



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

**ANALYSE DES POUSES POUR LE DÉPISTAGE DES COLIFORMES, D'ESCHERICHIA COLI,  
ET DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE.**

**Don Warburton  
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments  
Repère postal : 2204A1  
Santé Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0L2  
Courriel. : Don\_Warburton@hc-sc.gc.ca**

**1. APPLICATION**

Cette méthode peut servir à détecter des bactéries viables (Coliformes, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) dans des pousses (luzerne, fèves, oignons, radis et autres produits de semences que l'on fait germer pour la consommation) pour déterminer s'ils sont conformes aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette méthode remplace toutes les versions précédentes qui datent avant septembre 1999.

**2. PRINCIPE**

La présence de coliformes dans un aliment indique habituellement qu'il a été produit dans des conditions non salubres. La présence de coliformes fécaux, et particulièrement de *E. coli*, indique habituellement que le produit peut être contaminé (après transformation) par des matières fécales. *K. Pneumoniae* est un pathogène opportunistique et peu être considéré comme indicateur de contamination fécales. Ce test comporte une technique de fermentation à éprouvettes multiples qui permet d'estimer le «nombre le plus probable» (NPP) de coliformes totaux, de coliformes fécaux et de *E. coli* si l'on procède de la façon décrite dans la méthode MFHPB-19. On ensemence sur une gélose sélective pour *Klebsiella* des aliquotes provenant de dilutions sérielles.

**3. DÉFINITIONS**

Voir l'annexe A du volume 3.

**4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS**

4.1 Voir l'annexe B du volume 3.

4.2 Chaque unité d'échantillonnage doit contenir au moins 100 g.

4.3 Garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-4°C).

## 5. MATÉRIEL ET FOURNITURES SPÉCIAUX

Les milieux suivants, qu'il faut préparer et stériliser conformément aux instructions du fabricant ou à celles qui figurent dans la méthode MFHPB-19 :

- 1) Diluant à l'eau peptonée (0,1 %) (disponible sur le marché).
- 2) Bouillon tryptosé au sulfate de lauryl (LST) (disponible sur le marché).
- 3) Bouillon bilié vert brillant et au lactose à 2 % (BGLB) (disponible sur le marché).
- 4) Bouillon d'*Escherichia coli* (EC) (disponible sur le marché).
- 5) Gélose à l'éosine et au bleu de méthylène (L-EMB) ou gélose endo (disponible sur le marché).
- 6) Gélose nutritive (GN) (disponible sur le marché).
- 7) Milieu IMViC :
  - a. Bouillon de tryptone (disponible sur le marché),
  - b. Bouillon de glucose tamponné (disponible sur le marché),
  - c. Gélose de citrate de Simmon (SC) (disponible sur le marché),Le choix d'autres méthodes d'identification (7.5.17) peut obliger à utiliser d'autres milieux.
- 8) Gélose sélective pour *Klebsiella*.
- 9) Bain-marie recouvert et doté d'un système de circulation afin de maintenir la température à 45,0°C. Le niveau de l'eau devrait dépasser celui du milieu contenu dans les éprouvettes immergées.
- 10) Thermomètre de 1 à 100°C, avec subdivisions de 0,1°, étalonné et homologué par le Conseil national de recherches du Canada (CNRC), le National Bureau of Standards, ou l'équivalent.
- 11) Incubateur, 44,5°C.
- 12) Stomacher Colworth 400, mélangeur ou l'équivalent.

**NOTE :** Il incombe à chaque laboratoire de veiller à ce que la température des incubateurs ou des bains-marie soit maintenue au degré recommandé. Lorsque l'on recommande 35°C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 36 +/- 1,0° C. De même, une température moindre, soit de 30 ou 25, 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 microorganisme que l'on cherche à isoler.

## 6. MARCHE À SUIVRE

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement. On peut aussi combiner les unités d'analyse lorsqu'il est possible de satisfaire aux exigences du plan d'échantillonnage applicable. Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes :

### 6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 6.1.1 Avant de procéder à l'analyse au laboratoire, sauf dans le cas des aliments de longue conservation, il faut garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-4°C).
- 6.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage aussitôt que possible après les avoir reçues au laboratoire.

### 6.2 Préparation pour l'analyse

- 6.2.1 Avoir à portée de la main de l'eau peptonée stérile et les autres géloses et bouillons nécessaires (voir MFHPB-19), ainsi que la gélose sélective pour *Klebsiella*.

6.2.2 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié.

### 6.3 Préparation de l'échantillon

6.3.1 Vérifier le pH de la suspension d'aliments. Si le pH se situe en dehors de la fourchette de 5,5 à 7,6, il faut le ramener à 7,0 avec du NaOH ou du HCl stérile.

