



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**DÉNOMBREMENT DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DANS LES ALIMENTS
ET LES INGRÉDIENTS ALIMENTAIRES PAR LA MÉTHODE
DE LA MEMBRANE FILTRANTE QUADRILLÉE HYDROPHOBE (MFQH)**

**Don Warburton
Bureau de dangers microbiens, Direction des Aliments
Repère postale : 2204A1
Santé Canada, Ottawa ON K1A 0L2**

Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

La méthode est applicable au dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les aliments et les ingrédients alimentaires dans le cadre des activités de vérification de la conformité à l'égard des articles 4 et 7 de la Loi des aliments et drogues. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-61, datée de septembre 1992.

2. PRINCIPE

La méthode de la membrane filtrante quadrillée hydrophobe (MFQH) fait appel à des milieux disponibles commercialement, telle que modifiés par Warburton *et al* (7.3). Une seule dilution suffit pour une gamme étendue de degrés de contamination. La précision du dénombrement peut être meilleure avec la MFQH qu'avec les membranes filtrantes classiques (7.2). Une identification complémentaire peut être faite à l'aide de trousse d'identification disponibles commercialement et des réactions biochimiques.

3. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'Annexe B 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 réfrigérées (0-4°C) pendant le transport.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux suivants et leurs suppléments (1 à 8) sont disponibles commercialement et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Les fournisseurs listés sont indiqués à titre de

guide ; d'autres sources peuvent être utilisées. Consulter également l'Annexe G du Volume 3 et la référence 7.1 pour la formulation des milieux de culture.

Géloses sélectives pour *Pseudomonas aeruginosa* : il est suggéré que deux des géloses suivantes (ou l'équivalent) soient utilisées.

- 1) Gélose mPAC (disponible chez BD Biosciences, Oakville, Ontario et Les laboratoires Quelab, Montréal, Québec)
- 2) Gélose au cétrimide
- 3) Gélose Pseudomonas-CN (disponible chez Oxoid Ltée, Nepean, Ontario)
- 4) Gélose Pseudomonas-CFC (disponible chez Oxoid Ltée)
- 5) Gélose King (disponible chez Merck par VWR Canlab, Montréal, Québec)

Autre matériel :

- 6) Gélose tryptique soja (TSA)
- 7) Diluant à l'eau peptonée 0,1% (EP) ou diluant Peptone/Tween 80 (PT) (Annexe G du Volume 3)
- 8) Solutions enzymatiques (Annexe E du Volume 3) lorsque requises pour certains types de produits alimentaires.
- 9) Gélose au lait (utiliser la formulation de l'Annexe G du Volume 3)
- 10) MFQH (1600 mailles, pores de 0,45 μm ; disponible sous le nom de membrane filtrante ISO-GRID chez Oxoid Ltée) ou l'équivalent
- 11) Pince à membrane filtrante
- 12) Appareil de filtration avec entonnoir (Filtaflex Ltée, Almonte, Ontario) ou unité de filtration ISO-GRID (Oxoid Ltée) ou l'équivalent
- 13) Cultures contrôles (utiliser des cultures ATCC ou l'équivalent)

Contrôle positif : *P. aeruginosa*
Contrôle négatif : *Escherichia coli*
- 14) Incubateurs pouvant maintenir une température entre 30- 35°C et de 42°C

NOTE : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie soient maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 35 +/-1,0 °C. De même, des températures plus basses de 30° ou 25° peuvent être à +/-1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à +/-0,5 °C de variation. Une température plus élevée peut être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

- 15) Compteur de colonies manuel ou automatique (optionnel)
- 16) Mélangeur Stomacher, mixeur ou l'équivalent

6. MARCHE À SUIVRE

Les unités d'analyse peuvent être analysées individuellement ou regroupées en composite. Effectuer l'analyse 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 (0-4°C) ou congelées selon la nature de l'échantillon.
- 6.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage aussitôt que possible après leur réception au laboratoire.

6.2 Préparation pour l'analyse

- 6.2.1 Avoir à sa disposition des boîtes stériles de gélose tryptique soja (TSA) et de géloses sélectives (mPAC ou l'équivalent).
- 6.2.2 Avoir à portée de main du diluant à l'eau peptonée (PE), du diluant peptone/tween 80 (PT) ou du diluant citrate de sodium 2% (voir tableau 1) et si nécessaire, les solutions enzymatiques requises selon le type de produit alimentaire (Voir Annexe E du Volume 3). Les solutions enzymatiques ne sont nécessaires que pour la filtration des solutions de dilution 10^{-1} . Utiliser le diluant PT lorsqu'on utilise un appareil de filtration.
- 6.2.3 Nettoyer l'aire de travail avec un désinfectant approprié.
- 6.2.4 Marquer clairement les géloses de TSA (essais en double) et les géloses sélectives avec les informations d'identification appropriées.

