



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**DÉTECTION DES *E. COLI* ENTÉRO-HÉMORRAGIQUES (EHEC) DANS LES PRODUITS ALIMENTAIRES
ET LES INGRÉDIENTS ALIMENTAIRES PAR LA MÉTHODE VIP POUR EHEC**

**Don Warburton
Division de l'évaluation
Bureau de dangers microbiens, Direction des aliments
Localisateur postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

Courriel: Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable à la détection de *E. coli* O157 entéro-hémorragique dans les produits alimentaires, les ingrédients alimentaires et les échantillons environnementaux afin de déterminer s'il y a conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. La méthode VIP peut être utilisée pour le dépistage initial de tous les aliments et de tous les échantillons qui sont analysés selon les procédures décrites dans la méthode MFLP-80.

Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-87 datée de septembre 1996.

2. DESCRIPTION

La méthode VIP pour EHEC est un essai d'immunoprécipitation visuelle qui permet de détecter la présence des *E. coli* entéro-hémorragiques, y compris *E. coli* O157:H7. Cette méthode emploie des anticorps hautement spécifiques visant les antigènes EHEC et la formule en a été établie spécifiquement pour minimiser la réactivité croisée avec de nombreux *Enterobacteriaceae* tout en maintenant une sensibilité supérieure. Des études de l'AOAC et de la DGPS ont démontré que la méthode donne des résultats satisfaisants avec les aliments contaminés. Cette méthode peut être utilisée pour la détection des EHEC dans les produits alimentaires, les ingrédients alimentaires et les échantillons environnementaux.

3. PRINCIPE

La méthode VIP pour EHEC utilise un système de réactif exclusif pour former un complexe antigène-anticorps-chromogène en présence de EHEC. Ceci assure une très grande sensibilité et spécificité à *E. coli* O157:H7. Les échantillons enrichis de la façon requise sont ajoutés à l'unité VIP. Tout antigène EHEC se fixera au complexe anticorps-chromogène en traversant une membrane de soutien. En présence des EHEC, le complexe antigène-anticorps-chromogène forme une ligne de détection dans la fenêtre de l'échantillon d'essai. L'échantillon continue de s'écouler le long de la membrane pour former une ligne témoin dans la fenêtre de vérification de l'essai, que l'échantillon contienne ou non des EHEC.

4. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Note : Le surveillant du laboratoire doit veiller à ce que l'analyse décrite dans la présente méthode est effectuée conformément à la norme internationale « ISO/IEC 17025 :1999 (ou dernière révision): Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais ».

Note : Si l'analyste utilise toute variation des milieux énumérés ci-après (produit disponible commercialement ou préparé à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au surveillant du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 1) Trousse VIP pour EHEC (BioControl Systems Inc., téléphone: (425) 603-1123, (800) 245-0113, télécopieur: (425) 603-0070, site web: www.biocontrolsys.com.)
- 2) Bouillon de trypticase de soya modifié et novobiocine (mTSB-n) (Voir MFLP-80)
- 3) « Stomacher » Colworth 400, mélangeur ou l'équivalent
- 4) Incubateurs capables de maintenir une température de 35 à 37 °C et 42 °C.
- 5) Sacs « Stomacher », avec ou sans filet intérieur, selon les besoins
- 6) Filtre pour pipettes (Voir MFLP-80)
- 7) Triton X
- 8) Cultures témoins (utiliser des cultures ATCC ou l'équivalent)
témoin positif: *E. coli* O157:H7 ou *E. coli* O157:NM (ou autres sérovars de *E. coli* O157)
témoin négatif: *E. coli* (pas O157)

7. MARCHE À SUIVRE

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités analytiques peuvent être combinées. Effectuer l'analyse selon les instructions suivantes:

Note: Des études internes ont démontré que le regroupement d'échantillons de viande fermentée prêt-à-manger n'est pas recommandé en raison d'une diminution de la sensibilité.

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage :

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, sauf dans le cas d'aliments stables à la température de la pièce, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5 °C) ou au congélateur selon la nature du produit. Faire dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou dans des conditions de temps et de 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 pour l'analyse :

- 7.2.1 Avoir à portée de la main du mTSB-n stérile pré-chauffé à 35°C.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de l'aire de travail à l'aide d'un désinfectant approprié.

7.3 Préparation de l'échantillon

- 7.3.1 Afin d'assurer une unité analytique représentative, agiter les liquides ou les solides à écoulement libre jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, constituer l'unité analytique en prélevant une portion à plusieurs endroits de l'unité d'échantillonnage. Afin de réduire la charge de travail, les unités analytiques peuvent être combinées pour l'analyse. Il est recommandé que le composite ne contienne pas plus de 500 g.