6.3.2 Préparer les dilutions décimales successives nécessaires en utilisant une pipette stérile distincte pour effectuer chaque transfert.

6.3.3 Agiter ou faire tourbillonner toutes les dilutions (7.3.2) immédiatement avant d'effectuer les transferts afin que les microorganismes présents soient distribués uniformément.

### 6.4 Analyse

6.4.1 Terminer l'analyse de dépistage des coliformes. Pour les coliformes fécaux et *E. coli*, suivre la procédure NPP décrite dans la méthode MFHPB-19.

6.4.2 À partir de chaque dilution sérielle, ensemercer 0,1 ml sur une gélose sélective pour *Klebsiella*, incuber les bôîtes de gélose à 44.5°C de 24h à 48h.

6.4.3 Utiliser des souches typiques de *E. coli* et de *K. pneumoniae* (souche ATCC ou l'équivalent) comme témoins.

### 6.5 Confirmation

6.5.1 Suivre la méthode MFHPB-19 pour confirmer la présence de coliformes, de coliformes fécaux et de *E. coli*.

6.5.2 On peut confirmer la présence de colonies typiques de *K. pneumoniae* (habituellement d'un orange brillant et gros) en utilisant les milieux énumérés au Tableau 1. Il est recommandé d'ensemencer des colonies suspectes sur des pentes de gélose à l'urée de Christensen ou dans des trousse d'identification rapide pour *Entérobactéries*.

## 7. Références

7.1 R.M. Atlas. 1993. Handbook of Microbiological Media. (éd. L.C. Parks) CRC Press. Londres.

7.2 R. Shinebaum and E.M. Cooke. 1985. Isolation and Identification of Microorganisms of medical and Veterinary Importance. Society of Applied Bacteriology. Pp. 35-38.

7.3 A.D. Hitchins, P.A. Hartman and E.C.D. Todd. Coliforms- *Escherichia coli* and its toxins Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd Edition. P. 328.

## 8. PRÉPARATION DES MILIEUX

Suivre les instructions du fabricant des géloses et des bouillons.

8.1 Préparer tous les milieux (géloses, bouillons et réactifs) énumérés dans la méthode MFHPB-19.

8.2 Gélose sélective pour *Klebsiella*

(composition au litre)

Gélose	15 g
DL-Phénylalanine	10,0 g
L-Ornithine-HCL	10,0 g
Raffinose	7,0 g
Caséine digérée par sucs pancréatiques	2,5 g
Extrait de levure	2,5 g
K <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	2,0 g
Solution de rouge de phénol	10,0 ml
Solution de carbénicilline	10,0 ml

pH 5,6± 0,2 à 25°C

Solution de rouge de phénol :

Ajouter 0,5 g de rouge de phénol à de l'éthanol à 50 % et porter volume à 10,0 ml.  
Mélanger soigneusement.

Solution de carbénicilline :

Ajouter 0,05 g de carbénicilline dans de l'eau distillée et porter le volume à 10,0 ml.  
Stériliser par filtration.

Préparation des milieux :

Ajouter les éléments constitutants, sauf la solution de carbénicilline, à 990 ml d'eau distillée. Mélanger soigneusement. Chauffer doucement et porter à ébullition. Autoclaver pendant 15 min. Laisser refroidir à 45-50°C. Ajouter de façon aseptique 10,0 ml de solution de carbénicilline. Mélanger soigneusement. Porter le pH à 5,6 à 5,7 avec du HCl 1 N. Verser dans des boîtes de Pétri stériles.

Tableau 1. Épreuves biochimiques déterminantes pour *Entérobactéries*.

Bactérie	Urée	Motilité	Test à l'Indole	Croissance sur Citrate	Gélose aux trois sucres et au fer (TSI)	Gélose lysine-fer (LIA)	Croissance à 44.5°C sur gélose KSA
<i>Klebsiella</i>	+	-	-	+	A/A gaz	K/K	oui
<i>Enterobacter</i>	-	+	-	+	A/A pas de gaz	K/K	non
<i>E. coli</i>	-	+	+	-	K ou A/A gaz	K/K	non
<i>Citrobacter</i>	-	+	+/-	+	K/? H <sub>2</sub> S	K/A	non

***Espèces Klebsiella***

**Croissance à 44.5°C**

<i>K. pneumoniae</i>	oui
<i>K. oxytoca</i>	non
<i>K. terrigena</i>	non
<i>K. planticola</i>	non
<i>K. ozaenae</i>	à déterminer
Autres	à déterminer