



## DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

## OTTAWA

DÉTECTION D'*ESCHERICHIA COLI* O157 DANS LES ALIMENTS PAR L'ÉPREUVE  
IMMUNOENZYMATIQUE-POLYMYXINEBurton Blais<sup>1\*</sup>, Jessica Bosley<sup>1</sup>, Amalia Martinez-Perez<sup>1</sup> et Donna Douey<sup>2</sup><sup>1</sup>Section de recherche et de développement, Laboratoire d'Ottawa (Carling)  
Agence canadienne d'inspection des aliments  
Ottawa (Ontario) K1A 0C6<sup>2</sup>Opérations des laboratoires  
Laboratoire de Calgary  
3650 36th St. N.W.  
Calgary (Alb.) T2L 2L1\* Principale personne ressource :  
Courriel: [bblais@inspection.gc.ca](mailto:bblais@inspection.gc.ca)**1. APPLICATION**

La présente méthode est applicable à la détection rapide d'*Escherichia coli* O157 dans des bouillons d'enrichissement préparés avec une variété d'aliments et d'autres échantillons à l'aide de la technique de culture d'*Escherichia coli* O157:H7 de Santé Canada (MFLP-80; 9.3). On peut l'utiliser pour déterminer si le produit analysé est conforme aux dispositions des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*.

**2. PRINCIPE**

Après l'enrichissement initial de l'échantillon dans du bouillon trypticase-soja modifié additionné de novobiocine, les antigènes lipopolysaccharidiques (LPS) d'*Escherichia coli* O157 sont extraits de la culture d'enrichissement en chauffant le bouillon en présence de cholate de sodium. Les antigènes LPS extraits sont capturés par réaction avec les micropuits enduits de polymyxine, suivi de la détection des antigènes LPS capturés par l'ajout séquentiel d'un conjugué anticorps anti-*E. coli* O157-peroxydase disponible dans le commerce et d'un substrat chromogène, le tétraméthylbenzidine (TMB). L'épreuve ELISA-polymyxine s'est avérée très sensible et très spécifique pour les souches d'*E. coli* portant l'antigène O157; c'est une méthode rapide et peu coûteuse permettant de procéder à une identification de présomption dans les cultures d'enrichissement positives préparées avec une variété d'aliments, notamment le bœuf haché, les viandes transformées, les fruits et les légumes (9.1, 9.2). L'épreuve ELISA-polymyxine utilise une microplaque à 96 puits applicable à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.

**3. DÉFINITIONS DES TERMES**

Voir l'annexe A du Volume 3.

#### 4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du Volume 3.

#### 5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS

**Note :** Le superviseur du laboratoire doit veiller à ce que l'analyse décrite dans cette méthode soit effectuée conformément à la norme internationale « ISO/CEI 17025:2005 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ».

Les produits chimiques, matériel et équipements suivants sont nécessaires à la réalisation de la méthode et sont disponibles dans le commerce (voir la section 8 de la présente méthode pour la préparation des milieux individuels). Ceux-ci s'ajoutent à la liste qui figure dans la technique de culture d'*Escherichia coli* O157:H7 de Santé Canada, MFLP-80 (9.3).

**Note :** Si l'analyste utilise une variante de l'un des milieux énumérés ici (soit un produit offert dans le commerce ou un produit préparé à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au superviseur du laboratoire d'assurer l'équivalence.

- 1) Phosphate de sodium, dibasique, anhydre
- 2) Phosphate de sodium, monobasique, monohydraté
- 3) Chlorure de sodium
- 4) Acide sulfurique
- 5) Sulfate de polymyxine B
- 6) Chololate de sodium
- 7) Tween 20
- 8) Anticorps anti-*E. coli* O157:H7 marqués à la peroxydase et purifiés par affinité (n° 04-95-90, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)
- 9) 3,3', 5,5' - tétraméthylbenzidine (TMB), substrat de la peroxydase pour micropuits (un seul constituant) (n° 50-76-05, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD).
- 10) Tampon phosphate saline (PBS)
- 11) PBS avec Tween 20 (PBST)
- 12) PBST avec une protéine de blocage (PBST-B)
- 13) Solution de polymyxine (pour enduire)
- 14) Tampon chololate (pour l'extraction)
- 15) Solution d'arrêt
- 16) Agent de blocage de qualité transfert, à base de poudre de lait écrémé (n° 170-6404, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).
- 17) Microplaques Nunc-Immuno MaxiSorp (VWR International, Mississauga, Ontario), à fond plat
- 18) Microtubes à centrifuger avec bouchons (capacité de 1,5 ml).

