



## DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉTECTION ET IDENTIFICATION DES *SHIGELLA* SPP. DANS LES ALIMENTSCésar Bin Kingombe<sup>1</sup>, Maria-Lucia Cerqueira-Campos<sup>1</sup>, Yvon-Louis Trottier<sup>2</sup> et Josée Houle<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Division de la recherche  
Direction générale des produits de santé et des aliments  
Santé Canada, repère postal : 2204A2  
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Courriel : ckingomb@hc-sc.gc.ca

<sup>2</sup> Laboratoire de St-Hyacinthe  
Agence canadienne d'inspection des aliments  
3499, boul. Casavant Ouest  
St-Hyacinthe (Québec) J2S 8E3

Courriel : trottieryl@inspection.gc.ca

**1. APPLICATION**

Cette méthode est applicable à la détection des *Shigella* spp. viables dans les produits frais et les salades commerciales. La méthode décrite dans le présent document a donné des résultats acceptables pour les épinards, le persil, la salade grecque, la salade de quatre fèves, la salade de pâtes grecque, la laitue romaine, la menthe fraîche, les oignons verts, le céleri, les myes et les fraises. On peut en outre l'utiliser pour déterminer s'il y a conformité avec les articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-25 datée de février 2004.

**2. DESCRIPTION**

La méthode décrite dans le présent document a initialement donné des résultats satisfaisants à l'égard de produits artificiellement contaminés. La procédure initiale a été adaptée et améliorée pour la détection courante des *Shigella* spp. dans les laboratoires diagnostiques.

**3. PRINCIPE**

La méthode est fondée sur la procédure du FDA-BAM (8.1) à laquelle certaines modifications ont été apportées. Une portion de l'échantillon d'aliment est enrichie dans un bouillon sélectif contenant de la novobiocine, puis ensemencée sur des géloses sélectives différentielles pour isoler les *Shigella* spp. Les isolats présumés de *Shigella* sont ensuite soumis à des épreuves biochimiques et sérologiques à des fins de

détection et d'identification. La détection et/ou la confirmation par méthode d'amplification en chaîne de la polymérase ou ACP (MFLP-26) est facultative.

#### 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 : 2005 (ou dernière révision): Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais ».

Les milieux suivants (6.2 à 6.10) sont commercialement disponibles et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 pour la formulation des milieux individuels.

**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.

- 6.1 Bouillon *Shigella*
- 6.2 Gélose MacConkey (MAC)
- 6.3 Gélose xylose-lysine-désoxycholate (XLD)
- 6.4 Gélose Hektoen (HE)
- 6.5 Gélose trois sucres-fer (TSI)
- 6.6 Gélose lysine-fer (LIA)
- 6.7 Milieu pour épreuve de mobilité avec 2,3,5-chlorure de triphényltétrazolium (TTC)
- 6.8 Gélose trypticase soja (TSA) ou l'équivalent
- 6.9 Bouillon trypticase soja (TSB) ou l'équivalent
- 6.10 Solution physiologique, 0,85% (stérile)
- 6.11 Novobiocine

##### Autre équipement et matériel requis

- 6.12 Sacs à stomacher avec filtres
- 6.13 Sacs à stomacher
- 6.14 Flacons Erlenmeyer (facultatif - au lieu des sacs à stomacher pour l'étape d'enrichissement (7.4.2))
- 6.15 Solutions stériles de HCl 1N et de NaOH 1N
- 6.16 pH-mètre ou papier pH d'une précision pouvant discerner 0,2 à 0,3 unités de pH dans une plage de 6,0 à 8,0 unités de pH (disponible chez EM Science ou J.T. Baker par l'entremise de VWR)

- 6.17 Incubateur à CO<sub>2</sub> ou jarres anaérobies avec sachets à génération de CO<sub>2</sub>
- 6.18 Incubateurs pouvant maintenir des températures de 35°C et de 42°C

**Note :** Il incombe à chaque laboratoire de veiller à maintenir la température recommandée de chaque incubateur et bain-marie. Si la méthode précise une température de 35°C, l'incubateur doit être en mesure de conserver une température de 35 ± 1,0°C. De façon similaire, l'écart acceptable pour les températures inférieures (30 ou 25°C) est de ± 1,0°C. Cependant, si la méthode précise une température plus élevée, par exemple 43 ou 45,5°C, il est crucial que l'incubateur ou le bain-marie maintienne un écart acceptable de 0,5°C en raison de l'éventuelle létalité des températures plus élevées sur les microorganismes isolés.

