



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

DÉNOMBREMENT D'*AEROMONAS HYDROPHILA* DANS LA  
GLACE ET L'EAU CONSERVÉES DANS DES CONTENANTS  
HERMÉTIQUES PAR LA MÉTHODE DE LA MEMBRANE  
FILTRANTE QUADRILLÉE HYDROPHOBE (MFQH)

Don Warburton

Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments

Repère Postal: 2204A1

Santé Canada, Ottawa ON K1A 0L2

Courrier électronique: Don\_Warburton@hc-sc.gc.ca

**1. APPLICATION**

La présente méthode s'applique à la numération des *Aeromonas hydrophila* viables dans la glace et l'eau conservées dans des contenants hermétiques (y compris l'eau minérale et l'eau de source) pour voir si ces produits sont conformes aux articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*. Cette méthode remplace MFLP-58B datée de mars 1993.

**2. PRINCIPE**

La méthode de la membrane filtrante quadrillée hydrophobe (MFQH) est fondée sur la méthode de Rippey et Cabelli (7.1), modifiée par Warburton et coll. (7.3). Une seule dilution permet de mesurer exactement une gamme étendue de degrés de contamination. Les dénombrements obtenus avec la MFQH sont plus précis que ceux obtenus avec les boîtes ou les membranes filtrantes classiques (7.2). Cette méthode permet de détecter en tant qu'*Aeromonas hydrophila* des organismes tréhalose + et mannitol+, oxydase + et hémolytiques. On emploie des géloses sélectives et différentielles pour aider à l'isolement et à l'identification. On peut confirmer l'identification au moyen de trousse d'identification vendues dans le commerce et par des réactions biochimiques.

**3. DÉFINITION DES TERMES**

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 500 mL de produit.

4.3 Pendant le transport, il faut conserver les unités d'échantillonnage réfrigérées à une température comprise entre 0 °C et 4 °C.

**5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL**

1) MFQH (1 600 mailles, pores de 0,45 µm) (ISO-GRID®; vendues par Oxoid Inc., Ottawa, ON) ou l'équivalent

- 2) Pincés à membrane filtrante (Millipore Corp.)
- 3) Gélose mA-tréhalose (MAT)
- 4) Gélose mA-mannitol (MAM) ou bouillon rouge phenol avec mannitol
- 5) Milieu de culture pour *Aeromonas* (AM; Oxoid Inc., Ottawa, ON) ou l'équivalent
- 6) Gélose trypticase soya (TSA) (en vente dans le commerce)
- 7) Gélose au sang (en vente dans le commerce)
- 8) Gélose pour étude de la mobilité des bactéries (en vente dans le commerce)
- 9) Réactifs pour la recherche de l'oxydase (en vente dans le commerce)
- 10) Appareil de filtration et entonnoir (modèle MF-10, vendu par Richard Brancker Research Ltd., Ottawa, ON) ou appareil de filtration ISO-GRID® (vendu par Oxoid Inc., Ottawa, ON) ou l'équivalent.
- 11) Incubateur pouvant maintenir une température de 35 °C.

**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-maries 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. **MODE OPÉRATOIRE**

Analyser les unités d'échantillonnage individuellement ou après les avoir mélangées. Effectuer l'épreuve conformément aux instructions suivantes :

### 6.1 **Manipulation des unités d'échantillonnage**

- 6.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder toutes les unités d'échantillonnage réfrigérées à une température comprise entre 0 °C et 4 °C.
- 6.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus rapidement possible après leur arrivée au laboratoire.

### 6.2 **Préparatifs**

- 6.2.1 Avoir à sa disposition des géloses stériles de Trypticase Soja (TSA), des géloses stériles de mA-tréhalose (MAT) et des milieux de culture stériles pour *Aeromonas* (AM).
- 6.2.2 Nettoyer l'aire de travail avec un désinfectant approprié.
- 6.2.3 Marquer clairement les boîtes de Pétri en y indiquant l'information d'identification appropriée.
- 6.2.4 La méthode MFQH permet d'effectuer des dénombrements dans des suspensions renfermant jusqu'à 5 000 organismes par mL. Il ne devrait pas être nécessaire de préparer des dilutions supplémentaires.

### **6.3 Filtration**

- 6.3.1 Agiter tous les échantillons pour remettre en suspension les matières qui pourraient s'être déposées.
- 6.3.2 Manipuler la MFQH avec des pinces à membrane filtrante stériles.
- 6.3.3 Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation de l'appareil de filtration et y verser 100 mL de l'unité d'analyse. Ouvrir le robinet du filtre, laisser tout le liquide s'écouler et retirer aseptiquement la MFQH. Réaliser cette étape en double.
- 6.3.4 Suivre les instructions du fabricant pour le nettoyage de l'appareil.

### **6.4 Ensemencement et incubation**

- 6.4.1 Déposer la MFQH sur la surface d'une gélose TSA en la roulant de manière à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les géloses à l'endroit (en prenant soin de ne pas empiler plus de trois boîtes) à 35 °C pendant 4 heures. Après 4 heures, transférer une MFQH sur une gélose MAT et l'autre sur une gélose pour AM. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures.
- 6.4.2 Il est recommandé de toujours employer une culture d'*Aeromonas hydrophila* comme témoin positif et une culture d'organismes d'un autre genre (par ex., *Escherichia coli*) comme témoin négatif.

