



**MÉTHODE REVEAL DE 20 HEURES POUR DÉTECTER LA PRÉSENCE D'*ESCHERICHIA COLI* O157:H7
DANS LES ALIMENTS ET LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX**

1. APPLICATION

La méthode sert à détecter la présence d'*Escherichia coli* O157:H7 dans les aliments (comme le jus de pomme, le bœuf cru et les légumes) et les échantillons environnementaux afin d'en déterminer la conformité avec les articles 4 et 7 de la Loi des aliments et drogues.

2. DESCRIPTION

Il a été démontré que cette méthode donne des résultats satisfaisants avec des aliments contaminés artificiellement et le bœuf haché cru contaminé naturellement dans les études de l'AOAC (8.1), qui ont porté notamment sur le jus de pomme, la laitue rincée, les cubes de bœuf cru, le bœuf haché cru et les échantillons environnementaux. Elle peut servir à déceler la présence d'*E. coli* O157:H7 dans d'autres produits et échantillons.

3. PRINCIPE

À la suite de l'enrichissement sélectif dans du bouillon de trypticase de soya modifié avec novobiocine ou dans du bouillon EC modifié avec novobiocine, on dépose une partie de l'échantillon enrichi dans la cupule de l'unité d'essai Reveal, il y a migration dans la fenêtre de visualisation. L'unité d'essai Reveal contient des anticorps qui ont une grande spécificité pour les antigènes d'*E. coli* O157:H7. Les anticorps sont fixés à de l'or en suspension colloïdale et aussi, d'autre part, à une matrice de soutien solide. Tout antigène d'*E. coli* O157:H7 présent se fixera aux anticorps conjugués à l'or pour former un complexe antigène – anticorps – chromogène. Ce complexe traverse une membrane à évacuation latérale et est fixé ensuite par l'anticorps immobilisé sur la membrane. La fixation provoque la précipitation du conjugat d'or et forme une ligne visible, ce qui indique une réaction positive. Une ligne de contrôle qui se forme plus haut dans la fenêtre d'essai indique que le test s'est déroulé et s'est terminé comme il se doit et vérifie la validité du test. L'absence de ligne de contrôle rend le test non valide. Consigner les résultats après quinze minutes d'incubation.

4. DÉFINITIONS

Voir annexe A du volume 3, termes 1,2,3,4.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

- 1) **Système Reveal (Neogen Corporation; téléphone : 1-800-234-5333, télécopieur : (517) 372-0108.**
- 2) Bouillon de trypticase de soya modifié avec novobiocine (base vendue dans le commerce; Acumedia, Baltimore, MD)
- 3) Bouillon d'*E. coli* modifié avec novobiocine (base vendue dans le commerce; Acumedia, Baltimore, MD)
- 4) BCM O157:H7 de Biosynth + gélose chromogène (Biosynth, Naperville, IL)

- 5) Gélose de coli hémorragique
- 6) Gélose de MacConkey avec sorbitol (Acumedia, Baltimore, MD)
- 7) Gélose mHC ou gélose TCCSMAC (voir MFLP-80)
- 8) Diluant au phosphate de Butterfield (Fisher Scientifique) ou eau peptonée 0,1%
- 9) Incubateurs capables de maintenir une température de 36 °C.
- 10) Incubateurs capables de maintenir une température de 42 °C.

NOTE 1 : Il incombe à chaque laboratoire de veiller à ce que la température des incubateurs ou des bains-marie soit maintenue au degré recommandé. Lorsqu'on recommande 36 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 36 +/-1,0 °C. De même, une température moindre, soit de 30 ou 25 degrés, peut s'établir à +/-1,0 °C. Lorsqu'on recommande des températures plus élevées, toutefois, comme 43 ou 45,5 °C, il est crucial de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à +/-0,5 °C de la température recommandée parce que des températures plus élevées peuvent être mortelles pour le micro-organisme que l'on cherche à isoler.

