



Procédure de laboratoire

MFLP-19
mars 2006

DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

LA MÉTHODE LATERAL FLOW SYSTEM^{mc} DE DUPONT^{mc} POUR
DÉTECTER *E. COLI* O157 DANS LE BOEUF HACHÉ CRU ET LE BOEUF DÉSOSSÉ CRU

Comité des méthodes microbiologiques
Division de l'évaluation
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments
Direction générale des produits de santé et des aliments
Repère postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Courriel : don_warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détection d'*Escherichia coli* O157 dans le boeuf haché cru et le boeuf désossé cru afin d'appuyer les activités de conformité découlant des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*.

2. DESCRIPTION

Le Lateral Flow System^{mc} de DuPont^{mc} (LFS) pour *E. coli* O157 a été mis au point pour détecter *E. coli* O157 dans le boeuf haché cru et le boeuf désossé. La trousse d'essai permet la détection et l'identification par présomption du pathogène cible lorsqu'il est présent à des niveaux d'un organisme *E. coli* O157 par 25 grammes d'échantillon (0,04 cellule/g). L'essai fournit une procédure simplifiée et des résultats satisfaisants après 8 et 18 heures (à l'aide de la méthode LFS de DuPont^{mc} pour *E. coli* O157) ou 20 heures (à l'aide d'une méthode d'enrichissement standard).

3. PRINCIPE

L'essai immunologique LFS^{mc} de DuPont^{mc} utilise un format en sandwich à double anticorps. Un anticorps spécifique à *E. coli* O157 est pulvérisé et immobilisé dans une ligne d'essai sur la surface d'une membrane. Un second anticorps réactif, qui reconnaît également *E. coli* O157 et qu'on a étiqueté avec de l'or colloïdal, est contenu dans un tampon réactif en amont de la ligne d'essai sur la membrane. À mesure que l'échantillon liquide passe, par diffusion capillaire, dans le tampon réactif, le réactif anticorps-or se lie précisément à *E. coli* O157 et se déplace avec l'échantillon jusque dans la membrane d'essai. Lors de son déplacement dans la membrane d'essai, l'échantillon traverse la ligne d'essai où l'anticorps d'*E. coli* O157

immobilisé capture le complexe anticorps-or-*E. coli* O157 pour ainsi former un « sandwich » d'anticorps d'*E. coli* O157. La ligne d'essai devient alors rouge. En l'absence d'*E. coli* O157, aucun sandwich d'anticorps d'*E. coli* O157 ne se forme et la ligne d'essai ne devient pas rouge. Les réactifs immobilisés à la ligne de contrôle capturent l'excès de réactif or qui traverse la ligne d'essai. Ceci entraîne la coloration de la ligne de contrôle en rouge, ce qui indique que l'essai s'est déplacé correctement sur la bandelette. Par conséquent, une seule ligne (de contrôle) sur la membrane indique un échantillon négatif et deux lignes (d'échantillon et de contrôle) indiquent un échantillon présumé positif.

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 SPÉCIAL

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 ».

6.1 Test de 8 ou 18 heures

- 1) Trousse d'essai LFS^{mc} de DuPont^{mc} pour *E. coli* O157 (PN 18220014 – 50 bandelettes d'essai)
- 2) Milieu LFS^{mc} de DuPont^{mc} pour *E. coli* O157 (PN 18230016 – 500 g)
- 3) Cultures témoins, consulter la méthode MFLP-80
- 4) Balance – 25 à 1000 grammes
- 5) Mélangeur Stomacher avec sacs filtrés (Circulateur Seward Stomacher® 400 ou l'équivalent)
- 6) Incubateur capable de maintenir une température de 42 °C avec agitation (l'agitation est facultative)

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 et des bains-marie 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.

- 7) Tubes à essais (12 x 75 mm) avec support
- 8) Pipettes (400 µL) pour les transferts

6.2 Test de 20 heures

- 1) Nécessite le même matériel et équipement spécial énuméré en 6.1, à l'exception des

numéros 2 et 6.

- 2) Bouillon EC modifié avec novobiocine (m EC+ n) (consulter la méthode MFLP-80 [8.1])

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.

- 3) Incubateur capable de maintenir une température de 37 °C

7. PROCÉDURE

7.1 Protocole d'essai pour *E. coli* O157 (8 ou 18 heures)

- 7.1.1 Préparation du bouillon d'enrichissement du LFS^{mc} de DuPont^{mc}.

7.1.1.1 Stériliser un litre d'eau à l'autoclave ou par filtration (pores de 0,2 µm) dans un contenant stérile. Équilibrer à 42 °C dans un bain-marie ou un incubateur.

7.1.1.2 Ajouter 25,2 grammes de milieu LFS^{mc} de DuPont^{mc} pour *E. coli* O157 dans l'eau stérilisée. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

Nota : Utiliser le bouillon d'enrichissement dans les 3 heures suivant sa préparation. Pour des résultats optimaux, utiliser le milieu dès qu'il a été préparé. Un bouillon passé à l'autoclave peut être entreposé jusqu'à deux semaines à 4 °C.

- 7.1.2 Enrichissement des échantillons

Nota : Dans le cadre de bonnes pratiques de laboratoire, il faut exécuter des cultures témoins positives et négatives de l'échantillon.

7.1.2.1 Réchauffer au préalable le bouillon d'enrichissement préparé à 42 °C.

7.1.2.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en ajoutant aseptiquement 25 g (ou une autre donnée analytique adéquate, comme 65 g pour le bœuf haché) dans 225 mL (ou la quantité nécessaire pour maintenir la dilution 1:10) de bouillon d'enrichissement et le passer au Stomacher.