### **6.5 Ensemencement et dénombrement sur les MFQH**

- 6.5.1 S'il n'y a aucune croissance dans les MFQH, noter que le résultat du test est <1/100mL.
- 6.5.2 Compter et noter les résultats présomptifs. La coloration jaune apparaissant à l'intérieur des mailles de la MFQH sur la gélose MAT est causée par la présence de micro-organismes tréhalose+. Faire un test de confirmation sur ces colonies jaunes. Faire aussi un test de confirmation sur les colonies vert foncé sur la gélose AM. Poursuivre selon les instructions données ci-dessous.

### **6.6 Confirmation**

Les épreuves suivantes peuvent être fait en utilisant des épreuves biochimique classiques ou des troupes d'identification.

#### **6.6.1 Mannitol**

Ensemencés un minimum de cinq colonies de chaque filtre sur du gélose MAM ou dans des tubes de bouillon derouge de phénol avec mannitol. Incubé à 35° C pour 18-24 h. Continuer les épreuves biochimique sur les microorganisme tréhalose+ et mannitol+.

#### **6.6.2 Oxydase**

Effectuer un test pour la recherche de l'oxydase sur les colonies présumées au moyen de réactifs vendus dans le commerce.

- 6.6.3 Les isolats qui sont tréhalose+, mannitol+ et oxydase+ sont ensemencés en stries ou en piqûres sur de la gélose au sang. Ensemencer également de la gélose pour l'étude de la mobilité des bactéries. Les isolats qui présentent une mobilité et qui sont tréhalose+, mannitol+, oxydase+ et hémolytiques peuvent être considérés comme étant *A. hydrophila*.

### **6.7 Nouvelle confirmation**

- 6.7.1 On peut pratiquer d'autres tests biochimiques classiques,ou faire appel à des troupes d'identification (comme le VITEK).

### **6.8 Calcul du nombre le plus probable d'*A. hydrophila***

- 6.8.1 Déterminer le nombre le plus probable des colonies (NPPC). Suivre les instructions du fabricant. Voir l'Annexe C du Volume 3 qui donne des exemples de calcul.

## 6.9 Présentation des résultats

Voir l'Annexe C du Volume 3.

## 7. RÉFÉRENCES

- 7.1 Rippey, S.R. et V.J. Cabelli, 1979. Membrane filter procedure for enumeration of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters. Appl. Environ. Microbiol. **38**(1): 108-113.
- 7.2 Sharpe, A.N. et P.I. Peterkin. 1988. Membrane filter food microbiology. Research Studies Press, Taunton, Somerset, U.K.
- 7.3 Warburton, D.W., J.K. McCormick and B. Bowen. 1994. Survival and recovery of *Aeromonas hydrophila* in water: development of methodology for testing bottled water in Canada. Can. J. Microbiol. **40**: 145-148.

## 8. PRÉPARATION DES MILIEUX

- 8.1 Lorsqu'on utilise la stérilisation par la vapeur, il est essentiel d'accorder un temps suffisant pour que la charge atteigne la température requise avant que la stérilisation proprement dite commence. Cette période varie selon la nature et l'importance de la charge. On doit donc respecter les temps d'exposition pour s'assurer de la stérilité des solutions en flacons et des milieux de culture thermostables. Se référer au mode d'emploi du stérilisateur.

### 8.2 Gélose mA-tréhalose (MAT)

Tryptone	5,0 g
Tréhalose	5,0 g
Extrait de levure	2,0 g
NaCl	3,0 g
KCl	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g
Bleu de bromothymol	0,04 g
Gélose	15,0 g
Eau distillée	1 L

Dissoudre à température ambiante, ajuster le pH à 8,0, ajouter 15,0 g de gélose et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Laisser refroidir et ajouter 1,0 mL d'éthanol, 20 mg d'ampicilline et 100 mg de désoxycholate de sodium. Bien mélanger et couler dans des boîtes de Pétri. Ce milieu se conserve pendant 8 semaines à une température de 4 °C.

### 8.3 Gélose mA-mannitol (MAM)

Tryptone	5,0 g
Mannitol	5,0 g
Extrait de levure	2,0 g
NaCl	3,0 g
KCl	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g
Bleu de bromothymol	0,08 g
Gélose	15,0 g
Eau distillée	1 L

Dissoudre à température ambiante, ajuster le pH à 8,0, ajouter 15 g de gélose et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Laisser refroidir et ajouter 100 mg de désoxycholate de sodium. Bien mélanger et couler dans des boîtes de Pétri. Ce milieu se conserve à 4 °C pendant 2 mois.

### 8.4 BOUILLON DE ROUGE DE PHÉNOL AVEC MANNITOL

Trypticase ou proteose peptone no.3	10 g
Sodium chloride	5 g
Beef extract (si desirer)	1 g
Rouge de phénol (solution 0,25% de Rouge de phénol)	7,2 g
Eau distillé	1000 mL

Dissoudre 5 g de mannitol dans ce bouillon de base. Dispensez des portion de 2,5 mL dans des tube 13x100 mm qui contien des tubes de fermentation (6x50 mm) inversé. Sterilizer à l'autoclave pour 10 min à 118° C; le pH final, 7,3± 0,2.