



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

ISOLEMENT D' *E. COLI* O157:H7 ou NM DANS LES ALIMENTS

**Don Warburton et
le Comité des méthodes microbiologiques
Division de l'évaluation
Bureau des dangers microbiens
Direction des aliments
Repère postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

**Donna Christensen
Laboratoire de Calgary
Agence canadienne d'inspection des
aliments
3650 Rue 36 N.O.
Calgary (Alberta) T2L 2L1**

Courriel: Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

Courriel: christensend@inspection.gc.ca

1. APPLICATION

La présente méthode s'applique à l'isolement des bactéries *E. coli* O157 viables dans les aliments pour déterminer s'il y a conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette version révisée remplace la méthode MFLP-80 datée de juin 2004.

2. DESCRIPTION

Il a été démontré que cette méthode donne des résultats satisfaisants avec les viandes (notamment le bœuf, le veau et le porc), les légumes, les produits laitiers, les épices et les échantillons environnementaux contaminés artificiellement ainsi que les échantillons naturellement contaminés. Elle peut être utilisée pour déceler la présence d'*E. coli* O157 dans d'autres aliments et ingrédients alimentaires, ainsi que dans des échantillons environnementaux.

3. PRINCIPE

La présente méthode est fondée sur les travaux du Dr. S. Weagant (FDA américaine, 8.3, 8.4 et comm. pers.) avec des modifications par Warburton et coll. (8.2 et données non publiées) ainsi que des études internes réalisées par les laboratoires de SC et de l'ACIA. L'échantillon est enrichi dans un bouillon sélectif et ensemencé sur des géloses sélectives. Les positifs présomptifs sont déterminés dans les 48 heures. Les épreuves biochimiques et sérologiques de confirmation sont réalisées sur des colonies purifiées.

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

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 ».

Les milieux et réactifs énumérés ci-après sont disponibles dans le commerce et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 pour la formulation de la plupart 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.

- 1) Bouillon de trypticase-soja modifié avec novobiocine (mTSB-n)
- 2) Bouillon d'enrichissement *E. coli* entérohémorragique (ECEH) (BEE)
- 3) Géloses du Groupe 1 (des données ont démontré une sélectivité accrue pour ce groupe de géloses - une ou deux géloses peuvent être choisies):

Gélose *E. coli* hémorragique modifiée (HCm) avec tellurite et cefsulodine
Gélose HCm avec supplément CT (Oxoid SR172)
CHROMagar pour *E. coli* O157 (BD)
- 4) Géloses du Groupe 2 (choisir une gélose dans ce groupe si une seule gélose du groupe 1 a été choisie):

Gélose MacConkey sorbitol modifiée (TCCSMAC) avec tellurite, cefixime et cefsulodine
Gélose CR-SMAC
CT-SMAC (base de gélose CR-SMAC de Oxoid (CM1005) avec supplément CT
- 5) Géloses du Groupe 3 (doivent être validées par le laboratoire avant utilisation):

Géloses chromogènes, incluant la gélose Rainbow (Biolog)
- 6) Gélose trypticase-soja avec extrait de levure (TSA-YE)
- 7) Gélose au sorbitol et au rouge de phénol (PRSA)
- 8) Gélose MacConkey au sorbitol
- 9) Gélose pour mobilité
- 10) Pentes de gélose à l'urée
- 11) Bouillon violet avec cellobiose ou gélose de glucide avec cellobiose
- 12) K_2SO_4 (concentration finale à 0,5 % dans le mTSB-n -pour certaines épices et aliments contenant beaucoup d'épices)

- 13) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent.
- 14) Cultures témoins (utiliser des cultures ATCC ou l'équivalent), témoin positif: *E. coli* O157 (H7 ou autres sérovars), témoin négatif: *E. coli* non-O157
- 15) Dynabeads (voir MFLP-90) ou billes immunomagnétiques ou étapes de concentration équivalentes
- 16) Antisérums O157 et H7 et tests d'agglutination
- 17) Trousses d'agglutination au latex; pour *E. coli* O157 (Oxoid), pour O157 et H7 (Wellcolex) or un équivalent validé
- 18) Incubateurs capables de maintenir des températures de 35 et 42 °C

<p>Note: Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que l'on maintient les incubateurs et les bains-marie à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, les incubateurs et les bains-marie peuvent être réglés à 35 +/-1,0 °C. De même, une température moindre, soit de 30 ou 25 degrés, peut s'établir à +/-1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est crucial de maintenir les incubateurs et les bains-marie à +/-0,5 °C de la température recommandée car des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme que l'on cherche à isoler.</p>