7.1.2.3 Refermer le sac lâchement et incuber 8 heures à 42 °C avec ou sans agitation, ou jusqu'à 18 heures à 42 °C sans agitation.

Nota : Il faut fermer les sacs de façon à permettre l'échange d'air pendant l'enrichissement de l'échantillon et optimiser la croissance pathogène et l'expression antigénique.

7.1.2.4 Après au moins 8 heures, sortir le sac de l'incubateur et le faire tourner délicatement pour en mélanger le contenu.

7.1.2.5 Étape facultative de chauffage : L'essai LFS^{mc} de DuPont^{mc} pour *E. coli* O157 a été mis au point pour détecter tant les organismes vivants que ceux détruits par chauffage. Pour détecter des organismes détruits par chauffage après l'incubation, utiliser une pipette stérile pour transférer 5 mL d'échantillon enrichi dans un tube de verre. Chauffer à l'eau bouillante pendant 10 minutes, puis laisser le tube refroidir à la température ambiante avant de procéder à l'essai.

7.1.3 Mise à l'essai des échantillons.

7.1.3.1 Disposer et marquer les tubes de chaque échantillon dans un support.

7.1.3.2 Transférer 400 µL d'échantillon enrichi dans un tube.

7.1.3.3 Sortir le nombre requis de bandelettes de leur contenant. Ne pas enlever l'étiquette de la bandelette.

7.1.3.4 Insérer la bandelette dans le tube, les **flèches pointées vers le bas**.

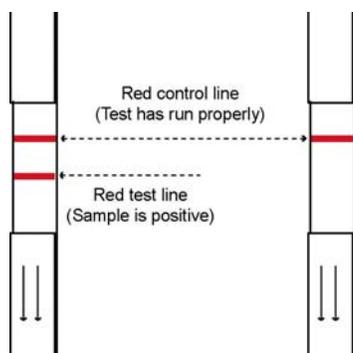
7.1.3.5 Laisser réagir la bandelette pendant 10 minutes, puis vérifier les résultats de la façon suivante :

7.1.3.6 Une ligne doit toujours se former, celle de contrôle. Une ligne rouge indique que la bandelette fonctionne adéquatement.

7.1.3.7 Si, au bout de 10 minutes, la bandelette d'essai n'affiche qu'une seule ligne de contrôle visible, c'est signe que l'échantillon est négatif (absence d'*E. coli* O157).

7.1.3.8 Une ligne rouge qui apparaît sous la ligne de contrôle est celle de l'essai et elle indique un résultat positif. Lorsque la bandelette d'essai affiche deux (2) lignes rouges, l'essai est terminé et l'échantillon est positif (présence d'*E. coli* O157).

7.1.3.9 Si aucune ligne de contrôle ne se forme dans un délai de 10 minutes, l'essai est invalide et il doit être répété.



Ligne de contrôle rouge
(L'essai s'est bien déroulé)

Ligne d'essai rouge
(L'échantillon est positif)

Nota : Il faut toujours interpréter les résultats après 10 minutes. Les bandelettes d'essai interprétées après 20 minutes ne sont plus valides.

7.1.4 Confirmation des résultats présumés positifs.

Utiliser les échantillons enrichis pour confirmer les résultats présumés positifs, tel que décrit dans la méthode MFLP-80 (8.1)

7.2 Protocole d'essai pour *E. coli* O157 (20 heures)

7.2.1 Préparation du bouillon m EC+ n

7.2.1.1 Verser 36,1 g de milieu EC modifié dans 1 litre d'eau distillée. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète et rajuster le pH à 6,9, au besoin. Chauffer à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

7.2.1.2 Laisser refroidir le bouillon, puis ajouter 5 mL de solution de novobiocine stérilisée (4 mg/mL de novobiocine sodique active). La concentration finale de novobiocine est de 20 mg/litre. Équilibrer le bouillon à 37 °C.

7.2.2 Enrichissement des échantillons.

7.2.2.1 Chauffer au préalable le bouillon d'enrichissement préparé à 37 °C.

7.2.2.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en ajoutant aseptiquement 25 g (ou une autre donnée analytique adéquate, comme 65 g pour le bœuf haché) dans 225 mL (ou la quantité nécessaire pour maintenir la dilution 1:10) de bouillon d'enrichissement et le passer au Stomacher.

7.2.2.3 Refermer lâchement le sac et incuber pendant 20 heures à 37 °C.

Nota : Il faut fermer les sacs de façon à permettre l'échange d'air pendant l'enrichissement de l'échantillon et optimiser la croissance pathogène et l'expression antigénique.

7.2.2.4 Après 20 heures, sortir le sac de l'incubateur et l'agiter délicatement pour en mélanger le contenu.

7.2.2.5 Étape facultative de chauffage : Utiliser une pipette stérile pour transférer 5 mL d'échantillon enrichi dans un tube de verre. Chauffer à l'eau bouillante pendant 10 minutes, puis laisser le tube refroidir à la température ambiante avant de procéder à l'essai.

7.2.2.6 Continuer l'essai tel que décrit au point 7.1.3.

7.2.3 Confirmation des résultats présumés positifs

Utiliser les échantillons enrichis pour confirmer les résultats présumés positifs, tel que décrit dans la méthode MFLP-80 (8.1)

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 WARBURTON, D. et D. CHRISTENSEN. 2006. *Isolement d'E. coli O157 dans les aliments* (MFLP-80), volume 3, Compendium de méthodes, Santé Canada, Ottawa. Affiché sur le site Web de la Direction des aliments (Santé Canada) à http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index_f.html.