Milieux et réactifs de confirmation (commerciallement disponibles)

- 6.19 Trousses d'identification (API, VITEK, Micro-ID) ou l'équivalent
- 6.20 Antisérums polyvalents pour *Shigella* pour les groupes A, A<sub>1</sub>, B, C, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et D (ou envoyer à un laboratoire de référence pour sérotypage complet)

## 7. MARCHE À SUIVRE

### 7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Analyser les échantillons le plus tôt possible, de préférence dans les 24 heures suivant la réception. Durant le transport, sauf pour les produits stables à la température de la pièce, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur ou au congélateur selon la nature du produit. Décongeler les produits au réfrigérateur ou dans des conditions de temps et de température empêchant la croissance ou la destruction microbienne. Les aliments partiellement décongelés doivent être conservés au réfrigérateur.

**Note :** Utiliser les contenants appropriés pour éviter que l'égouttement du produit contamine l'aire de travail du laboratoire.

- 7.1.2 Si l'unité d'échantillonnage reçue pour analyse est inférieure à l'unité analytique recommandée, analyser tout l'échantillon et enregistrer le poids utilisé. Ajuster le volume de bouillon d'enrichissement pour conserver une dilution d'échantillon de 1:10.
- 7.1.3 Utiliser des techniques aseptiques et de l'équipement stérile pour toutes les étapes de l'analyse. Pour ce qui est de la manipulation des produits sous forme de poudre, le confinement est crucial pour éviter toute contamination croisée de l'aire de travail.

### 7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Avoir en main le bouillon *Shigella* stérile et la solution stérile de novobiocine.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de l'aire de travail à l'aide d'un désinfectant approprié.
- 7.2.3 Préparer et vérifier l'appropriation à l'usage de tous les témoins. Inclure des témoins positif et de réactif. Une souche de *Shigella sonnei* (ATCC 29930), *Shigella flexneri* (ATCC 29903), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313) ou *Shigella boydii* (ATCC 8700) devrait être incluse à titre de témoin positif.

**Note:** Les numéros ATCC sont présentés à titre de référence; des souches équivalentes de *Shigella* peuvent également être utilisées.

### 7.3 Préparation des échantillons

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

- 7.3.1 Afin d'assurer la représentativité de l'unité analytique, agiter les liquides ou les matières fluides jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas d'une matière solide, obtenir l'unité d'analytique en prélevant une portion à différents endroits dans l'unité d'échantillonnage. Pour réduire la charge de travail, on peut combiner les unités analytiques. Il est conseillé de regrouper un maximum de cinq unités analytiques.

#### **7.4 Enrichissement des *Shigella* spp.**

- 7.4.1 À l'aide de techniques aseptiques, peser 25 g ou ml d'échantillon (l'unité analytique) dans un sac stomacher avec filtre, puis ajouter 225 ml de bouillon *Shigella* contenant 0,5 µg/mL de novobiocine. Conserver la suspension pendant 10 minutes à la température ambiante et agiter de temps à autre ou masser doucement le sac.