- 11) « Stomacher » Colworth 400, ou l'équivalent
- 12) Sacs « Stomacher »
- 13) Micropipette (200 µl) et embouts stériles
- 14) Cultures témoins
E. coli O157:H7 ATCC n° 35150; ATCC n° 43895

NOTE 2 : Pour plus de précision sur la façon d'utiliser le test Reveal, veuillez consulter le feuillet d'instruction contenu dans la trousse d'identification.

7. PROCÉDURE

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités d'analyse peuvent être regroupées. Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder les unités réfrigérées (0-5 °C) ou congelées selon la nature du produit. Décongeler les échantillons au réfrigérateur ou dans des conditions de temps et de température qui ne favorisent pas la croissance ou la mort des bactéries.
- 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 prêt à utiliser du bouillon de trypticase de soya modifié ou le milieu *d'E. coli* modifié et de la solution de novobiocine.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail avec 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 qui s'écoulent librement jusqu'à homogénéité. Si une 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, on peut regrouper des unités d'analyse. Il est recommandé que l'échantillon composite ne contienne pas plus de 500 g.

7.3.2 Laitue et autres légumes : prélever de façon aseptique 50 g de l'échantillon et le déposer dans un sac stérile. Ajouter 50 mL de diluant au phosphate de Butterfield ou eau peptonée 0,1% et agiter pendant 15 minutes. Ajouter 25 mL du diluant au bouillon d'enrichissement (comme ci-dessous).

7.4 Enrichissement de l'échantillon

- 7.4.1 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en mélangeant de façon aseptique 25 g ou mL (unité d'analyse) dans 225 mL du bouillon d'enrichissement requis, de la façon indiquée au tableau 1. Agiter au « Stomacher » 2 minutes à vitesse normale ou vigoureusement manuellement.
- 7.4.2 Incuber 20 h à 36 °C. Le sac « Stomacher » doit être fermé de façon à permettre un échange d'air pour obtenir une croissance optimale.

7.5 Préparation et inoculation de l'unité d'essai

- 7.5.1 Laisser l'unité d'essai parvenir à la température de la pièce avant d'ouvrir le sac.
- 7.5.2 Ouvrir le sac et déposer l'unité sur une surface plate et au niveau.

7.6 Inoculation

- 7.6.1 Après la période d'incubation, fermer hermétiquement le sac « Stomacher » et mélanger doucement le contenu. Laisser refroidir à température de la pièce.
- 7.6.2 Pipetter de façon aseptique 120 µl de l'échantillon en prenant soin d'éviter les particules.
- 7.6.3 Inoculer la cupule de l'unité d'essai en tenant la pipette à la verticale. Si toutefois il n'y avait pas migration du liquide après l'inoculation, ajouter une goutte supplémentaire.

7.7 Incubation

Laisser l'unité reposer sans bouger à la température de la pièce pendant 15 minutes.

7.8 Lecture des résultats

Examiner l'unité immédiatement après l'incubation de 15 minutes. Un résultat lu après 20 minutes peut être imprécis. La présence de deux lignes distinctes dans la fenêtre de visualisation – la présence d'une ligne dans la zone inférieure à proximité du « T » (ligne de test) et une ligne dans la zone supérieure à proximité du « C » (ligne de contrôle) indique un résultat positif. Les lignes seront foncées sur fond blanc. La présence d'une seule ligne dans la zone supérieure (contrôle) de la fenêtre de visualisation indique un résultat négatif. L'absence de ligne dans la zone supérieure (contrôle) de la fenêtre de visualisation, qu'il y ait ou non une ligne dans la zone inférieure (essai), indique un résultat non valide.

