



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

DÉTECTION D'*E. COLI* ENTÉROHÉMORRAGIQUE (ECEH) DANS LES PRODUITS ET LES INGRÉDIENTS ALIMENTAIRES À L'AIDE DU SYSTÈME DE DÉTECTION RAPIDE EZ COLI™ (*EZ Coli Rapid Detection System*)

Don Warburton et Ewen Todd
Divisions de l'évaluation et de la recherche en microbiologie
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments
DGPS, Ottawa, Ontario, K1A 0L2

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. Le système de détection rapide EZ Coli™ sert à cultiver et identifier, de manière présomptive, *E. coli* 0157.

2. DESCRIPTION

2.1 *Escherichia coli* 0157:H7 est un agent pathogène présent dans les aliments qui peut causer des affections de nature entérique potentiellement mortelles chez les humains. Ce microorganisme a été isolé dans divers types d'aliments, tels que: les hamburgers insuffisamment cuits, l'eau potable, les pommes de terre nouvelles, les roulés de dinde, le lait cru et le cidre. *E. coli* 0157:H7 est un agent pathogène grave dont un faible inoculum suffit pour provoquer l'infection. Par conséquent, la détection de cet organisme dans les aliments avant leur consommation est essentielle pour prévenir les poussées de maladie.

2.2 Le système de détection rapide EZ Coli™ comprend deux éléments principaux : **1) le Bouillon d'enrichissement EZ Coli**, milieu d'enrichissement en une étape qui est sélectif à l'égard d'*E. coli* 0157 et des microorganismes gram-négatifs étroitement apparentés fermentant le lactose et **2) la Pointe détectrice EZ Coli**, pointe de pipette contenant les réactifs nécessaires à la réalisation d'un test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*) permettant de déceler la présence des antigènes d'*E. coli* 0157. Un résultat positif au test contenu dans la Pointe détectrice indique la présence présumée d'*E. coli* 0157, présence qui doit ensuite être confirmée à l'aide d'épreuves biochimiques et/ou sérologiques.

3. PRINCIPE

- 3.1 Le **Bouillon d'enrichissement EZ Coli** est un milieu sélectif et différentiel pour la culture d'*E. coli* 0157 et d'autres microorganismes gram-négatifs étroitement apparentés fermentant le lactose. Pour les échantillons de viande crue, le Bouillon d'enrichissement EZ Coli est complété, au moment de l'utilisation, par l'addition de novobiocine et d'acriflavine pour supprimer la croissance des organismes indésirables. Lorsqu'il ne s'agit pas de viande crue, seule la novobiocine est ajoutée au milieu. Le milieu final additionné de ces éléments permet à 1 UFC d'*E. coli* 0157 dans 25 g d'échantillon de croître pour donner 10⁶ UFC/mL (ou plus) après une période d'incubation de 24 h à 42 °C.
- 3.2 En présence d'une vigoureuse fermentation du lactose, la coloration de l'indicateur de pH du milieu passe du rouge-violet foncé au rose pâle, au beige ou au jaune, ce qui indique la présence possible de coliformes, dont *E. coli* 0157, d'autres souches d'*E. coli*, de *Klebsiella pneumoniae*, de *Citrobacter freundii* et d'autres microorganismes fermentant le lactose. Après un minimum de 15 heures d'incubation, une analyse à l'aide de la Pointe détectrice peut être réalisée dans le cas des échantillons présentant un changement de coloration. Si le résultat est négatif, le bouillon doit être réincubé et un échantillon doit être testé à l'aide d'une Pointe détectrice EZ Coli après 24 h. Tous les autres échantillons, quelle que soit la coloration du milieu, devraient être testés à l'aide d'une Pointe détectrice EZ Coli après 24 h d'incubation. Les échantillons qui sont négatifs d'après le test de la Pointe détectrice EZ Coli après 24 h sont considérés négatifs à l'égard d'*E. coli* 0157.
- 3.3 La Trousse de détection rapide EZ Coli est une épreuve immunologique rapide spécifique d'*E. coli* 0157 qui se présente dans une pointe de pipette standard. La Pointe détectrice EZ Coli contient une zone réservée à l'analyse de l'échantillon (en bas) et deux échelles de comparaison des couleurs, une pour la positivité (en haut) et une pour la négativité (au milieu). La zone d'analyse est enduite d'anticorps primaires qui se lient spécifiquement à l'antigène d'*E. coli* 0157. Après addition des réactifs, une coloration violette apparaît dans la zone d'analyse de la Pointe détectrice, indiquant la présence d'*E. coli* 0157.
- 3.4 Les échantillons peuvent être analysés un à la fois ou, si l'on utilise des pipettes multicanaux, on peut effectuer jusqu'à 12 tests simultanément. La durée totale de l'analyse à l'aide de la Pointe détectrice est inférieure à 30 minutes. Les échantillons qui sont positifs d'après ce test sont présumés contenir *E. coli* 0157. Pour confirmer la présence d'*E. coli* 0157, il faut réaliser les épreuves biochimiques et sérologiques standard.