**Note :** Si des volumes plus importants sont analysés, réchauffer préalablement le bouillon d'enrichissement à 35°C.

- 7.4.2 Verser le surnageant dans un flacon Erlenmeyer stérile de 500 ml ou dans un nouveau sac stomacher.
- 7.4.3 Ajuster au besoin le pH du surnageant à  $7,0 \pm 0,2$  à l'aide de NaOH 1N ou de HCl 1N stérile.
- 7.4.4 Placer les flacons Erlenmeyer ou les sacs stomacher dans un incubateur à CO<sub>2</sub> ou dans des jarres anaérobies munies d'un générateur de CO<sub>2</sub>. Incuber à 42°C pendant  $20 \pm 2$  heures.
- 7.4.5 Préparer un témoin positif et un témoin négatif en même temps que l'analyse de l'échantillon d'aliment.
- 7.4.6 À la fin de la période d'incubation, effectuer un dépistage du bouillon d'enrichissement pour la présence des *Shigella* spp. à l'aide de la méthode d'ACP (facultatif - voir MFLP-26) et/ou passer à l'étape d'isolement sur géloses sélectives (7.5).
- 7.4.7 Réfrigérer le bouillon d'enrichissement si la méthode d'ACP est utilisée au lieu du dépistage par culture.
- 7.4.8 Si la méthode d'ACP est positive pour les *Shigella* spp., passer à l'étape d'isolement sélectif à l'aide du bouillon réfrigéré (7.5).

#### **7.5 Isolement sur géloses sélectives**

- 7.5.1 Agiter le bouillon d'enrichissement et ensemercer une anse sur au moins deux géloses sélectives différentielles, telles que les géloses MacConkey (faible sélectivité), XLD (forte sélectivité) et HE (moyenne à forte sélectivité) pour obtenir des colonies bien isolées. Le bouillon d'enrichissement peut être ensemercé sur une gélose TSA à des fins de contrôle de fond seulement.
- 7.5.2 Conserver le bouillon d'enrichissement au réfrigérateur jusqu'à la fin de l'analyse de l'aliment.
- 7.5.3 Incuber les géloses ensemercées à 35°C pendant  $24 \pm 2$  heures.
- 7.5.4 Examiner les géloses sélectives différentielles pour la présence de colonies caractéristiques de *Shigella* (voir le tableau 1).
- 7.5.5 Prélever des colonies suspectes à des fins de confirmation par analyse biochimique et/ou par méthode d'ACP (7.6) et par épreuve sérologique (7.7).

#### **7.6 Dépistage (par méthode biochimique et/ou par ACP)**

- 7.6.1 Méthode d'ACP :

Étant donné que la méthode d'ACP est très spécifique et sensible pour les *Shigella*, l'isolement de colonies pures n'est pas nécessaire pour ce test.

#### 7.6.2 Méthode biochimique :

7.6.2.1 Si les colonies sont bien isolées: sélectionner entre 3 et 5 colonies suspectes de *Shigella* (ou plus si jugé nécessaire) par boîte de gélose, à des fins de dépistage biochimique.

Encercler toutes les colonies suspectes avant de réfrigérer les boîtes afin d'effectuer, si nécessaire, des analyses supplémentaires sur des colonies suspectes.

7.6.2.2 Si les colonies ne sont pas bien isolées: ensemercer en stries les colonies suspectes sur des boîtes de gélose de MacConkey pour les purifier et incubé les boîtes à 35°C pendant 24 ± 2 heures.

7.6.2.3 À l'aide d'une aiguille d'ensemencement stérile, prélever des colonies suspectes et les ensemercer dans les milieux TSI, LIA et le milieu pour l'épreuve de mobilité. En parallèle, effectuer une analyse avec le témoin positif (culture pure d'une souche de *Shigella*) et avec le témoin négatif (culture pure d'une souche de *E.coli*). Conserver les boîtes de gélose au réfrigérateur pour utilisation ultérieure possible (voir 7.6.2.6).

7.6.2.4 Incuber les milieux biochimiques ensemercés à 35°C pendant 20 à 24 heures.

**Note :** Il est possible d'obtenir des résultats biochimiques erronés si les tubes ont été bouchés hermétiquement pendant la période d'incubation.

7.6.2.5 Les *Shigella* spp. typiques sont non motiles et négatifs pour le H<sub>2</sub>S, la lysine et la production de gaz. Cependant, *S. dysenteriae* (sérotipe 3), *S. boydii* (sérotypes 13 et 14) et *S. flexneri* (sérotipe 6) peuvent produire du gaz (voir le tableau 2 pour l'interprétation des résultats).

