageant, ainsi que tout liquide résiduel sur le bouchon du tube, et les jeter dans un contenant de matières infectieuses.
  - 6.5.7 Retirer la plaque magnétique du concentrateur de particules magnétiques Dynal MPC-S®.
  - 6.5.8 Ajouter 1,0 mL de tampon de lavage PBS-Tween. La pipette ne doit pas entrer en contact avec le tube pour éviter toute contamination croisée entre les échantillons et le tampon de lavage. Refermer le bouchon du tube et inverser le concentrateur de particules magnétiques Dynal MPC-S® à quelques reprises pour remettre les billes en suspension.
  - 6.5.9 Répéter les étapes des points 6.5.5 à 6.5.8.
  - 6.5.10 Répéter les étapes des points 6.5.5 à 6.5.7.
  - 6.5.11 Remettre en suspension les complexes bille-bactérie Dynabeads® dans 100 µL de tampon de lavage PBS tween. Mélanger brièvement à l'aide d'un agitateur-mélangeur vortex.
- 6.6 Isolement de la bactérie *E. coli* O157:H7**
- 6.6.1 Dès que la séparation Immunomagnétique est terminée, transférer 50 µL ou la moitié des billes remises en suspension sur les milieux précisés dans la procédure MFLP-80.
  - 6.6.2 À l'aide d'un écouvillon stérile, ensemercer les complexes bille-bactérie sur une moitié de la plaque Pétri, pour assurer la rupture des complexes bille-bactérie. Diluer davantage par étalement sur plaque à l'aide d'une anse. Toujours ramener l'anse à plusieurs reprises dans le dernier quadrant ensemençé pour veiller à ce que les billes se déposent sur un nouveau quadrant non ensemençé.
  - 6.6.3 Incuber les plaques Pétri, conformément à la procédure MFLP-80.

## 7. CONFIRMATION

Les colonies qui présentent une morphologie caractéristique du *E. coli* O157 sur une gélose sélective doivent être confirmées à l'aide des techniques biochimiques et sérologiques prévues dans la procédure MFLP-80 (MFLP-80 indique le nombre de colonies nécessaires pour la confirmation).

## 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Warburton, D. et D. Christensen (2006). Isolement du *E coli* O157 dans les aliments (MFLP-80). Volume 3, *Compendium de méthodes*, Santé Canada, Ottawa. Publié sur le site Web de la Direction des aliments (Santé Canada) à l'adresse :  
**[http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index\\_f.html](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index_f.html)**.
- 8.2 Invitrogen. Mars 2005. Manuel de l'utilisateur de l'appareil BeadRetriever®.  
**[http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/1189\\_BeadRetriever\\_Manual.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/1189_BeadRetriever_Manual.pdf)**