



**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS**

**OTTAWA**

**DÉTECTION D'ESCHERICHIA COLI O157:H7 DANS LES ALIMENTS -  
SYSTÈME DE DÉTECTION GÉNIQUE ASSURANCE GDS<sup>mc</sup> POUR E. COLI O157:H7**

**Comité des méthodes microbiologiques  
Division de l'évaluation  
Bureau des dangers microbiens  
Direction des aliments  
Direction générale des produits de santé et des aliments  
Centre de recherches Sir Frederick Banting [2204A1]  
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

**Courriel: Don\_Warburton@hc-sc.gc.ca**

**1. APPLICATION**

Cette méthode est applicable à la détection d'*E. coli* O157:H7 et d'*E. coli* O157:NM toxigénique (non mobile) dans le bœuf haché cru, les découpes de viande de bœuf, le jus d'orange, le jus de pomme, les légumes frais et l'eau de traitement des germes afin de vérifier la conformité avec les exigences des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*.

**2. DESCRIPTION**

Le test Assurance GDS pour *E. coli* O157:H7 (Assurance GDS) est un test de détection génique d'*E. coli* O157:H7 dans certains aliments. Il s'agit d'une méthode très sélective qui ne détecte pas les autres microorganismes susceptibles de réagir dans les essais à base d'anticorps, notamment les souches d'*E. coli* O157 qui ne sont pas H7 ou NM ainsi que les microorganismes autres qu'*E. coli* O157:H7 qui expriment l'antigène O157.

La méthode comprend un enrichissement de 6,5 heures pour le bœuf haché cru, les découpes de viande de bœuf, le jus d'orange, le jus de pomme, les légumes frais et un enrichissement de 8 heures pour l'eau de traitement des germes. Cette étape est suivie d'une courte étape pour la préparation de l'échantillon, d'une amplification et d'une détection automatisées d'une durée de 75 minutes dans un instrument rotatif. Pour la plupart des aliments, la durée totale à partir de l'enrichissement de l'échantillon jusqu'à la lecture des résultats finals est d'environ 8 heures.

**3. PRINCIPE**

Le système Assurance GDS comporte une étape d'enrichissement de l'échantillon, des réactifs de détection génétique brevetés ainsi qu'un instrument rotatif multicanaux conçu pour fournir rapidement des résultats précis. Après l'enrichissement, les populations de microorganismes ciblées sont concentrées au moyen d'un dispositif et de réactifs brevetés ou d'un instrument de concentration automatique. Cette

étape possède deux avantages. Tout d'abord, elle augmente le nombre de microorganismes présents. Ensuite, elle sépare les microorganismes ciblés de la microflore concurrente et de la matrice alimentaire. Cela permet en outre une identification plus facile des colonies suspectes sur les boîtes de gélose.

Chaque échantillon concentré est ensuite transféré dans un tube de réaction contenant les réactifs d'amplification. Le système de réactifs utilise des amorces spécifiques et des sondes brevetées dirigées contre une séquence d'ADN hautement conservée dans le microorganisme ciblé. Le tube de réaction est ensuite scellé et placé dans un instrument multicanaux breveté qui permet une amplification et une détection simultanées par analyse optique en ligne. Si la séquence cible est présente, un signal de fluorescence est généré et lu automatiquement. Un témoin est aussi présent dans chaque tube de réaction et un signal de fluorescence distinct est simultanément lu et séparé par l'instrument. Toutes les déterminations, qu'elles soient positives ou négatives, sont indiquées à la fin de l'analyse.

#### 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 ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

- 1) Trousse Assurance GDS pour *E. coli* O157:H7 – numéro de catalogue 61007-100 en quantité suffisante pour 100 tests\* (BioControl Systems, [www.biocontrolsys.com](http://www.biocontrolsys.com), 1-800-245-0113) comprenant :

    Tubes de réaction Assurance GDS contenant les agents lyophilisés nécessaires pour la détection génétique d'*E. coli* O157:H7 et un témoin positif interne, 25 bandelettes de 4 tubes de réaction.  
    Réactifs de concentration d'échantillon Assurance GDS, 1 fiole.  
    Solution tampon de resuspension Assurance GDS, 1 fiole.  
    Solution tampon de dilution pour polymérase Assurance, 1 fiole.

