



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉTECTION D'E. COLI ENTÉROHÉMORRAGIQUE (ECEH) DANS LES PRODUITS ET LES INGRÉDIENTS ALIMENTAIRES PAR L'ÉPREUVE IMMUNO-ENZYMATIQUE (EIE) ASSURANCE® ECEH

**Don Warburton
et le Comité des méthodes microbiologiques
Division de l'évaluation du Bureau des dangers microbiens,
Direction des aliments, repère postal 2204A1
Direction générale des produits de santé et des aliments (DGPSA)
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

Courriel : Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

La présente méthode s'applique à la détection des bactéries *E. coli* 0157 entérohémorragiques dans les produits et ingrédients alimentaires pour déterminer la conformité avec les exigences des articles 4 et 7 de la *Loi des aliments et drogues*.

Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-81, datée de septembre 1995.

2. DESCRIPTION

L'épreuve immuno-enzymatique (EIE) Assurance® ECEH est une méthode qui détecte *E. coli* entérohémorragique (ECEH), y compris *E. coli* 0157:H7. Elle fait appel à des anticorps hautement spécifiques dirigés contre les antigènes d'ECEH et a été conçue spécialement pour réduire le plus possible la réactivité croisée avec de nombreuses entérobactéries. Des études (données non publiées) de l'OACA (8.1 - 8.3) et de la DGPSA ont montré que cette méthode donnait des résultats satisfaisants dans le cas des aliments contaminés. Elle peut être utilisée pour déceler la présence d'ECEH dans les produits et les ingrédients alimentaires et dans les échantillons environnementaux.

3. PRINCIPE

La méthode EIE Assurance® se sert d'anticorps brevetés ayant une grande affinité pour les antigènes d'ECEH, fixés dans les puits de microplaques. Des échantillons enrichis de manière appropriée et des témoins positifs sont ajoutés dans les microplaques; tout antigène d'ECEH présent se liera à la microplaque, formant un complexe antigène-anticorps. La fraction non réactive de l'échantillon est éliminée par lavage. Un conjugué phosphatase alcaline-anticorps est ajouté et, après incubation, le conjugué non lié est éliminé

par lavage. Le substrat, le p-nitrophénylphosphate, est ajouté; l'absorbance du produit enzymatique ainsi obtenu est lue à 405-410 nm.

4. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT 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 17025:1999 (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 1 de l'annexe G pour les formules des milieux.

Nota : Si l'analyste utilise une variation du milieu mentionné (soit un produit disponible sur le marché ou créé de toute pièce) il est de sa responsabilité ou de celle du superviseur du laboratoire d'en assurer l'équivalence).

- 1) Épreuve immuno-enzymatique Assurance® pour ECEH (BioControl Systems Inc. 12822, 32^e rue SE, Bellevue, WA, 98005, États-Unis, téléphone : [425] 603-1123, ou 1 800 245-0113, Téléc. : [425] 603-0070)
- 2) Bouillon trypticase-soja modifié avec novobiocine (BTSm-n)
- 3) Stomacher Colworth 400, mélangeur ou l'équivalent
- 4) Incubateurs capables de maintenir une température de 35-37 °C ou 42 °C (voir 7.3.3.)

Nota : Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à ce que les incubateurs et les bains-marie soient maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande une température de 35 °C dans le texte de la méthode, la température des incubateurs peut varier de +/-1,0 °C. Il en est de même pour les températures plus basses de 30 ou 25 °C. Toutefois, dans le cas de recommandations de températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, l'écart ne doit absolument pas dépasser 0,5 °C puisque le chauffage pourrait tuer le micro-organisme isolé.

- 5) Bain-marie capable de maintenir une température de 100 °C (ou autoclave à vapeur réglé à 100 °C)
- 6) Laveur de microplaques (facultatif)
- 7) Lecteur de microplaques ou photomètre muni d'un filtre 405-410 nm, capable de lire les microplaques
- 8) Sac filtre Stomacher, avec sac-filet interne (VWR Scientific) ou l'équivalent.
- 9) Embouts de filtration pour pipettes (FiltaFlex, Almonte, Ontario, Téléphone/télécopieur : [613] 256-3066) ou l'équivalent.
- 10) Triton X-100

7. PROCÉDURE

Les unités d'échantillonnage peuvent être analysées individuellement ou regroupées en composite. Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

7.1.1 Garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5 °C) ou au congélateur selon la nature du produit. Les aliments non périssables n'ont pas besoin d'être réfrigérés. Faire dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.