7.9 Isolement sélectif

- 7.9.1 Il faut confirmer tous les échantillons qui donnent des résultats présumément positifs avec l'unité d'essai Reveal en les ensemençant sur une gélose sélective. Il faut confirmer la présence de lignes ténues ou pâles qui indiquent des résultats positifs ou négatifs en ensemençant des géloses sélectives.
- 7.9.2 Préparer des dilutions de bouillon enrichi à 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} dans une solution tampon de phosphate de Butterfield ou eau peptonée 0,1%.
- 7.9.3 Étaler des dilutions sur une gélose de coli hémorragique (CH) et sur une gélose de bouillon de culture Biosynth O157:H7+ (BCM), ou sur les géloses énumérées dans la méthode MFLP-80 (dans le dernier cas, suivre les étapes de confirmation décrites par la méthode).
- 7.9.4 Incuber les géloses CH pendant 24 heures à 42 °C et incuber les géloses BCM à 36 °C.
- 7.9.5 Examiner les géloses CH et BCM pour y déceler la présence de colonies typiques. Prélever au moins dix colonies typiques et préparer une sous-culture sur de la gélose au Sorbitol de MacConkey (MSA). Incuber de 18 à 24 heures à 36 °C.
- 7.9.6 Examiner les géloses MSA pour y repérer la présence de colonies négatives pour le Sorbitol et confirmer au moyen des tests suivants : produits biochimiques IMViC, pigmentation sur gélose nutritive, décarboxylation à la lysine et fermentation de cellobiose (tableau 2). Si un isolat est négatif pour le Sorbitol, négatif (MUG) pour *E. coli*, effectuer un dosage sérologique avec des antisérums O157 et H7. S'il n'y a pas de caractérisation

biochimique, il faut réexaminer les géloses sélectives/différentielles, prélever dix colonies douteuses supplémentaires et examiner de la façon décrite ci-dessus.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Bird, C.B., Hoerner, R.J., Restaino, L. 2000 Collaborative Validation Study to Demonstrate the Equivalence of Reveal for *E. Coli*O157:H7 for the Detection of *Escherichia coli*O157:H7 in Selected Foods to BAM Culture Method. JAOAC. Présenté pour publication.

9. PRÉPARATION DES MILIEUX

Si l'on a recours à la stérilisation par la vapeur, il est essentiel de laisser suffisamment de temps pour que la charge atteigne la température nécessaire avant de commencer à compter la période réelle de stérilisation, qui varie avec la nature et la taille de la charge. Par conséquent, il faut respecter les temps d'exposition appropriés pour garantir la stérilisation des solutions dans les fioles et les milieux de culture thermostables. Consulter le manuel de l'appareil de stérilisation.

9.1 Bouillon de trypticase de soya modifié avec novobiocine (m-TSB+n)

Bouillon de trypticase de soya	30,0 g
Sels biliaires n° 3	1,5 g
Phosphate dipotassique	1,5 g
Eau distillée/désionisée	1,0 L

Dissoudre et mélanger. Passer le mélange à l'autoclave et laisser refroidir à la température de la pièce. Distribuer en portions de 225 mL et ajouter 50 µL de solution de novobiocine (9.2) immédiatement avant d'ajouter l'échantillon d'essai.

9.2 Solution de novobiocine

Novobiocine	100 mg
Eau distillée	1,0 mL

Dissoudre et mélanger. Stériliser par filtration au moyen d'un filtre de 0,45 µm. La solution est stable pendant 60 jours lorsqu'elle est entreposée à la noirceur à 2-8 °C.

9.3 Bouillon de *E. coli* modifié avec novobiocine (m-EC+n)

Tryptone	20,0 g
Sels biliaire n° 3	1,5 g
Lactose	5,0 g
Phosphate dipotassique	1,5 g
Phosphate monopotassique	1,5 g
Sel (NaCl)	5,0 g
Eau distillée/désionisée	1,0 L

Dissoudre et mélanger. Passer le mélange à l'autoclave et laisser refroidir à la température de la pièce. Distribuer en parts aliquotes de 225 mL. Ajouter 50 µL de solution de novobiocine (9.2) immédiatement avant d'ajouter l'échantillon d'essai.