7.6.2.6 Il est conseillé d'analyser des colonies supplémentaires si les colonies suspectes originales donnent des résultats négatifs pour les *Shigella* spp. et qu'il est jugé nécessaire de prélever d'autres colonies, par exemple, si la méthode d'ACP est positive pour *Shigella* et que les colonies prélevées démontrent des résultats biochimiques négatifs ou s'il s'agit d'un échantillon de haute priorité.

7.6.2.7 Les trousse de diagnostic commerciales (API, VITEK, MICROID ou l'équivalent) peuvent être utilisées pour obtenir des profils biochimiques détaillés des isolats bactériens.

**Note :** Lorsque des trousse diagnostiques rapides sont utilisées, suivre les instructions du fabricant, y compris la température d'incubation précisée.

7.6.2.8 Si l'on soupçonne la présence de *Shigella*, effectuer des analyses sérologiques ou envoyer à un laboratoire de référence pour sérotypage complet.

**Note :** Si l'analyse à l'aide de l'antisérum polyvalent anti-*Shigella* n'a pas été effectuée, mais que les résultats d'une méthode rapide indiquent la présence de *Shigella* spp., une identification provisoire peut être faite.

7.6.2.9 Si aucun des isolats d'une unité d'échantillonnage particulière n'indique la présence possible de *Shigella*, il faut considérer que l'unité d'échantillonnage en est exempte.

7.6.2.10 Si l'épreuve sérologique n'est pas effectuée dans les 72 heures, ensemercer les isolats suspects sur des pentes de gélose nutritive (GN) et incubé à 35°C pendant 24 heures.

7.6.2.11 Garder les pentes de gélose au réfrigérateur.

- 7.6.2.12 Il ne faut pas utiliser des pentes de gélose nutritive conservées pendant plus de 72 heures pour effectuer l'épreuve sérologique. Préparer à cette fin des pentes de gélose fraîches.

## 7.7 Identification sérologique

Les antisérums polyvalents de groupage sont utilisés pour supporter l'identification provisoire des isolats comme membres des *Shigella* spp. (voir le tableau 3). Si les antisérums polyvalents sont disponibles et donnent un résultat positif, mais que les antisérums monovalents utilisés pour différenciation supplémentaire des espèces ne sont pas disponibles, envoyer la culture à un laboratoire de référence pour sérotypage complet.

- 7.7.1 Sur la lame d'agglutination, délimiter les zones suivantes : C- (témoin négatif) et T (culture d'essai).

**Note :** Étant donné que certains antisérums commerciaux anti-*Shigella* sont étiquetés ou emballés différemment, lire l'avis d'accompagnement de tout nouvel antisérum et vérifier toute ambiguïté avec le fabricant.

- 7.7.2 Si une culture témoin *Shigella* est disponible pour chaque groupe somatique analysé, préparer une zone C+ (témoin positif) pour chaque groupe.

- 7.7.3 Déposer une goutte de solution physiologique sur chacune des zones T et C+, et deux gouttes sur la zone C-.

- 7.7.4 Prélever sur une gélose trois sucres-fer, une gélose lysine-fer ou une pente de gélose nutritive, une quantité de culture suffisante pour préparer une suspension dense dans la zone de la culture d'essai (T) et dans celle du témoin négatif (C-). Prélever l'inoculum à partir de la pente de la gélose inclinée.

- 7.7.5 Préparer les antisérums somatiques polyvalents en suivant les instructions du fabricant; ajouter une goutte sur chacune des zones T et C+.

- 7.7.6 Utiliser une aiguille ou une anse stérile pour mélanger chacune des suspensions de culture, de solution physiologique et d'antisérum dans les zones T et C+, et le mélange de solution physiologique et de culture dans la zone C-. Faire osciller les préparations pendant une minute.

- 7.7.7 Examiner la lame sur un fond sombre pour déceler la formation d'une agglutination. Les cultures de *Shigella* agglutinent habituellement en moins d'une minute.

**Note :** Si l'analyse sérologique est positive, la culture doit être envoyée à un laboratoire de référence pour *Shigella* pour sérotypage complet.

- 7.7.8 Les résultats de l'épreuve sérologique à laquelle on a soumis une culture donnée ne sont pas valables s'il y a agglutination dans la zone du témoin négatif (autoagglutination).