6.3 Préparation des dilutions

- 6.3.1 Pour s'assurer que l'unité d'analyse est vraiment représentative, agiter les liquides et les substances fluides jusqu'à homogénéité ; si l'unité d'échantillonnage est un solide, constituer l'unité d'analyse en faisant plusieurs prélèvements à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.
- 6.3.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en ajoutant, dans des conditions aseptiques, 25g ou ml (l'unité d'analyse) à 225 ml du diluant requis, tel qu'indiqué au tableau 1. Si la taille de l'échantillon utilisé est autre que 25 g ou ml, maintenir le ratio de dilution 1:10, tel que 11(10)g ou ml à 99(90)ml. Il est préférable d'utiliser un mélangeur "stomacher" pour mettre les organismes en suspension, car il réduit au minimum la quantité de débris alimentaire en suspension. Transférer une portion représentative de la dilution 1:10 pour faire des dilutions en série au besoin.

NOTE : Le poids ou volume indiqué entre parenthèse indique une procédure alternative pour la préparation des dilution.

- 6.3.2.1 Mélanger au "Stomacher" ou au mixeur ou agiter pendant une minute. On empêche la formation de mousse dans le "Stomacher" en glissant le sac sur le bord des parois de l'appareil de façon à chasser tout l'air.
- 6.3.2.2 S'il faut mélanger la dilution 1:10 en l'agitant, agiter la bouteille de dilution 25 fois en effectuant des arcs de 30 cm pendant environ 7 secondes.

- 6.3.3 La filtration par la méthode MFQH élimine les acides ou les autres inhibiteurs ; il n'est donc pas nécessaire de vérifier et d'ajuster le pH de la suspension.
- 6.3.4 La méthode MFQH permet d'effectuer des dénombrements de suspensions renfermant jusqu'à 5000 organismes par ml. Au besoin, préparer des dilutions décimales successives en utilisant une pipette stérile distincte pour chaque dilution. Consigner la dilution (C) utilisée pour l'analyse.
- 6.3.5 Lorsqu'on s'attend à une numération faible, filtrer plus de 1,0 ml de la suspension. Filtrer le volume total qui doit être filtré en une seule opération. Ne pas essayer de filtrer des portions successives de 1 ml. Consigner le volume (V) filtré.
- 6.3.6 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant d'effectuer le transfert afin d'assurer une distribution uniforme des microorganismes présents.

6.4 Filtration

- 6.4.1 Agiter chaque sac de "Stomacher", jarre pour mixeur ou bouteille de dilution pour remettre en suspension les matières qui pourraient s'y être déposées.
- 6.4.2 Manipuler la MFQH avec des pinces stériles.
- 6.4.3 Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation de l'appareil de filtration, aseptiquement, pipetter 1,0 ml de la dilution requise et ensemercer la MFQH. Ouvrir le robinet de l'appareil de filtration, laisser tout le liquide s'écouler et retirer aseptiquement la membrane. Réaliser cette étape en double.
- 6.4.4 Il est recommandé d'utiliser une culture connue de *P. aeruginosa* comme contrôle positif et des organismes d'un autre genre (par ex., *Escherichia coli*) comme contrôle négatif. Préparer des dilutions appropriées du contrôle positif et négatif et filtrer tel que décrit ci-dessus.
- 6.4.5 Suivre les instructions du fabricant pour le nettoyage de l'appareil de filtration.
- 6.4.6 Répéter au besoin avec d'autres dilutions.

6.5 Ensemencement et incubation

- 6.5.1 Transférer 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 35°C pendant 4 h. en prenant soin de ne pas empiler plus de trois boîtes. Après 4 heures, transférer une MFQH sur une gélose mPAC (ou l'équivalent) et la deuxième MFQH sur une autre gélose sélective. Incuber les géloses mPAC à 42°C pendant 24-48 h. Les autres géloses sélectives peuvent être incubées à des températures inférieures, suivre les instructions du fabricant.
- 6.5.2 Colonies typiques
 - mPAC** - les colonies de *P. aeruginosa* ont une coloration tan à brun foncé avec un centre brun foncé.
 - Cetrimide** - les colonies de *P. aeruginosa* ont une coloration bleue, bleu-vert ou jaune-vert et peuvent être fluorescentes.
 - Pseudomonas-CN** - les colonies de *Pseudomonas* spp ont une coloration bleu-vert ou brune et peuvent être fluorescentes.

