



**DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ**

**OTTAWA**

**MÉTHODE DE DÉTECTION D'ESCHERICHIA COLI PRODUCTEURS DE  
VÉROCYTOTOXINES DANS DES ÉCHANTILLONS D'ALIMENTS**

**Elroy D. Mann**

**Direction générale de la production et de l'inspection des aliments  
Laboratoire d'hygiène vétérinaire  
Guelph (Ontario) N1G 3W4**

**1. Application**

Cette méthode est applicable à l'analyse d'échantillons alimentaires, environnementaux et fécaux pour dépister la présence d'*Escherichia coli* (*E. coli*) capables de produire des vérocytotoxines. Les *E. coli* producteurs de vérocytotoxines (VT) - (VTEC) produisent des cytotoxines toxiques pour les cellules Vero (cellules hépatiques du singe vert africain). Ces organismes sont reconnus comme les agents du syndrome urémique hémolytique (SUH) et de la colite hémorragique (CH) chez les humains (3.2, 3.6). L'*E. Coli* 0157:H7 est l'agent pathogène le plus répandu chez les humains, mais on a établi un lien entre beaucoup d'autres sérotypes de VTEC et des maladies chez les humains (3.2, 3.5).

Cette méthode sert principalement de méthode de référence pour les laboratoires qui ont les installations et la capacité nécessaires pour gérer des procédures de culture cellulaire. Pour lire les résultats de l'analyse, il faut une formation spécialisée et de l'expérience. Cette analyse ne doit être entreprise que par des laboratoires qui attendent un volume suffisant d'analyses pour disposer d'employés capables de maintenir leurs compétences (3.1). Pour obtenir plus de renseignements au sujet de cette analyse, veuillez communiquer avec le D' Elroy Mann au LHV de Guelph (1.1). Lorsqu'on a besoin de telles analyses, il faut communiquer avec un des laboratoires suivants :

- 1.1 D' Elroy Mann  
Laboratoire d'hygiène vétérinaire  
110, chemin Stone ouest  
Guelph (Ontario) N1G 3W4  
Téléphone : 519-822-3300  
Télécopieur : 519-822-2280

- 1.2 D<sup>r</sup> Marie-Josée Champagne  
Laboratoire d'hygiène vétérinaire  
3400, boul. Casavant ouest  
Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 8E3  
Téléphone : 514-773-7730  
Télécopieur : 514-773-8152
- 1.3 M<sup>me</sup> Shirley Toms  
Division des services de laboratoire - Laboratoire de l'Ouest  
3650 - 36<sup>e</sup> Rue n.-o.  
Calgary (Alberta) T2L 2L1  
Téléphone : (403) 289-7021 (poste 123)  
Télécopieur : (403) 221-3293

## 2. Principe

Ce protocole décrit le dosage sur lignées cellulaires vero (VCA), analyse qui permet de détecter la présence de VTEC dans des échantillons en démontrant les effets de leurs toxines sur des cultures en couches monocellulaires de cellules vero (3.3, 3.4, 3.7). La sensibilité de cette méthode sensible qui comporte l'utilisation de cellules vero fraîchement trypsinisées peut toutefois varier au jour le jour.

Les liquides surnageants clarifiés provenant des cultures sur de bouillon d'enrichissement sont dilués dans une proportion de 1:5 (1/5 à 1/125) sur des plaques à microtitrer et l'on ajoute aux cupules des microplaques un nombre connu de cellules vero. Après avoir laissé incuber pendant deux jours pour permettre la croissance des cellules vero, on examine au microscope les plaques à microtitrer. On considère la mort des cellules vero comme une indication présomptive de la présence de verocytotoxines (VT) dans les liquides surnageants. L'activité cytotoxique des échantillons positifs est classée selon la dilution la plus élevée à laquelle l'effet cytotoxique est évident. On traite ensuite les échantillons positifs pour isoler le VTEC. Les isolats positifs pour le VT sont alors biotypés, sérotypés et génotypés. Cette méthode est fondée sur celle qu'ont utilisée Read *et al* (3.3) et Clarke *et al* (3.7).

D'autres micro-organismes peuvent produire des toxines qui n'ont aucun lien avec les VT mais qui sont toxiques pour les cellules vero. Il se peut donc que la cytotoxicité évidente dans certains échantillons (jusqu'à 20 %) analysés ne soit pas attribuable aux VT (3.3, 3.7). Afin d'éviter de traiter inutilement des échantillons faussement positifs, on peut ajouter une étape facultative pour distinguer ces résultats de ceux d'échantillons véritablement positifs pour les VT. Dans les analyses de dépistage, on prépare une dilution supplémentaire de 1/5 de chaque échantillon dans un diluant contenant des anticorps qui neutralisent les deux types antigéniques de verocytotoxines (VT1 et VT2). Lorsqu'on lit les plaques, on compare les deux dilutions 1/5 de chaque échantillon. On considère qu'un échantillon donne un résultat positif quant à la présence de VT si sa cytotoxicité est neutralisée en grande partie ou complètement par des anticorps anti-VT. Ces anticorps n'affectent pas la toxicité attribuable à d'autres toxines.

## 3. RÉFÉRENCES:

- 3.1 Mann, ED. 1995. Procedure for the Detection of Verocytotoxin producing *Escherichia coli* in raw and cooked meat samples. DANS : Food Safety Procedures Manual, Version 2.1, mars 1996, protocole officiel de la Direction de l'hygiène vétérinaire et de la défense des végétaux.
- 3.2 Karmali, MA. 1989. Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 2:15-38.
- 3.3 Read SC, Gyles CL, Clarke RC, Lior H et McEwen S. 1990. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork and chicken in southwestern Ontario. Epidemiol Infect 105:11-20.
- 3.4 Konowalchuk J, Speirs JI, Stravric S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun 18:775-779.

- 3.5 Johnson WM, Lior H, Bezanson GS. 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* 0157:H7 strains associated with hemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* i:702.
- 3.6 Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. 1985. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 151:775-782.
- 3.7 Clarke RC, McEwen SA, Gannon VP, Lior H, Gyles CL. 1989. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* from milk filters in south-western Ontario. *Epidemiol Infect* 192:253-260.
- 3.8 Freshney RI, 1987. *Culture of Animal Cells - A manual of Basic Technique*, Second Edition, Alan R. Liss, Inc. New York.