- 7.7.9 Les isolats qui réagissent sérologiquement et qui ne démontrent aucun résultat contradictoire dans les analyses de dépistage biochimique sont déclarés positifs pour *Shigella*.

**Note :** Il faut insister sur le fait que toute culture qui n'agglutine pas, mais qui démontre des réactions biochimiques suggestives de *Shigella* doit être envoyée à un laboratoire de référence pour sérotypage complet pour fins d'identification.

## 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 AOAC. 1995. *Shigella*. Chapitre 6. Dans : *Bacteriological Analytical Methods*, 8<sup>e</sup> édition (1998), Gaithersburg, MD.

- 8.2 American Public Health Association. 2001. *Shigella*. Chapitre 38 . Dans : *Compendium of Methods for the Examination of Foods*, 4<sup>e</sup> édition. F.P. Downes et K. Ito (éditeurs), Washington, D.C.
- 8.3 Centers for Disease Control and Prevention. 1999. Isolation and identification of *Shigella*. Chapitre 4 de l'ouvrage intitulé *Laboratory methods for diagnosis of epidemic dysentery and cholera*, Atlanta, Georgia.
- 8.4 ISO/TC 34/SC9. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Shigella* sp. ISO/DIS2 1567.
- 8.5 Kelly, A.T. et M. Fulton. 1953. Use of triphenyl tetrazolium chloride in motility test medium. *Am. J. Clin. Path.* 23:512.

**Tableau 1 : Apparence des colonies de *Shigella* spp. sur les milieux d'ensemencement sélectifs**

Organisme	Géloses sélectives	Apparence des colonies	Dimension des colonies
<i>Shigella</i>	MAC	Convexes, incolores (lactose non fermenté); les colonies de <i>S. sonnei</i> sont plates et leurs rebords sont rugueux	2 à 3 mm <sup>a</sup>
	XLD	Rouges ou incolores	1 à 2 mm <sup>a</sup>
	HE	Vertes	2 à 3 mm <sup>a</sup>
<i>E.coli</i>	MAC	Colonies roses et plates (lactose fermenté) entourées d'une région rose plus foncée	
	XLD	Jaunes	
	HE	Roses à orange	

<sup>a</sup> Les colonies de *S. dysenteriae* (sérotipe 1) peuvent être plus petites sur les géloses MAC et HE; et souvent, les colonies sont très minuscules sur la gélose XLD, contrairement aux colonies d'autres espèces de *Shigella*.

**Tableau 2 : Réactions biochimiques des *Shigella* spp. - épreuves de dépistage**

Milieu de dépistage	Réactions - <i>Shigella</i> spp.	Réactions - <i>E.coli</i>
TSI	K/A, aucune production de gaz (pente rouge / culot jaune) <sup>a</sup>	A/A, production de gaz (pente jaune / culot jaune, avec poches d'air)
Production de H <sub>2</sub> S sur TSI	Négative	Négative
LIA	K/A (pente mauve / culot jaune) <sup>b</sup>	K/K (pente mauve / culot mauve)
Mobilité <sup>c</sup>	Négative	Positive

<sup>a</sup> K = alcaline (rouge); A = acide (jaune); production de gaz à partir du glucose chez certaines souches de *S. flexneri* (sérotipe 6), de *S. boydii* (sérotypes 13 et 14) et de *S. dysenteriae* (sérotipe 3).

<sup>b</sup> K = alcaline (mauve); A = acide (jaune); une réaction alcaline (mauve) dans le culot du tube indique la décarboxylation de la lysine. Une réaction acide (jaune) dans le culot du tube indique l'absence de décarboxylation de la lysine.

<sup>c</sup> Milieu d'épreuve de mobilité auquel le TTC a été ajouté : positif - couleur rougeâtre diffuse dans l'ensemble du milieu; négatif - ligne rougeâtre le long du site d'ensemencement seulement.

**Tableau 3 : Épreuves sérologiques de différenciation des *Shigella* spp.**

Épreuve	<i>Shigella</i> spp.			
	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
Antisérums polyvalents	A, A <sub>1</sub>	B	C, C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub>	D