- 2) Enzyme polymérase de démarrage à chaud ([www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)) ou autre source adéquate. Doit être ajoutée à la solution tampon de dilution pour polymérase Assurance à partir de la trousse. Inverser le tube 5 fois pour mélanger. Noter la date sur le tube. La solution tampon pour polymérase peut être conservée jusqu'à un maximum de 1 mois à une température de 2 à 8 °C.
- 3) Bouillon d'enrichissement  
    Milieu BioControl mEHEC (numéro de catalogue 65012)
- 4) Matériel (fourni avec la trousse de démarrage)

##### Équipements

    Système Assurance GDS Rotor-Gene, ordinateur et logiciel.  
    Dispositif de concentration d'échantillons Assurance GDS (PickPen<sup>MC</sup> ou équivalent).  
    Mélangeur vortex Assurance GDS  
    Diverses pipettes calibrées  
    Bloc d'aluminium

##### Autre matériel

    Blocs d'échantillons  
    Plaques de resuspension  
    Embouts pour pipettes et PickPen

Film adhésif

## 7. MARCHE À SUIVRE

### 7.1 Enrichissement de l'échantillon

- 7.1.1 Préparer le milieu mEHEC. Pour 25g d'échantillon, *préchauffer* 225 ml d'eau déionisée stérile à 42 °C durant la nuit. Le jour de l'utilisation, transférer aseptiquement 7,1 g de milieu BioControl mEHEC<sup>MC</sup> dans l'eau stérile préchauffée. Mélanger pour dissoudre la poudre. Le milieu préparé doit être utilisé dans un délai maximum de 6 h. Il est également possible de le préparer à l'avance et de le stériliser à l'autoclave.
- 7.1.2 Peser de manière aseptique 25 g d'échantillon dans 225 ml de milieu mEHEC préchauffé (42 °C). Malaxer l'échantillon pendant 2 minutes. Si l'échantillon à analyser a un volume plus important, augmenter proportionnellement le volume de milieu mEHEC de façon à maintenir un rapport de dilution 1:9. Incuber à 42 °C pendant 6,5 à 18 heures.

### 7.2 Test Assurance GDS pour *E. coli* O157:H7

- 7.2.1 Mélanger au vortex le réactif de concentration. Transférer 20 µl dans chacun des puits requis sur le bloc d'échantillons.
- 7.2.2 Ajouter 1 ml d'échantillon incubé à chaque bloc d'échantillon contenant le réactif de concentration. Remettre immédiatement les échantillons dans l'incubateur à 42 °C. Sceller le bloc d'échantillons avec du film adhésif et le mettre sur l'agitateur vortex pendant 5 minutes à 600 tours/min.
- 7.2.3 Enlever et jeter le film scellant une fois que le mélange au vortex est terminé. Ajouter 35 µl de tampon de resuspension au nombre requis de puits dans la plaque de resuspension.
- 7.2.4 Charger les embouts sur la PickPen. Étirer les embouts magnétiques de la PickPen et les introduire dans la première rangée du bloc d'échantillons. Mélanger délicatement pendant 30 secondes tout en faisant un mouvement continu de haut en bas entre la surface et le fond du puits.
- 7.2.5 Transférer la PickPen à la rangée correspondante de la plaque de resuspension préparée. Avec les embouts immergés, retirer les embouts magnétiques et tapoter délicatement pour libérer les particules dans le tampon de resuspension. Répéter pour tous les puits du bloc d'échantillons en utilisant de nouveaux embouts pour chaque rangée d'échantillons.
- 7.2.6 Refroidir le bloc d'aluminium à une température de 2 à 8 °C pendant au moins 20 minutes avant l'utilisation. Placer le nombre requis de tubes de réaction Assurance GDS dans le bloc d'aluminium.
- 7.2.7 Ouvrir les bouchons des tubes de réaction qui sont dans le bloc d'aluminium. Transférer 10 µl de solution tampon pour polymérase préparée dans chaque tube de réaction.
- 7.2.8 Transférer 20 µl de chaque puits de la plaque de resuspension dans chacun des tubes de réaction. Bien refermer les bouchons de chaque tube de réaction en appuyant fermement dessus.
- 7.2.9 Placer les tubes de réaction dans le Rotor-Gene<sup>MC</sup> Assurance dans un ordre séquentiel en commençant avec la position numéro 1 et démarrer le programme.

### 7.3 **Résultats du test**

- 7.3.1 Lorsque le test est terminé, le programme Rotor-Gene Assurance affichera un tableau des résultats. Chaque échantillon sera identifié comme suit : soit « Positive », ce qui indique la présence d'*E. coli* O157:H7 dans l'échantillon; soit « Negative », ce qui indique l'absence d'*E. coli* O157:H7 dans l'échantillon; soit « No Amp », ce qui indique qu'il n'y a pas eu d'amplification. Les échantillons positifs avec GDS doivent être confirmés par culture conformément à la méthode MFLP-80 (8.1). En cas de résultat « No Amp », communiquer avec le Service technique de BioControl Systems en composant le 1-800-245-0113.
- 7.3.2 Lorsque le test est terminé, manipuler et disposer de tous les déchets en les traitant comme des déchets biologiques. Ne jamais, en aucune circonstance, ouvrir les tubes de réaction une fois que l'amplification a commencé.

## 8. **RÉFÉRENCES**

- 8.1 WARBURTON, Don. 2001. MFLP-80. Isolement d' *E. coli* O157 dans les aliments. Dans: Volume 3, *Compendium des méthodes*, Site web: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.