4. DÉFINITION DES TERMES

Voir Annexe A du Volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir Annexe B du Volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

- 1) **Système de détection EZ Coli** (Difco Laboratories, Détroit, MI) :
- A. **Bouillon d'enrichissement EZ Coli**, bouillon EC modifié conçu pour maximiser la récupération d'*E. coli* 0157.
 - B. **Pointe détectrice EZ Coli** contenant un anticorps primaire dirigé contre *E. coli* 0157 lié à la zone d'analyse de l'échantillon (en bas). Des échelles de comparaison des couleurs, une pour la positivité (en haut) et une pour la négativité (au milieu) sont incluses pour faciliter l'interprétation des résultats.
 - C. **Pointe filtrante EZ Coli** contenant un filtre pour éliminer les particules présentes dans le Bouillon d'enrichissement EZ Coli.
 - D. **Anticorps secondaire EZ Coli** contenant un anticorps dirigé contre *E. coli* 0157 conjugué à une phosphatase alcaline.

E. Substrat EZ Coli qui est un révélateur (phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyle/bleu de nitrotétrazolium).

F. Tampon de lavage EZ Coli, 100 mL.

- 2) Novobiocine, sel sodique
- 3) Chlorhydrate d'acriflavine
- 4) Système de stérilisation par filtration
- 5) Incubateur, 42 ± 1 °C
- 6) Microplaques, 96 puits à fond rond ou en V, non traitée
- 7) Réservoir à réactifs (pour pipetteurs multicanaux)
- 8) Micropipetteur monocanal (pour délivrer 100, 150 et 200 µL d'échantillon)
- 9) Micropipetteur monocanal (pour délivrer 1 000 µL d'échantillon)
- 10) Micropipetteur multicanaux (pour délivrer 100-200 µL d'échantillon) (facultatif)
- 11) Pointes de micropipettes stériles
- 12) Support de pointes de micropipettes (20-200 µL)
- 13) Support de pointes de micropipettes (1 000 µL)
- 14) Milieux et réactifs pour la confirmation biochimique et sérologique de la présence d'*E. coli* 0157:H7 (Voir MFLP-80)

7. PROCÉDURE

7.1 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

7.1.1 **ÉCHANTILLONS DE VIANDE CRUE** : Ajouter 225 mL de Bouillon d'enrichissement EZ Coli (additionné de novobiocine et d'acriflavine) à 25 g d'échantillon de viande crue dans un sac pour stomacher ou l'équivalent.

7.1.2 **ÉCHANTILLONS NE CONTENANT PAS DE VIANDE CRUE** : Ajouter 225 mL de Bouillon d'enrichissement EZ Coli (additionné de novobiocine seulement) à 25 g d'échantillon solide ou à 25 mL d'échantillon liquide. Bien mélanger dans un mélangeur ou un Stomacher.

Eau embouteillée ou autres échantillons d'eau : ajouter 25 mL de lait par 225 mL de Bouillon d'enrichissement EZ Coli avant d'autoclaver.

Épices (Voir MFLP-80) : Il faut ajouter du K_2SO_4 0,5 % au Bouillon d'enrichissement EZ Coli avant d'autoclaver lorsqu'on analyse de la poudre d'ail ou d'oignon. L'ail et d'autres épices doivent être analysés à des dilutions plus élevées.

NOTE : Certains aliments peuvent modifier le pH initial du milieu. Lorsque l'analyse porte sur un nouvel aliment, vérifier le pH du milieu. Si le pH s'écarte de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C après l'addition de l'aliment, consulter les Services techniques de Difco au (800) 521-0851.

7.1.2 Incuber à 42 ± 1 °C pendant une période allant jusqu'à 24 h. Les échantillons devraient être analysés (selon la méthode décrite plus loin) avec la Pointe détectrice EZ Coli après 24 h d'incubation. Si la coloration initiale du bouillon passe du rouge-violet foncé au rose pâle, au beige ou au jaune, les échantillons concernés peuvent être analysés pour détecter la présence d'*E. coli* 0157 à l'aide de la

Trousse de détection rapide EZ Coli (décrite plus loin) après un minimum de 15 h d'incubation. Si les résultats sont négatifs, ces échantillons enrichis doivent être analysés de nouveau après 24 h d'incubation. Les échantillons analysés qui sont négatifs d'après la Pointe détectrice EZ Coli après 24 h d'incubation sont considérés comme ne contenant pas d'*E. coli* 0157 et peuvent être éliminés.