- 19) Lecteur de microplaques pouvant mesurer l'absorption à 450 nm (ex. Quant Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT).
- 20) Laveur de microplaques (ex. Wellwash AC, Thermo Labsystems, Helsinki, Finlande)
- 21) Incubateur pouvant maintenir une température de 37 °C
- 22) Bloc chauffant pouvant recevoir des microtubes à centrifuger de 1,5 ml et atteindre une température de 100 °C, ou encore un bain-marie bouillant

## 6. MARCHE À SUIVRE

### 6.1 Traitement des échantillons

Préparer les échantillons d'aliments et les enrichir dans un bouillon trypticase-soja modifié additionné de novobiocine, conformément à la technique de culture d'*Escherichia coli* O157:H7 de Santé Canada (MFLP-80; 9.3). Prélever des échantillons des cultures en bouillon d'enrichissement et en faire l'analyse à l'aide de la procédure ELISA-polymyxine décrite ci-après. Avec chaque ensemble d'échantillons, analyser également un témoin positif constitué d'une souche bien caractérisée d'*Escherichia coli* O157:H7 cultivée en bouillon et un témoin négatif de stérilité/réactif (ex. du bouillon d'enrichissement non inoculé). Dans la mesure du possible, avec chaque ensemble d'échantillons, préparer également une culture d'enrichissement avec une matrice alimentaire représentative non inoculée (exempte d'*E. coli* O157:H7) et l'analyser en triplicata par la procédure ELISA-polymyxine.

### 6.2 Préparation des microplaques avec la polymyxine

- 6.2.1 Pipetter 200 µl de solution de polymyxine dans les puits d'une microplaque Nunc-immuno MaxiSorp.
- 6.2.2 Sceller les puits avec du ruban adhésif et incubé à 37 °C pour la nuit. À cette étape, on peut entreposer les microplaques à 4 °C à l'obscurité pendant une semaine sans perte appréciable d'activité (la conservation n'a pas été vérifiée pour de plus longues périodes).
- 6.2.3 Laver les puits à 6 reprises avec 300 µl de PBST.

### 6.3 Préparation des échantillons

- 6.3.1 Transférer 0,45 ml de la culture d'enrichissement préparée selon la méthode MFLP-80 (9.3) dans un microtube à centrifuger propre.
- 6.3.2 Ajouter 50 µl de tampon cholate, mélanger et placer le microtube dans un bloc chauffant à 100 °C ou dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes.
- 6.3.3 Laisser les tubes refroidir à la température ambiante.

### 6.4 Réalisation de l'épreuve ELISA-polymyxine

- 6.4.1 Pipetter 100 µl de chaque échantillon ayant subi l'extraction thermique au cholate dans l'un des puits d'une microplaque enduite de polymyxine et incubé pendant 30 minutes à la température ambiante. Si des débris sont présents au fond du tube d'extraction, prélever le liquide clair près de la surface.
- 6.4.2 Laver les puits à 6 reprises avec 300 µl de PBST.
- 6.4.3 Pipetter dans chaque puits 100 µl d'anticorps anti-*E. coli* O157:H7 marqués à la peroxydase, purifiés par affinité et dilués au 1/4000 dans du PBST-B, puis incubé pendant 30 minutes à la température ambiante.

