



**MÉTHODE REVEAL DE 8 HEURES POUR DÉTECTER LA PRÉSENCE D'*ESCHERICHIA COLI* O157:H7  
DANS LE BŒUF CRU ET LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX**

**1. APPLICATION**

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

**2. DESCRIPTION**

Une étude de l'AOAC (8.1) a démontré que cette méthode donne des résultats satisfaisants avec les cubes de bœuf cru et le bœuf haché cru contaminés artificiellement et les échantillons environnementaux prélevés sur de l'acier inoxydable. Le Comité des méthodes microbiologiques a approuvé cette méthode pour détecter la présence d'*E. coli* O157:H7 dans le bœuf cru et les échantillons environnementaux seulement. Il faut analyser les autres produits alimentaires au moyen des autres méthodes disponibles dans le Compendium.

**3. PRINCIPE**

À la suite de l'enrichissement sélectif dans le bouillon Reveal de 8 h, 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 conjuguat 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 de visualisation 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 Reveal de 8 h (Neogen Corporation)**
- 3) BCM O157:H7 de Biosynth + gélose chromogène (Biosynth, Naperville, IL)
- 4) Gélose de coli hémorragique
- 5) Gélose de MacConkey avec sorbitol (Acumedia, Baltimore, MD)

- 6) Gélose mHC ou gélose TCCSMAC (voir MFLP-80)
- 7) Solution tampon de phosphate de Butterfield (Fisher Scientific) ou eau peptonée 0,1%
- 8) Incubateurs capables de maintenir une température de 36 ° C
- 9) 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 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 35 +/-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.

- 10) « Stomacher » Colworth 400, ou l'équivalent
- 11) Sacs « Stomacher »
- 12) Micropipette (200 µl) et embouts stériles
- 13) 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 Reveal de 8 h maintenu à 42 °C, voir 9.1.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié.

### 7.3 Préparation de l'échantillon

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.

#### **7.4 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 Reveal de 8 h, de la façon indiquée au tableau 1. Agiter au « Stomacher » 2 minutes à vitesse normale ou vigoureusement manuellement.
- 7.4.2 Incuber 8 h à 42 °C. Le sac « Stomacher » doit être fermé de façon à permettre un échange d'air pour permettre une croissance optimale.

#### **7.5 Étape de chauffage**

- 7.5.1 Après la période d'incubation, fermer hermétiquement le sac « Stomacher » et mélanger doucement le contenu.
- 7.5.2 Transférer aseptiquement dans un tube de verre approximativement 5,0 ml du bouillon de culture. Placer le tube dans l'eau bouillante durant 10 minutes. Pour un tube de polypropylène le temps de chauffage est de 20 minutes. Retirer et laisser refroidir à température de la pièce.

#### **7.6 Préparation et inoculation de l'unité d'essai**

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

#### **7.7 Inoculation**

- 7.7.1 Ne pas agiter le tube afin que les particules qu'il pourrait contenir restent au fond.
- 7.7.2 Pipetter de façon aseptique 120 µl de l'échantillon en prenant soin d'éviter les particules.
- 7.7.3 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.

#### **7.8 Incubation**

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

#### **7.9 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.

#### **7.10 Isolement sélectif**

- 7.10.1 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.
- 7.10.2 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%.
- 7.10.3 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).
- 7.10.4 Incuber les géloses CH pendant 24 heures à 42 °C et incuber les géloses BCM à 36°C.
- 7.10.5 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.
- 7.10.6 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 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 Ability of Reveal 8 for *E. Coli* O157:H7 to Recover and Detect *Escherichia coli* O157:H7 in Selected Foods in Only Eight Hours as Compared to BAM Culture Method. JAOAC. Présenté pour publication.

## 9. PRÉPARATION DES MILIEUX

### 9.1 Milieu Reveal de 8 heures

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Une bouteille de milieu |        |
| Eau stérile             | 225 mL |

Mélanger une bouteille de milieu Reveal 8 heures avec 225mL d'eau stérile à 42 °C dans un contenant stérile et maintenir à 42 °C jusqu'à l'utilisation. Le milieu doit être préférablement préparé juste avant l'utilisation, il doit être utilisé en deçà de 6 heures après sa préparation.

### 9.2 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.

### 9.3 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.

### 9.4 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   |

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

### 9.5 Autres géloses et tampons

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

**Tableau 1. Procédures d'enrichissement**

| <b>Type d'échantillon</b>       | <b>Unité d'échantillonnage (minimum)</b> | <b>Préparation de l'unité analytique</b>  |
|---------------------------------|--|---|
| Bœuf cru (cubes et haché, etc.) | 25 g                                     | Peser 25 g dans un sac «Stomacher» stérile, ajouter 225 mL de milieu Reveal de 8 h.                                   |
| Échantillons environnementaux   | Un échantillon                           | Transférer de façon aseptique un échantillon dans un sac «stomacher» stérile, ajouter 225 mL de milieu Reveal de 8 h. |

**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<br>Réaction négative : aucune pigmentation   | Négative                           |
| Sorbitol de MacConkey                                 | Fermentation du Sorbitol | Réaction positive : colonies rose vif<br>Réaction négative : colonies pâles   | Négative                           |
| Coli hémorragique (CH)                                | Réaction au MUG          | Réaction positive : colonies bleu-blanc ou blanc sous lumière fluorescente<br>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.<br>Réaction négative : le bouillon demeure violet.   | Négative                           |
| Gélose à la lysine de fer                             | Lysine décarboxylase     | Réaction positive : le culot vire au violet.<br>Réaction négative : culot jaune   | Positive                           |
| Gélose au citrate de Simmon                           | Utilisation du citrate   | Réaction positive : croissance et couleur qui vire du vert au bleu.<br>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<br>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<br>VP négative : produit une couleur brune<br>RM positif : produit une couleur rouge<br>RM négatif : produit une couleur jaune | VP négative<br>MR positive         |
| Agglutination en tube                                 | Agglutination            | Réaction positive : agglutination<br>Réaction négative : aucune agglutination   |                                    |