7.2 Analyse par la Pointe détectrice à l'aide de la Trousse de détection rapide EZ Coli

7.2.1 Préparation des échantillons à analyser :

Brasser le milieu pour distribuer les microorganismes uniformément.

Si le milieu ne contient pas de particules, passer à l'étape 1.a. Si le milieu contient des particules, passer à l'étape 1.b.

- a) Prélever au moins 100 µL et au plus 250 µL de milieu et placer dans le puits désigné dans la première rangée (en haut) de la microplaque. Si des échantillons multiples (jusqu'à 12) doivent être analysés en une seule occasion, placer les échantillons à analyser dans les puits adjacents de la première rangée (en haut). Passer à l'étape 2.
- b) Pour les échantillons contenant des particules :
 - i) Identifier les Pointes filtrantes EZ Coli pour qu'elles correspondent aux échantillons à analyser. Placer les Pointes filtrantes EZ Coli dans un support de pointes de micropipette (1 000 µL).
 - ii) Pour chaque échantillon, retirer 1 mL de bouillon à l'aide d'une pipette standard de 1,0 mL.
 - iii) Pipetter l'échantillon dans la partie supérieure de la Pointe filtrante EZ Coli.
 - iv) Régler un micropipetteur à 1 000 µL. Fixer la Pointe filtrante EZ Coli au micropipetteur.
 - v) Expulser doucement l'échantillon (4-6 gouttes) à travers la Pointe filtrante EZ Coli dans le puits désigné pour l'échantillon dans la première rangée (en haut) de la microplaque. Si des échantillons multiples (jusqu'à 12) doivent être analysés en une seule occasion, placer les échantillons à analyser dans la première rangée (en haut).

7.2.2 Répartition des réactifs pour l'analyse :

- a) Placer 2 gouttes d'anticorps secondaire EZ Coli (bouteille à bouchon rouge) dans la seconde rangée de puits de la microplaque qui correspondent aux échantillons à analyser de la première rangée (en haut).
- b) Placer 3 gouttes de substrat EZ Coli (bouteille à bouchon jaune) dans la troisième rangée de puits de la microplaque qui correspondent aux échantillons à analyser de la première rangée (en haut).
- c) Pipetter ou verser au moins 1 mL de tampon de lavage EZ Coli, par échantillon, dans le réservoir à réactifs.

7.2.3 Préparation des Pointes détectrices EZ Coli :

- a) Identifier les Pointes détectrices EZ Coli pour qu'elles correspondent aux échantillons à analyser. Enlever et jeter les bouchons jaunes et verts des Pointes détectrices EZ Coli. Fixer les Pointes détectrices EZ Coli à un micropipetteur réglé à 200 µL.
- b) Expulser et jeter le tampon de transport contenu dans les Pointes détectrices EZ Coli. Placer les Pointes détectrices EZ Coli dans un support de pointes de micropipette (20-200 µL) et les séparer du micropipetteur.
- c) Changer le réglage du volume du micropipetteur à 100 µL.
- d) Pour laver les Pointes détectrices EZ Coli, fixer des pointes de micropipette standard ((20-200 µL) («pointes de lavage») au micropipetteur. Prélever 100 µL de tampon de lavage EZ Coli dans le réservoir à réactifs à l'aide des pointes de lavage et répartir dans la partie supérieure des pointes détectrices. Placer les pointes de lavage dans un support et les séparer du micropipetteur. Fixer les Pointes détectrices au micropipetteur, puis expulser et jeter le tampon de lavage des Pointes détectrices.
- e) Répéter l'étape 3d.

7.2.4 Ajout des échantillons à analyser dans les Pointes détectrices :

- a) Placer les Pointes détectrices fixées au micropipetteur au-dessus de la première rangée de puits (en haut) de la microplaque contenant les échantillons à analyser. À l'aide du micropipetteur, aspirer et expulser 5 fois, lentement, les échantillons dans les Pointes détectrices, puis aspirer les échantillons dans les Pointes détectrices.
- b) Incuber les échantillons dans les Pointes détectrices à la température de la pièce pendant 2 minutes.
- c) Expulser et jeter les échantillons contenus dans les Pointes détectrices EZ Coli. Placer les pointes dans un support et séparer les Pointes détectrices du micropipetteur.
- d) Laver 2 fois les Pointes détectrices EZ Coli en suivant les instructions données à l'étape 3d.