- 19) Bouillon M
- 20) Réactifs pour la coloration de Gram
- 21) Réactifs IMViC (voir MFHPB-19)
- 22) MUG (4-méthylumbélliferyl-β-D-glucuronide, bouillon LST-MUG (Oxoid), Colicomplete (disques MUG; BioControl)
- 23) BCIG (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) sous forme de sel de Na ou de CHX (cyclohexylammonium)
- 24) Trousses d'identification rapide telles que Vitek, API ou l'équivalent
- 25) Trousses de détection rapide telles que VIP, Singlepath, ou l'équivalent (voir l'annexe K du Compendium)
- 26) Trousses de détection de toxine telles que Meridian Premier EHECm Singlepath VT ou l'équivalent

7. MARCHE À SUIVRE

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités d'échantillonnage 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 d'échantillonnage au réfrigérateur ou au congélateur, selon la nature du produit, à l'exception des aliments stables à la température de la pièce. Décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou dans des conditions de temps et de température empêchant la croissance ou la destruction microbienne.
- 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 en main du mTSB-n stérile (et du bouillon d'enrichissement ECEH (BEE) si requis).
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail à l'aide d'un désinfectant approprié.

7.3 Préparation de l'échantillon

- 7.3.1 Afin d'assurer la représentativité de chaque unité d'analyse, agiter les liquides ou les matières fluides jusqu'à homogénéité. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, obtenir l'unité d'analyse en prélevant une portion à différents endroits dans l'unité d'échantillonnage. Pour réduire la charge de travail, on peut regrouper les unités d'analyse. Il est recommandé que l'échantillon composite ne contienne pas plus de cinq unités d'analyse.

Note : Le bouillon d'enrichissement devrait être pré chauffé à 35 °C.

- 7.3.2 Préparer une dilution 1:10 de l'aliment en mélangeant aseptiquement 25 g ou ml (ou une autre unité analytique appropriée, telle que 65 g pour le boeuf haché) dans 225 ml (ou la quantité nécessaire pour maintenir un ratio 1:10) de bouillon d'enrichissement mTSB-n (et BEE, si applicable). Passer au stomacher ou au mélangeur. **Il faut préparer un deuxième bouillon d'enrichissement primaire directement dans le BEE lorsque l'échantillon contient une forte charge bactérienne de micro-organismes compétiteurs, lors d'enquêtes sur des toxi-infections alimentaires et lorsque jugé approprié.** (En conséquence, vous aurez 2 bouillons d'enrichissement primaire de 25 g chacun lorsqu'une forte charge bactérienne est suspectée).

Note : Certaines épices comme la poudre d'oignon ou d'ail sont des antimicrobiens naturels. Lors de l'analyse d'épices ou de produits contenant beaucoup d'épices, ajouter 0,5% K_2SO_4 au mTSB-n avant d'autoclaver. L'ail est particulièrement nocif pour *E. coli* O157, c'est pourquoi il faut diluer à 1:100 l'ail ou les produits qui en contiennent. Il est possible qu'il faille diluer davantage d'autres épices avant de les analyser (voir MFHPB-20 ou MFLP-70).

- 7.3.3 Préparer en même temps un témoin négatif et un témoin positif.
- 7.3.4 Incuber le mélange d'enrichissement et les témoins à 42 °C pendant 22-24 heures.
- 7.3.5 Rechercher *E. coli* O157 dans le bouillon d'enrichissement à l'aide de trousse de détection rapide (voir l'annexe K du Compendium) ou passer à l'étape 7.3.6.

Note : Lorsqu'on utilise les trousse de détection rapide, on peut ajuster la température et la durée d'incubation de l'enrichissement primaire (7.3.5) en suivant les instructions du fabricant; suivre la méthode appropriée du Compendium. Garder les bouillons d'enrichissement car il faut confirmer toutes les réactions positives révélées par les trousse rapides en procédant à une culture selon la présente méthode (MFLP-80). (Il n'est pas recommandé de réfrigérer le bouillon mTSB-n plus de 48 heures. La réfrigération du bouillon BEE n'est pas recommandé car des études ont démontré que les comptes de *E. coli* O157 diminuent de façon significative sous réfrigération en dedans de 24 heures).

- 7.3.6 Concentrer le *E. coli* O157 à partir du (des) bouillon(s) d'enrichissement par séparation immunomagnétique à l'aide de la méthode MFLP-90 ou des procédures équivalentes. Passer à l'étape 7.4 ou 7.5.