Note: Dans le cas de certains échantillons tels que les épices, il faut utiliser des sacs à stomacher munis d'un filet intérieur.

- 7.3.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en mélangeant au mélangeur ou au stomacher, de façon aseptique, 25 g ou ml (l'unité d'analytique) dans 225 ml de bouillon mTSB-n. Certaines épices doivent être analysées en utilisant une dilution plus élevée (voir MFLP-80).
- 7.3.3 Pour les échantillons visqueux (i.e. fromage en poudre), ou pour d'autres échantillons tel que requis, ajouter $\leq 2,25$ ml de Triton X-100 chauffé à la vapeur pour 225 ml de bouillon mTSB-n avant l'incubation.
- 7.3.4 Incuber pour la nuit (au moins 18 heures) à 42 °C. Les denrées pour lesquelles on s'attend à obtenir un nombre élevé de bactéries compétitrices, telles que la viande hachée et les fèves germées, l'incubation à 42 °C a démontré la réduction du nombre de réactions de faux-positifs et de faux-négatifs. Il est recommandé que les unités analytiques supérieures à 25 g soient incubées pendant 22 à 24 heures (voir MFLP-80).
- 7.3.5 Après l'incubation, conserver les bouillons d'enrichissement au réfrigérateur (2 à 8 °C) pour la confirmation des échantillons présumés positifs.

7.4 Méthode d'essai VIP

- 7.4.1 Ouvrir l'enveloppe scellée contenant les unités VIP et prendre le nombre requis pour l'analyse. Il faut une unité par échantillon d'essai. Les unités VIP ne sont pas réutilisables. Assurez-vous de resceller immédiatement les unités VIP inutilisées dans l'enveloppe contenant un agent déshydratant. Conserver à la température de la pièce à un endroit frais et sombre.
- 7.4.2 Agiter doucement le bouillon d'enrichissement et laisser ensuite les particules d'aliments se déposer. Avant d'effectuer l'analyse VIP, les bouillons enrichis doivent être équilibrés entre 25 et 37 °C - surtout s'ils ont été incubés à 42 °C ou réfrigérés -, la température entre 25 et 37 °C constituant la température optimale pour l'analyse VIP. Il est recommandé que les échantillons soient retirés de l'incubateur et gardés à la température de la pièce au moins 30 minutes avant de commencer l'analyse VIP. Sinon, retirer une petite portion (ex. 10 ml) de l'échantillon enrichi et garder à la température de la pièce pendant 10 minutes avant l'analyse VIP.
- 7.4.3 Transférer 0,1 ml de bouillonensemencé dans le puits d'échantillon.

Note: Les particules d'échantillon peuvent ralentir l'écoulement. Il est recommandé d'utiliser des filtres pour pipetter l'échantillon.

- 7.4.4 Incuber à la température de la pièce pendant 10 minutes.

7.5 Lecture des résultats :

- 7.5.1 Examiner l'unité VIP pour y déceler la présence d'une ligne distincte dans la fenêtre de vérification de l'essai. Cette ligne doit être sombre sur le fond blanc et s'étendre sur toute la fenêtre. L'absence de ligne témoin indique que le résultat du test n'est pas valide. Communiquer avec BioControl Technical Services.
- 7.5.2 Observer la fenêtre de l'échantillon d'essai. La présence d'une ligne distincte, tel que décrit ci-dessus, indique un échantillon présumé positif. L'absence de ligne est un résultat négatif. Les intensités différentes des lignes d'essai et des lignes témoins sont acceptables tant qu'il y a présence d'une ligne témoin.

<p>Note: Examiner l'unité après 10 minutes. Ne pas lire les résultats après 20 minutes, car des lignes ténues peuvent se développer à cause d'une coloration non spécifique. Il ne faut pas en tenir compte.</p>

- 7.5.3 Il faut exécuter des cultures témoins positives et négatives en même temps que les échantillons.
- 7.5.4 Autoclaver les unités à 121 °C pendant au moins 15 minutes avant d'en disposer.

7.6 Confirmation de résultats positifs d'échantillons VIP :

- 7.6.1 Il faut confirmer les résultats positifs en procédant à une culture tel que décrit dans la méthode MLFP-80. Concentrer les échantillons présumés positifs selon la méthode MFLP-90 ou selon des procédures équivalentes. Procéder ensuite à l'ensemencement des géloses sélectives spécifiées et confirmer par des tests biochimiques et sérologiques.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Warburton, Don. 2004. MFLP-80. Isolement d'*E. coli* O157 dans les aliments. Dans: Volume 3. Compendium de méthodes.
Site web : http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index_f.html