7.2.5 Ajout des anticorps secondaires dans les Pointes détectrices :

- a) Placer les Pointes détectrices fixées au micropipetteur au-dessus de la deuxième rangée de puits de la microplaque contenant l'anticorps secondaire. Aspirer et expulser 5 fois les anticorps secondaires contenus dans les Pointes détectrices, puis aspirer les anticorps secondaires dans les Pointes détectrices.
- b) Incuber l'anticorps secondaire dans les Pointes détectrices à la température de la pièce pendant 2 minutes.
- c) Expulser et jeter les anticorps secondaires contenus dans les Pointes détectrices EZ Coli. Placer les pointes dans un support et séparer les Pointes détectrices du micropipetteur.
- d) Laver 3 fois les Pointes détectrices en suivant les instructions données à l'étape 3d.

7.2.6 Ajout du substrat dans les Pointes détectrices :

- a) Changer le réglage du volume du micropipetteur à 150 µL. Placer les Pointes détectrices fixées au micropipetteur au-dessus de la troisième rangée de puits de la microplaque. Aspirer le substrat contenu dans les puits. **NE PAS ASPIRER ET EXPULSER LE SUBSTRAT À TRAVERS LES POINTES DÉTECTRICES.**
- b) Incuber le substrat dans les Pointes détectrices à la température de la pièce pendant 5 minutes.
- c) Expulser et jeter le substrat contenu dans les Pointes détectrices EZ Coli. Placer les pointes dans un support et séparer les Pointes détectrices du micropipetteur.
- d) Laver les Pointes détectrices en suivant les instructions données à l'étape 3d.

7.2.7 Lecture des résultats obtenus avec les Pointes détectrices (en moins de 15 minutes) :

L'échelle de comparaison des couleurs positive (en haut) des Pointes détectrices sera violette; l'échelle de couleur négative (au milieu) sera incolore. L'apparition d'une coloration violette dans la zone d'analyse de la Pointe détectrice (en bas) indique la présence présumée d'*E. coli* 0157 dans l'échantillon analysé. L'identité du microorganisme doit être confirmée par des épreuves biochimiques et sérologiques standard.

7.3 CONFIRMATION

Tous les échantillons positifs d'après les Pointes détectrices EZ Coli doivent être confirmés conformément à la MFLP-80. Ensemencer des dilutions (10^{-4} à 10^{-6}) faites à partir du Bouillon d'enrichissement EZ Coli sur des géloses MACSTCC et HCm. Confirmer en appliquant la MFLP-80.

8. MILIEUX

8.1 Bouillon d'enrichissement EZ Coli

1. Dissoudre 36,7 grammes dans 1 L d'eau distillée ou désionisée. Agiter doucement pour dissoudre complètement.
2. Stériliser à 121-124 °C pendant 15 minutes. Éviter de surchauffer le bouillon.
3. Refroidir le milieu jusqu'à la température de la pièce.

4. ANALYSE DE VIANDES CRUES : Ajouter immédiatement au milieu refroidi les suppléments de sel sodique de novobiocine et de chlorhydrate d'acriflavine de la manière suivante : (voir ci-dessous les instructions pour la préparation des solutions-mères.)

Ajouter le sel sodique de novobiocine à une concentration finale de 20 mg/L, c.-à-d., 10 mL de solution-mère de novobiocine par litre ou 2,25 mL par fraction de milieu de 225 mL.

Ajouter le chlorhydrate d'acriflavine à une concentration finale de 10 mg/L, c.-à-d., 2 mL de solution-mère de chlorhydrate d'acriflavine par litre ou 0,45 mL par fraction de milieu de 225 mL.

ANALYSE D'ÉCHANTILLONS NE CONTENANT PAS DE VIANDE CRUE : Ajouter immédiatement au milieu refroidi le supplément de sel sodique de novobiocine seulement.

5. Après l'addition de novobiocine et d'acriflavine, le milieu peut être conservé à 2-8 °C pendant une période allant jusqu'à une semaine avant d'être utilisé.

8.2 Solution-mère de novobiocine

1. Dissoudre 0,03 g de novobiocine, sous forme de sel sodique, dans 15 mL d'eau distillée ou désionisée. Mélanger doucement; éviter la formation de mousse.
2. Stériliser par filtration à l'aide d'un filtre de 0,22 µm.
3. Ajouter au bouillon refroidi immédiatement après la préparation.