7.4 Enrichissement secondaire dans le BEE

Note: Il faut suivre cette étape lorsqu'une trousse rapide a indiqué la présence d'*E. coli* O157, mais qu'on ne l'a pas isolé lorsque les bouillons d'enrichissement primaires, mTSB-n et BEE (si applicable) ont été ensemencés sur les géloses sélectives. *E. coli* O157 peut être difficile à isoler à partir de certains échantillons à fortes charges bactériennes.

- 7.4.1 Après avoir agité le bouillon d'enrichissement, transférer 1 ml du bouillon mTSB-n et/ou BEE dans 9 ml de BEE. Incuber à 35 °C pendant 18-24 heures. Concentrer tel qu'indiqué en 7.3.6. Resuspendre le culot et ensemencer selon les instructions du fabricant sur les géloses sélectives et suivre les étapes de confirmation décrites ci-dessous pour les colonies typiques. Ne pas réfrigérer le bouillon, l'analyse doit être continuée à cette étape. (Facultatif: pour retarder l'incubation de l'enrichissement secondaire dans le BEE, en attendant pour la confirmation des ensemencements initiaux, conserver le TSBm-n original jusqu'à 48 heures, et transférer dans le BEE pour incubation seulement lorsqu'il est déterminé que cette étape est nécessaire).

7.5 Isolement sélectif

- 7.5.1 Resuspendre le culot obtenu en 7.3.6 et ensemencer selon les instructions du fabricant sur au moins deux géloses différentes : une ou deux géloses du Groupe 1 et une gélose du Groupe 2 si une seule gélose du Groupe 1 est choisie. Le Groupe 1 comprend la gélose HCm (avec tellurite et cesulodine), CHROMagar et la gélose HCm avec le supplément CT (Oxoid SR172). Le Groupe 2 comprend les géloses TCCSMAC, CT-SMAC et CR-SMAC

Géloses du Groupe 1

HCm/HCm-CT: Incuber les géloses à 42 °C pendant 18-24 heures. Les colonies typiques d'*E. coli* O157:H7 sont bleues. D'autres sérovars de *E. coli* incluant O157 (non H7) auront une coloration jaune sur HCm/HCm-CT.

BD CHROMagar: Incuber les géloses à 35 °C pendant 18-24 heures. Les colonies typiques d'*E. coli* O157:H7 sont mauves contre un fond blanc. Les autres organismes Gram négatif sont incolores, bleus, verts ou bleu-vert.

Géloses du Groupe 2

TCCSMAC: Incuber les géloses à 42 °C pendant 18-24 heures. Les colonies typiques d'*E. coli* O157:H7 sont incolores, prennent la coloration du milieu ou ont une coloration qui varie du gris au rose avec un centre de couleur fumée. D'autres sérovars d'*E. coli*, y compris O157 (non H7), auront une coloration rouge sur TCCSMAC.

CT-SMAC: Incuber les géloses à 35°C pendant 18-24 heures. Les colonies typiques d'*E. coli* O157:H7 sont foncées et de couleur magenta avec un contour clair. Dans certains cas, la gélose devient orange et les colonies prennent la coloration de la gélose avec un centre gris foncé.

CR-SMAC: Incuber les géloses à 35°C pendant 18-24 heures. Les colonies typiques d'*E. coli* O157:H7 sont marron foncé avec un contour clair. Dans certains cas, la gélose devient beige clair et les colonies prennent la coloration de la gélose avec un centre foncé.

7.6 Étapes de confirmation

Note: Utiliser toujours un témoin de culture positif et négatif pour chaque analyse.

Note: Avant de débiter les étapes de dépistage et de confirmation décrites ci-dessous, se référer au Tableau 1 pour les exigences des Lignes directrices no. 10 sur les produits de boeuf haché cru et autres produits de viande (référence 8.5). Appliquer également ces étapes pour les autres aliments.

7.6.1 Lorsque les colonies suspectes sont bien isolées et suffisamment grosses, au moins 10 colonies (si disponibles) devraient être analysées. À ce point, la sérologie O157 sur ces colonies peut aider dans le dépistage mais cette étape est facultative. Si cette étape facultative est utilisée, continuer alors avec les étapes de confirmation uniquement pour les colonies qui sont positives pour O157. Lorsque les colonies ne sont pas bien isolées ou sont petites (un sérotype à croissance lente), ensemencer les colonies suspectes sur les géloses sélectives et/ou TSA-YE pour en déterminer la pureté et continuer ensuite de la façon décrite ci-dessous.