7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation de l'analyse

7.2.1 Avoir sous la main un bouillon BTSm-n stérile, réchauffé à l'avance.

7.2.2 Nettoyer la surface de travail à l'aide d'un désinfectant approprié.

7.3 Préparation de l'échantillon

7.3.1 Pour obtenir une unité d'analyse vraiment représentative, agiter les liquides ou les matières s'écoulant librement jusqu'à homogénéité. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, obtenir l'unité d'analyse en prélevant une portion dans plusieurs endroits de l'unité d'échantillonnage. Pour réduire la charge de travail, les unités d'analyse peuvent être regroupées pour l'analyse. Il est recommandé que l'échantillon composite ne contienne pas plus de 500 g.

Nota : L'utilisation de sacs Stomacher avec sac-filet interne est recommandée pour l'analyse de certains échantillons (p. ex. épices) à cause des particules.

7.3.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en mélangeant aseptiquement à l'aide d'un mélangeur ou d'un Stomacher 25 g ou ml (l'unité d'échantillonnage) dans 225 ml de bouillon BTSm-n réchauffé au préalable. Dans le cas de certaines épices, il faut utiliser des dilutions plus grandes contenant du $K_2 SO_4$ (voir MFLP-80).

Nota : Dans le cas des prises d'essai visqueuses (p. ex. fromage en poudre), ajouter $\leq 2,25$ ml de Triton X-100 à la vapeur par 225 ml de BTSm-n au moment de l'ajout des prises d'essai et avant l'incubation.

7.3.3 Incuber pendant la nuit (au moins 18 h) à 35-37 °C ou 42 °C.

Nota : On a constaté que l'incubation à 42 °C peut réduire le nombre de bactéries concurrentes et de fausses réactions positives.

7.4 Préparation de l'échantillon pour l'EIE

7.4.1 Après incubation, bien mélanger le bouillon d'enrichissement BTSm-n. Laisser suffisamment de temps pour permettre aux particules de sédimenter, puis transférer 1 ml de solution dans un tube à essai.

Nota : Les particules présentes dans l'échantillon peuvent colmater certains laveurs automatiques. Il est recommandé d'utiliser un embout de filtration, lorsqu'on pipette un échantillon.

Conserver l'échantillon enrichi (BTSm-n) à 2 - 8 °C pour la confirmation des résultats présumés positifs (section 7.10).

- 7.4.2 Inactiver les micro-organismes en plongeant la fraction de 1,0 ml dans un bain-marie en ébullition pendant 10 minutes. Refroidir les tubes à la température de la pièce avant de procéder à l'analyse. Les tubes ayant bouilli peuvent être réfrigérés à 4-8 °C pendant une période allant jusqu'à 4 jours avant d'être analysés.

7.5 Préparation du réactif

- 7.5.1 Avant de commencer l'épreuve, préparer les réactifs et laisser toutes les composantes de la trousse parvenir à la température de la pièce. Conserver les micropuits non utilisés dans la pochette scellée avec le desséchant et tous les réactifs non utilisés dans des contenants fermés à 2-8 °C.
- 7.5.2 Préparation de la solution de lavage - Ajouter 1,0 ml du concentré de solution de lavage dans 100 ml d'eau distillée. Étiqueter le contenant. Ce volume est suffisant pour laver 40 puits. La solution de lavage est stable pendant 30 jours à la température ambiante.

7.6 Préparation du lecteur

- 7.6.1 Munir le lecteur de microplaques d'un filtre de 405 ou 410 nm.

7.7 Procédure pour l'épreuve immuno-enzymatique

- 7.7.1 Placer le nombre nécessaire de micropuits dans le support, en prenant soin d'inclure deux témoins positifs et un blanc. Refermer les micropuits non utilisés. Noter soigneusement la position des témoins positifs, du blanc et des échantillons dans le support.
- 7.7.2 Les bouillons pour épreuve non activés doivent être équilibrés à 25 - 37 °C avant l'exécution de l'épreuve. Ne pas mélanger les bouillons pour épreuve non activés (de 7.4.2). Utiliser un nouvel embout de pipette par échantillon.
- 7.7.3 Pipetter 100 microlitres (µL) de bouillon inactivé dans chaque micropuits. Éviter les particules alimentaires dans le liquide transféré. Mélanger le témoin positif au vortex et pipetter 100 µL dans chacun des puits réservés aux témoins positifs. **POUR LE BLANC, LAISSER LE PUIITS VIDE.**
- 7.7.4 Couvrir la microplaque et incubé pendant 30 minutes à 35-37 °C. Ne rien empiler sur le support à micropuits durant l'incubation. Ne pas agiter la microplaque pendant les étapes d'incubation.
- 7.7.5 Procédure de lavage; après l'incubation, laver chaque puits trois fois à l'aide d'une des manières suivantes :
- 1) Enlever complètement le contenu des puits à l'aide d'un laveur de micropuits. Remplir immédiatement les puits avec 250 µL de solution de lavage.
 - 2) Il est acceptable d'enlever le contenu des puits en renversant la microplaque et en la tapotant vigoureusement. Remplir les puits avec une solution de lavage provenant d'un flacon laveur préalablement nettoyé.
- Répéter deux autres fois pour un total de trois cycles d'aspiration-lavage par étape. Éviter de trop remplir les puits pour empêcher que l'antigène déborde dans les puits non réactifs adjacents, mais remplir suffisamment pour que le lavage soit efficace. Un lavage efficace est indispensable pour obtenir des résultats exacts. Enlever le surplus de la solution de lavage en renversant les puits et en les tapotant avant de passer à l'étape suivante.
- 7.7.6 Immédiatement après l'étape d'aspiration du troisième lavage, inverser la bouteille de conjugué pour mélanger doucement son contenu. Ajouter 100 µL dans chaque puits, y compris les puits témoins et le blanc. Couvrir et incubé 30 minutes à 35-37 °C.