8.3 Solution-mère d'acriflavine

1. Dissoudre 0,05 g de chlorhydrate d'acriflavine dans 10 mL d'eau distillée ou désionisée. Mélanger doucement.
2. Stériliser par filtration à l'aide d'un filtre de 0,22 µm.
3. Peut se conserver à 2-8 °C pendant une période allant jusqu'à une semaine. Garder à l'abri de la lumière.

Tableau 1. LIMITES DE LA MÉTHODE

1. Les microorganismes fermentant le lactose étroitement apparentés à *E. coli* 0157 (parmi lesquels figurent d'autres *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter freundii*) peuvent présenter une bonne croissance dans le Bouillon d'enrichissement EZ Coli et modifier la coloration de l'indicateur. Ces organismes se distinguent d'*E. coli* 0157 par leur apparence sur gélose de MacConkey CS ou gélose de MacConkey au sorbitol ainsi que par l'absence de réaction positive dans la Pointe détectrice EZ Coli.
2. Le Bouillon d'enrichissement EZ Coli doit être incubé pendant au moins 15 h. Comme des microorganismes fermentant le lactose autres qu'*E. coli* 0157 peuvent être présents en nombres beaucoup plus élevés dans un échantillon alimentaire, la croissance de ces microorganismes peut changer la coloration de l'indicateur avant que les bactéries *E. coli* 0157 se soient multipliées suffisamment pour être décelées par la Pointe détectrice EZ Coli. Après une incubation de 24 h, *E. coli* 0157 sera détectable par la Pointe détectrice.
3. Une petit nombre de souches *E. coli* autres que 0157 ne présentent pas une croissance uniforme dans le Bouillon d'enrichissement EZ Coli. Comme ce milieu de culture fait partie d'une trousse conçue pour déceler *E. coli* 0157, il ne permet pas une croissance optimale de souches d'*E. coli* autres que 0157.
4. Une réaction positive obtenue avec la Pointe détectrice EZ Coli indique la présence des antigènes d'*E. coli* 0157. Toutes les souches d'*E. coli* 0157 (à $\geq 10^6$ UFC/mL) donneront une réaction positive avec la Pointe détectrice, quel que soit l'antigène flagellaire (H), s'il est présent. Il s'agit d'un résultat positif présomptif qui doit être confirmé par les épreuves biochimiques et sérologiques traditionnelles.
5. Aucun autre sérotype d'*E. coli* ni aucune autre espèce d'*Escherichia* ne présente de réaction croisée avec la Pointe détectrice EZ Coli. Des microorganismes signalés comme ayant présenté des réactions croisées avec d'autres systèmes d'analyse (souches d'*E. hermannii*, sérotype 026 et 0128 d'*E. coli*) ne réagissent pas avec les Pointes détectrices EZ Coli. Les *Salmonella* O du groupe N réagissent avec la Pointe détectrice EZ Coli. Le sérotype 09 de *Yersinia* ne se multiplie pas en nombre suffisant dans le Bouillon d'enrichissement EZ Coli pour réagir avec la Pointe détectrice.
6. L'apparition d'une coloration dans la zone réservée à l'échelle de comparaison des couleurs négative de la Pointe détectrice EZ Coli peut être attribuable :
 - À une technique de lavage inadéquate.
 - À des échantillons contenant $> 10^8$ UFC/mL d'*E. coli* 0157. Les échantillons fortement concentrés entraîneront un changement de coloration immédiat dans la zone d'analyse et dans la zone réservée à l'échelle de comparaison des couleurs négative. Ces échantillons doivent être dilués à 1:100 (ou plus, au besoin) dans de l'eau physiologique ou dans un autre diluant approprié avant d'être testés à l'aide d'une autre Pointe détectrice EZ Coli.

Lorsqu'il y a apparition d'une coloration dans la zone réservée à l'échelle de comparaison des couleurs négative, répéter le test à l'aide d'une Pointe détectrice pour confirmer que le lavage a été réalisé de manière approprié. Si une coloration apparaît de nouveau dans cette zone, diluer l'échantillon et refaire le test.
7. Les échantillons contenant beaucoup de particules doivent être filtrés à l'aide de la Pointe filtrante EZ Coli avant la réalisation du test avec la Pointe détectrice EZ Coli.
8. Tous les types d'aliments n'ont pas été évalués à l'aide du Système de détection EZ Coli. Pour obtenir de l'information sur une application alimentaire particulière, veuillez communiquer avec les Services techniques de Difco au (800) 521-0851 ou au (313) 462-8500.