9.4 Solution tampon de phosphate de Butterfield

Phosphate de monopotassium	34,0 g
Eau distillée	1,0 L

Dissoudre et mélanger. Ajuster le pH à 7,2 en utilisant du NaOH 1 M. Passer le mélange à l'autoclave et laisser refroidir à la température de la pièce. Diluer à la concentration de travail en ajoutant 1,25 mL dans un flacon volumétrique stérile de 1 L et porter le volume à 1 L en y ajoutant de l'eau distillée stérile.

9.5 Eau peptonée 0,1%

Peser 1,0 g de peptone dans 1 L d'eau distillée. Ajuster le pH de façon à ce qu'il se situe entre 6,5 et 7,0 après stérilisation. Autoclaver durant 15 minutes à 121 °C.

9.6 Gélose de coli hémorragique

Tryptone	20,0 g
Bile Salts No. 3	1,12 g
NaCl	5,0 g
Sorbitol	20,0 g
4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide (MUG)	0,1 g
Bromocresol poupre	0,015 g
Agar	15,0 g
Eau Distillée	1,0 L

Dissoudre dans l'eau en chauffant et en agitant. Autoclaver 15 minutes à 121 °C. PH final, 7,2± 0,2.

9.7 Autres géloses et tampons

Les produits disponibles commercialement doivent être préparés selon les instructions du manufacturier. Les autres milieux sont décrits dans la méthode MFLP-80.

Tableau 1. Procédures d'enrichissement

Type d'échantillon	Unité d'échantillonnage (minimum)	Préparation de l'unité analytique
Cidre de pomme et laitue iceberg rincée	25 g	Peser 25 g dans un sac «Stomacher» stérile, ajouter 225 mL de m-TSB+n
Cubes de bœuf cru et bœuf haché cru	25 g	Peser 25 g dans un sac «Stomacher» stérile, ajouter 225 mL m-EC+n
Échantillons environnementaux d'acier inoxydable	Un échantillon	Transférer de façon aseptique un échantillon dans un sac «Stomacher» stérile, ajouter 225 mL de m-TSB+n

Tableau 2. Milieux minimaux de dépistage biochimique

Milieu	Réaction	Observation	Réaction d' <i>E. coli</i> O157:H7
Gélose trypticase soya (TSA)	Pigmentation	Réaction positive : pigmentation jaune Réaction négative : aucune pigmentation	Négative
Sorbitol de MacConkey	Fermentation du Sorbitol	Réaction positive : colonies rose vif Réaction négative : colonies pâles	Négative
Coli hémorragique (CH)	Réaction au MUG	Réaction positive : colonies bleu-blanc ou blanc sous lumière fluorescente Réaction négative : colonies ne produisent pas de fluorescence	Négative
Bouillon de cellobiose	Production d'acide	Réaction positive : fait virer le bouillon du violet au jaune. Réaction négative : le bouillon demeure violet.	Négative
Gélose à la lysine de fer	Lysine décarboxylase	Réaction positive : le culot vire au violet. Réaction négative : culot jaune	Positive
Gélose au citrate de Simmon	Utilisation du citrate	Réaction positive : croissance et couleur qui vire du vert au bleu. Réaction négative : aucune croissance et couleur demeure verte.	Négative
Bouillon au tryptophane	Réaction à l'indole	Réaction positive : production d'une couleur rouge dans la couche supérieure Réaction négative : production d'une couleur jaune dans la couche supérieure	Négative
Épreuve au rouge de méthyle / Voges-Proskauer (MR-VP)	Acétométhylcarbinol	VP positive : produit une réaction rose éosine VP négative : produit une couleur brune RM positif : produit une couleur rouge RM négatif : produit une couleur jaune	VP négative MR positive
Agglutination en tube	Agglutination	Réaction positive : agglutination Réaction négative : aucune agglutination	