7.6.2 Tracer une grille sur les deux géloses choisies dans les groupe 1 et/ou 2. Inoculer au moins 10 colonies typiques (si disponibles) et isolées dans les cellules de la grille des deux géloses. Incuber à la température et pour la durée d'incubation appropriées selon les géloses spécifiques utilisées. Inoculer les mêmes isolats dans des éprouvettes de base de bouillon violet contenant du cellobiose à 1 %. Incuber à 35°C pendant 18-24 h.

Poursuivre la confirmation avec les isolats qui sont typiques sur les géloses sélectives et qui sont négatifs pour le sorbitol et le cellobiose.

Voir le tableau 2 pour les réactions biochimiques et sérologiques typiques.

Note: À ce point, l'épreuve MUG (7.6.6) peut être utilisé comme "épreuve de dépistage". Analyser les isolats obtenus en 7.6.2 pour la réaction au MUG et poursuivre l'analyse (7.6.3) avec uniquement les isolats qui sont MUG négatif. Par la suite, il n'est pas requis de compléter à nouveau l'épreuve MUG comme "épreuve de confirmation".

7.6.3 Confirmer que les isolats suspects sont bien *E. coli* à l'aide d'une trousse d'identification rapide telle que Vitek ou API.

7.6.4 Confirmer que les isolats sont bien O157 en utilisant des trousse d'agglutination au latex ou des antisérums O157.

Note: Lors de l'utilisation de trousse d'agglutination au latex ou d'antisérums, l'isolat peut avoir besoin d'être revivifié par passage dans un bouillon M ou sur une gélose mobilité à plusieurs reprises (au moins trois fois). Bien que certaines trousse ne requièrent pas la revivification, SC a constaté que cette étape aide à la sérologie.

7.6.5 Voir le tableau 1 pour les étapes additionnelles de confirmation :

Faire l'une ou l'autre des épreuves:

A) Épreuve pour la production de toxine VT (Lorsque l'analyse pour la toxine est requise, il est recommandé d'utiliser une méthode du Compendium telle que MFLP-93 (ou l'équivalent) qui confirme la présence de toxine ou du gène de la toxine;

OU B) Bax *E. coli* O157:H7 MP (ou l'équivalent);

OU C) Agglutination H7 (analyse sérologique complète avec l'antisérum H7 en suivant les

instructions du fabricant).

Si positif, procéder comme un isolat confirmé de *E. coli* O157:H7 ou NM.

Note: Lorsque les colonies démontrent des caractéristiques sérologiques et biochimiques typiques pour *E. coli* O157 (y compris des réactions caractéristiques sur les géloses, réactions négatives pour le sorbitol et le cellobiose et réaction négative pour le MUG) et lorsque l'analyse pour la production de toxine est requise, utiliser une méthode appropriée pour cette analyse dans le Compendium de SC. Suivre les instructions du fabricant. Le nombre d'isolats analysés est déterminé par le superviseur du laboratoire en fonction du nombre d'isolats typiques présents, de l'urgence du résultat (c.-à-d., enquête sur une toxi-infection alimentaire vs O157 détecté lors d'analyse de routine, etc) et d'autres facteurs pertinents.

7.6.6 Épreuve du MUG - fluorescence (effectuer une des épreuves suivantes):

- 1) Ensemencer les colonies suspectes sur une gélose au sorbitol et au rouge de phénol avec MUG (PSRA). Incuber la gélose à 35°C pendant 22-24 heures.
- 2) Inoculer un bouillon LST avec MUG. Incuber à 35°C pendant 22-24 heures.
- 3) Inoculer une gélose TSA avec un isolat (7.6.2) de manière à former un tapis de bactéries. Transférer aseptiquement un disque MUG (Colicomplete) sur la gélose. Incuber à 35°C pendant 22-24 heures.

Vérifier la réaction au MUG à l'aide d'une lampe UV à 345 nm. S'assurer que les témoins positif et négatif donnent la réaction appropriée. Lorsque des éprouvettes sont utilisées, s'assurer que l'éprouvette contrôle ne démontre aucune fluorescence.

7.6.7 Épreuves de confirmation facultatives: pour les identifications difficiles, ces étapes facultatives peuvent être utiles.