- 6.4.4 Laver les puits à 6 reprises avec 300 µl de PBST.
- 6.4.5 Pipetter dans chaque puits 100 µl de solution de TMB (substrat de la peroxydase), puis incubé pendant 30 minutes à la température ambiante (couvrir pour mettre à l'abri de la lumière).
- 6.4.6 Pipetter dans chaque puits 50 µl de la solution d'arrêt.
- 6.4.7 Mesurer l'absorbance à 450 nm ( $A_{450}$ ) dans un lecteur de microplaques.

## 7. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Un échantillon est présumé positif à l'égard de la présence d'*E. coli* O157:H7 si la valeur d'absorbance ( $A_{450}$ ) obtenue est nettement supérieure à la valeur de base. La définition d'une valeur d'absorbance nettement supérieure à la valeur de base est la plus élevée des deux valeurs suivantes : une valeur  $A_{450}$  d'un échantillon qui est supérieure à la valeur moyenne plus 3 écarts-types déterminés avec une culture en bouillon d'enrichissement d'une matrice alimentaire représentative non inoculée (exempte d'*E. coli* O157:H7) ( $n = 3$ ), ou une valeur  $A_{450}$  supérieure à 0,1.

Pour qu'un ensemble d'analyses soit considéré comme valide, il faut que la valeur d'absorbance ( $A_{450}$ ) du témoin positif soit nettement supérieure à celle du témoin négatif. La valeur d'absorbance d'un témoin positif constitué d'une culture d'une souche d'*E. coli* O157:H7 en bouillon d'enrichissement contenant au moins  $10^8$ - $10^9$  ufc/ml est habituellement supérieure à 0,5. Celle d'un témoin négatif constitué d'un bouillon exempt d'*E. coli* O157:H7 est habituellement égale ou inférieure à 0,1.

Procéder aux étapes de confirmation telles que décrites dans la méthode MFLP-80 pour tous les échantillons présumés positifs.

## 8. MILIEUX ET RÉACTIFS

- 8.1 Tampon phosphate saline (PBS); se conserve à la température ambiante jusqu'à 3 mois  
Tampon phosphate 0,01 M (pH 7,4)/NaCl 0,85 % (p/v)
- 8.2 PBS avec Tween 20 (PBST); se conserve à la température ambiante jusqu'à 3 mois  
PBS contenant 0,05 % (v/v) de Tween 20
- 8.3 PBST avec une protéine de blocage (PBST-B); ne préparer que la quantité nécessaire le jour même  
PBST contenant 0,5 % (p/v) de poudre de lait écrémé comme agent de blocage de qualité transfert
- 8.4 Solution de polymyxine (pour enduire les microplaques); préparer une solution-mère d'une concentration de 1 mg/ml; se conserve à l'obscurité à 4 °C jusqu'à 3 mois  
Sulfate de polymyxine B dissous dans du PBS à une concentration finale de 50 µg/ml (préparer une solution fraîche pour chaque épreuve)
- 8.5 Tampon d'extraction au cholate; se conserve à la température ambiante jusqu'à 3 mois  
Cholate de sodium dissous dans du PBS à une concentration finale de 5 % (p/v) (se conserve à la température ambiante)
- 8.6 Conjugué *E. coli* O157-peroxydase; réhydrater selon les directives du fabricant (procédure A, dans du glycérol 50 %) et conserver dans les conditions indiquées. Des aliquots peuvent se conserver au congélateur jusqu'à 2 ans.

8.7 Solution d'arrêt; se conserve à la température ambiante jusqu'à 6 mois

Acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 M

## 9. BIBLIOGRAPHIE

- 9.1 BLAIS, B.W., Leggate, J., Bosley, J. et A. Martinez-Perez. « Comparison of fluorogenic and chromogenic assay systems in the detection of *Escherichia coli* O157 by a novel polymyxin-based ELISA », *Lett. Appl. Microbiol.*, n° 39 (2004), p. 516-522.
- 9.2 BLAIS, B.W., Leggate, J., Bosley, J. et A. Martinez-Perez. « Detection of *Escherichia coli* O157 in foods by a novel polymyxin-based enzyme-linked immunosorbent assay », *J. Food Prot.*, n° 68 (2005), p. 233-238.
- 9.3 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>.