Pseudomonas-CFC- les colonies de *Pseudomonas* spp ont une coloration bleu-vert ou brune et peuvent être fluorescentes.

Gélose King - les colonies de *Pseudomonas* spp ont une coloration jaune-vert et peuvent être fluorescentes.

Suivre les directives du fabricant pour la sélection des colonies présumées de *P. aeruginosa* à partir d'autres géloses sélectives

6.6 Numération des MFQH

Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation des compteurs manuels ou automatiques. Les colonies typiques dans les mailles de la MFQH sont des *P. aeruginosa* présumés. Dépister et confirmer tel que décrit ci-après (6.7-6.8). La méthode MFQH permet d'obtenir des numérations précises dans une gamme plus étendue qu'avec la méthode en boîtes de Pétri. Compter uniquement les MFQH contenant de 20 à 1 580 mailles occupées.

- 6.6.1 Compter 1 (un) pour chaque maille démontrant une croissance typique. (NE PAS compter les colonies individuelles si une maille renferme plus d'une colonie typique). Si une estimation sommaire indique qu'il y a moins de 200 mailles occupées, compter toute la MFQH.
- 6.6.2 Lorsque la densité des colonies est plus élevée (soit jusqu'à 50 % des mailles occupées), tourner la MFQH jusqu'à ce que l'indicateur de centre soit dirigé à gauche ou à droite. Compter les mailles positives dans les 4 rangées situées immédiatement sous le centre et dans les 4 rangées situées immédiatement au-dessus du centre (8 rangées). Multiplier le résultat de la numération partielle par 5 pour estimer la valeur de la MFQH.
- 6.6.3 Si la MFQH est tellement remplie qu'il semble plus facile de compter les mailles négatives, procéder de cette manière. Soustraire le nombre obtenu de 1600 ou de 320, selon que la numération a porté sur toute la MFQH ou seulement sur son cinquième. Dans ce dernier cas, multiplier le chiffre obtenu par 5 pour obtenir la valeur de la MFQH.
- 6.6.4 Lorsque toutes les mailles de la MFQH sont occupées par des colonies typiques, noter que les colonies sont trop nombreuses pour être comptées (TNTC).
- 6.6.5 Noter les valeurs de la MFQH des deux essais en double. Si aucune maille ne démontre une croissance typique de *Pseudomonas*, inscrire la valeur < 0,5 par gramme ou ml.

6.7 Dépistage

Cette étape est optionnelle. Ensemencer sur des géloses au lait 5 des colonies présumées de *P. aeruginosa* provenant de chacune des géloses sélectives. Faire une strie unique d'environ 4 cm de long et incubé à 35°C pendant 24 h. *P. aeruginosa* hydrolyse la caséine et produit un pigment diffusible de couleur jaunâtre ou verte.

6.7 Confirmation

D'autres tests biochimiques conventionnels (i.e. oxidase) ou des systèmes d'identification rapide (ex : Vitek) peuvent être utilisés.

6.8 Calcul du nombre le plus probable de *P. aeruginosa*

Voir l'Annexe C du Volume 3.

7. RÉFÉRENCES

- 7.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 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., B Bowen and A. Konkle. 1994. The survival and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* and its effect upon salmonellae in water: methodology to test bottled water in Canada. *Can. J. Microbiol.* 40:145-148.

Tableau I

Type d'aliment	Préparation	Traitement
<u>Liquides:</u>		
lait, eau etc.	pipetter directement dans les boîtes de Petri et/ou peser dans diluant à l'eau peptonée*	agiter
liquides visqueux	peser dans diluant à l'eau peptonée	agiter, mélanger au stomacher ou mixeur
<u>Solides:</u>		
solides hydrosolubles	peser dans diluant à l'eau peptonée	agiter
poudres, viandes	peser dans diluant à l'eau peptonée	mélanger au stomacher ou mixeur
tous les fromages	peser dans une solution préchauffée (45°C) de citrate sodium 2% ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	mélanger au stomacher ou mixeur
épices	peser dans diluant à l'eau peptonée	agiter
mollusques et crustacés	peser dans diluant à l'eau peptonée	mélanger au stomacher ou mixeur

*Utiliser le diluant PT lorsqu'un appareil de filtration est utilisé.