- 1) Procéder à une coloration de Gram.
- 2) Inoculer des épreuves IMViC (voir MFHPB-19) et des pentes à l'urée (voir MFHPB-20). Incuber à 35 °C pendant 22-24 heures.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Szabo, R.A., E. Todd, J. MacKenzie et L. Parrington. 1990. Increased sensitivity of Rapid HGMF-ELA procedure for *E. coli* O157 detection in foods and bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3546-3549.
- 8.2 Warburton, D.W., J.W. Austin, B.H. Harrison et G. Sanders. 1998. Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated bottled water. *J. Food Prot.* **61**(8):948-952.
- 8.3 Weagant, S.D., J.L. Bryant et K.G. Jinneman. 1994. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Bulletin #3900, Laboratory Information Bulletin (USFDA)* **10**(9):1-12.
- 8.4 Weagant, S.D., J.L. Bryant et K.G. Jinneman. 1995. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *J. Food Prot.* **58**(1):7-12.
- 8.5 Lignes directrices No. 10 publiées sur le site web de Santé Canada (SC) à l'adresse: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/guidelines_raw_ground_beef-directives_boeuf_hache_cru_f.html.

Tableau 1. Étapes requises de confirmation par les Lignes directrices No. 10 pour le boeuf haché et produits de viande (8.5)

Basé sur les méthodes de SC présentement publiées, ce qui suit est acceptable:

Ensemencement sélectif à partir de l'enrichissement MFLP-80 ou l'équivalent:

Concentrer l'enrichissement par séparation immunomagnétique et ensemercer sur des milieux sélectifs. Choisir des colonies typiques et purifier. **Compléter ce qui suit:**

- 1) Confirmer que l'isolat est bien un *E. coli* à l'aide d'une trousse d'identification rapide pour entériques telle que Vitek, API ou l'équivalent.

ET

- 2) Poursuivre la confirmation des isolats comme des sérotypes de *E. coli* O157 par les épreuves biochimiques suivantes: réaction négative pour le sorbitol et le cellobiose, réaction négative au MUG et agglutination O157 positive (une agglutination au latex ou avec des antisérums).

[si une de ces épreuves biochimiques est faite via une trousse d'identification rapide ou comme étape de dépistage, ne PAS refaire]

Si l'isolat de *E. coli* O157 rencontre les critères mentionnés ci-haut, effectuer **une** des combinaisons d'épreuves suivantes sur le même isolat:

- A) Épreuve de production de toxine VT (doit être positive par la méthode MFLP-93 ou l'équivalent) **OU** positive pour les gènes de toxine VT. Si l'épreuve est positive, procéder comme un isolat confirmé de *E. coli* O157:H7 ou NM.

OU

- B) Confirmer l'identification par le BAX *E. coli* O157:H7 MP (ou l'équivalent). Si l'identification est positive, procéder comme un isolat confirmé de *E. coli* O157:H7 ou NM.

OU

- C) L'agglutination H7 est positive. **Note: En raison de la difficulté à revivifier certains antigènes H, cette épreuve n'est pas recommandée à moins que vous ne soyez entraîné pour ce type de sérologie. Également, le temps requis pour effectuer la sérologie H empêche l'action de conformité dans un délai approprié.**

Si l'épreuve est positive, procéder comme un isolat confirmé de *E. coli* O157:H7 ou NM.

Note: Les épreuves biochimiques suivantes DOIVENT être complétées sur les colonies typiques: sorbitol, cellobiose, MUG et sérologie (ou identifié via BAX <i>E. coli</i> O157:H7 MP).
--

Tableau 2. Caractéristiques d'*E. coli* O157:H7

	Réactions ^A d' <i>E. coli</i> O157:H7	Réactions d'autres <i>Escherichia</i>
Coloration de Gram	Négative	Négative
IMViC (voir MFHPB-19)		
Indole	+ (Rouge) ^B	Variable
Rouge de méthyle	+ (Rouge)	+ (Rouge)
Voges-Proskauer	- (Incolore)	- (Incolore)
Citrate	- (Vert ou aucune croissance)	- (Vert ou aucune croissance)
Cellobiose	- (Violet)	- (Violet)
Sorbitol	- (Pâle ou incolore)	+ (Couleur)
Pentes à l'urée	- (Pâle)	- (Pâle)
Pigmentation sur gélose nutritive	- (Pas de pigmentation)	- (Pas de pigmentation)
Réaction au MUG	- (Pas de fluorescence ^C)	+ (Fluorescence)
Réaction au BCIG	- (Pâle)	+ (Couleur)
Agglutination au latex	+ (Positive)	- (Négative)
O157	+ (Positive)	- (Négative)
H7	+ (Positive)	- (Négative)
Production de vérotoxine (VT)	+ pour VT1 et/ou VT2)	+ ou - pour VT1 et/ou VT2

^A + (Réactions positives); - (Réactions négatives)

^B Certaines souches de *E. coli* O157 sont indole négatif

^C *E. coli* O157:H16 et H45 sont fluorescents en présence du MUG.