- 7.7.7 Après l'incubation, aspirer le contenu des puits et laver ces derniers trois fois chacun. Consulter 7.7.5 pour les instructions de lavage.
- 7.7.8 Immédiatement après l'aspiration du troisième lavage, mélanger doucement et ajouter 100 µL de substrat dans chaque puit, y compris les puits témoins et le blanc. Couvrir et incuber 30 minutes à 35-37 °C. Après l'incubation, NE PAS laver les puits. Passer directement à l'étape 7.8.

7.8 Lecture des résultats

- 7.8.1 Immédiatement après l'incubation, lire et consigner les résultats.

Nota : Pour obtenir des résultats valides, le lecteur de microplaques doit être étalonné par rapport au BLANC bien avant la lecture des échantillons et des témoins.

- 7.8.2 Standardiser le lecteur en faisant une lecture du BLANC et en réglant la densité optique (D.O.) à zéro.
- 7.8.3 Lire la D.O. des puits de chacun des échantillons en commençant pas les deux témoins positifs à l'aide d'un lecteur de microplaques réglé à 405-410 nm.

Nota : Lorsque le lecteur est standardisé par rapport au BLANC, certains échantillons peuvent donner une valeur inférieure à zéro (lecture négative). Ce phénomène n'est pas rare et indique un résultat négatif.

- 7.8.4 Si la lecture est retardée, ajouter 50 µL de solution d'arrêt dans chaque puits. Lire dans un délai inférieur à une heure.

7.9 Interprétation des résultats

- 7.9.1 Valeur des témoins : Les valeurs de D.O. des témoins positifs devraient être supérieures ou égales à 0,8 unité. Les valeurs de D.O. inférieures à 0,8 unité peuvent indiquer l'existence d'un problème en ce qui a trait à la méthode de lavage. Communiquer avec les services techniques de BioControl pour plus d'information.
- 7.9.2 Valeur limite : Calculer la moyenne des valeurs de D.O. des deux témoins positifs et multiplier par 0,25 pour déterminer la valeur limite :
Lorsque $TP1 + TP2 =$ valeurs de D.O. des témoins positifs. Répéter les témoins positifs pour chaque série de tests.

Nota : La plage linéaire des lecteurs de microplaques varie selon les spécifications du fabricant. Si le TP donne une valeur supérieure ou équivalente à 2,5, utiliser cette valeur pour les calculs.

- 7.9.3 Résultats positifs : Les échantillons ayant une valeur d'absorbance supérieure ou égale à la valeur limite sont présumées positives. Les résultats positifs doivent être confirmés.
- 7.9.4 Résultats négatifs : Les échantillons ayant une valeur d'absorbance inférieure à la valeur limite sont négatifs.

7.10 Confirmation des résultats positifs obtenus avec l'EIE

Les échantillons ayant une valeur d'absorbance supérieure ou égale à la valeur limite sont présumées positives. Les résultats positifs doivent être confirmés à l'aide de la méthode de culture décrite dans la méthode MFLP-80. Utiliser l'échantillon conservé en 7.4.1.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 FELDSINE, P.T., GREEN, S. T., LIENAU A.H. et collab., 2005. Comparative Validation Study to Demonstrate the Equivalence of a Minor Modification to AOAC Methods 996.09, VIP® for EHEC and 996.10, Assurance EIA® EHEC with Reference Culture Method for the Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Beef. *J. AOAC Int.* 88 (4): pp. 1193-1196.
- 8.2 FELDSINE, P.T., KERR, D.E., LEUNG, S.C. et collab., 2002. Visual Immunoprecipitate Assay Eight Hour Method for Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Raw and Cooked Beef (modification de la méthode officielle de l'AOAC 996.09): Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 85 (5): pp. 1029-1036.
- 8.3 FELDSINE, P.T., KERR, D.E., LEUNG, S.C. et collab., 2002. Assurance® Enzyme Immunoassay Eight Hour Method for Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Raw and Cooked Beef (modification de la méthode officielle de l'AOAC 996.10): Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 85 (5): pp. 1037-1044.