



Procédure de Laboratoire

MFLP-43
septembre 1997

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

DÉTERMINATION DES ENTÉROBACTÉRIES

R.A. Szabo

Division de la recherche en microbiologie

Bureau de dangers microbiens, DGPS

Repère postal : 2204A2

Ottawa (Ontario) K1A 0L2

1. APPLICATION

La présente méthode peut servir à la numération des entérobactéries viables conformément aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-43 de mai 1988.

2. DESCRIPTION

Cette méthode donne des résultats satisfaisants pour la détection des entérobactéries dans les aliments contaminés naturellement (11.1-11.4). La méthode du NPP s'applique à l'analyse d'aliments contenant des coliformes en nombres limités puisque la sensibilité n'est pas limitée par le volume d'homogénat d'aliment qu'il est possible de déposer dans une boîte de Pétri.

3. PRINCIPE

Cette méthode permet d'estimer le nombre d'entérobactéries viables par g ou mL de produit. On mélange une partie du produit à un milieu de gélose précis et l'on fait incuber le tout à une température et pendant une période déterminées. On suppose que chaque micro-organisme viable se multipliera dans ces conditions déterminées d'incubation et produira une colonie visible qu'il sera possible de compter.

4. DÉFINITIONS

Voir l'annexe A du volume 3.

5. ÉCHANTILLONNAGE

Voir l'annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET PRODUITS SPÉCIAUX

- 1) Eau peptonée à 0,1 %.
- 2) Boîtes de Pétri, en verre (100 x 15 mm) ou en plastique (90 x 15 mm).
- 3) Pipettes bactériologiques stériles de 1,5 et 10 mL.

- 4) Bain-marie ou étuve à air pour faire fondre la gélose, 44-46°C.
- 5) Étuve, 35-37 °C.
- 6) Compteur de colonies (modèle à champ sombre Québec ou l'équivalent recommandé).
- 7) Registre de comptage.
- 8) Gélose rouge violet - sels biliaires - glucose VRBG dont il faut vérifier au préalable la productivité et la sélectivité.
- 9) Milieu sucré-salé.
- 10) Gélose nutritive.
- 11) Dichlorhydrate de tétraméthylparaphénylènediamine en solution aqueuse à 1 %.
- 12) Papier filtre, Whatman n° 2, six morceaux de 6 cm de côté.
- 13) Stomacher 400 de Colworth, mélangeur ou l'équivalent.

7. MARCHE À SUIVRE

Analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement.

L'analyse doit se dérouler conformément aux instructions suivantes.

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

7.1.1 À l'exception des aliments stables à la température de la pièce, il faut garder les échantillons au réfrigérateur (0 à 5 °C) ou au congélateur avant de les analyser au laboratoire : tout dépend de la nature du produit. Faire décongeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.

7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage aussitôt que possible après les avoir reçus au laboratoire.

7.2 Préparation des milieux

7.2.1 Préparer les milieux soit pour la méthode d'ensemencement sur plaques (7.4), soit pour la méthode du NPP (8), et distribuer en quantité suffisante. Stériliser.

7.2.2 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié.

7.3 Préparation des échantillons

7.3.1 Avoir à portée de la main du diluant à l'eau peptonée à 0,1 % et de la gélose VRBG tiède (7.4.2).

7.3.2 Pour obtenir une unité d'analyse vraiment représentative, agiter le liquide ou tout produit à écoulement libre jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas des solides, obtenir l'unité d'analyse en prélevant des portions représentatives à différents endroits de l'échantillon.

7.3.3 Préparer une dilution à 1:10 de l'aliment en ajoutant aseptiquement 11(10)* g ou mL (de l'unité d'analyse) dans 99(90) mL de diluant. Mélanger ou agiter, selon le type d'aliment, de la façon indiquée au tableau 1.

NOTE: Le volume inscrit entre parenthèses indique une autre façon de préparer les dilutions.

7.3.3.1 Pour obtenir une suspension homogène au moyen d'un mélangeur, il ne faut pas mélanger pendant plus de 2,0 minutes afin d'éviter de surchauffer le mélange.

Dans le cas des aliments qui ont tendance à mousser, régler le mélangeur à faible vitesse et prélever une portion aliquote au-dessous de l'interface liquide/mousse.

7.3.3.2 Pour obtenir une suspension homogène par agitation, agiter la bouteille de dilution 25 fois en suivant un arc de 30 cm pendant environ 7 sec.

7.3.3.3 Dans certains cas, il peut être souhaitable de préparer la dilution initiale en pourcentage afin d'obtenir un poids de la matière à examiner plus exact que celui que l'on obtient en utilisant la méthode habituelle de dilution selon un rapport : par exemple, une solution à 10 % (suspension) est fondée sur 10 g (mL) par 100 g (mL) de solution (suspension), tandis qu'une dilution à 1:10 est fondée sur 10 g (mL) de produit (soluté) plus 90 g (mL) de diluant (solvant).

7.3.4 Vérifier le pH de l'aliment en suspension. Si le pH ne se situe pas entre 5,5 et 7,6, il faut le rajuster à 7,0 en y ajoutant du NaOH ou du HCl 1N stérile.

7.3.5 Préparer les dilutions décimales successives requises en utilisant une pipette stérile différente pour effectuer chaque transfert.

7.3.6 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant les transferts afin d'assurer une distribution uniforme des micro-organismes présents.

7.4 Ensemencement

7.4.1 Le milieu utilisé est la gélose rouge violet - sels biliaires - glucose (VRBG). Préparer en suivant les instructions du fabricant.

7.4.2 Laisser tiédir la gélose fondue préparée dans un bain-marie à $45\text{ °C} \pm 1\text{ °}$ en veillant à ce que le niveau de l'eau dépasse de 1 cm celui du milieu dans les bouteilles.

7.4.3 Identifier clairement la base de deux boîtes de Pétri en indiquant l'échantillon et la dilution.

7.4.4 Agiter chaque bouteille de dilution afin de resuspendre les aliments qui auraient pu se déposer durant la préparation.

7.4.5 Pipetter 1 mL ou 0,1 mL des dilutions requises dans des boîtes de Pétri en double identifiées comme il se doit.

7.4.6 Dans le cas des produits qui ont tendance à coller au fond des boîtes, ajouter l'inoculum à 1,0 mL de diluant stérile versé au préalable dans la boîte de Pétri.

7.4.7 Retirer les flacons de gélose du bain-marie et éponger l'excès d'eau de l'extérieur de la bouteille avec une serviette de papier propre.

7.4.8 Verser 10 à 15 mL de gélose tiède dans chaque boîte de Pétri et mélanger en faisant tourner la boîte et en l'inclinant. Il faut préparer la boîte dans les 15 minutes suivant la préparation des dilutions. Laisser solidifier la gélose.

7.4.9 Recouvrir le contenu de toutes les boîtes d'une couche d'environ 10 mL de gélose VRBG. Laisser solidifier la couche de couverture.

7.5 Incubation

Incuber les boîtes de gélose à l'envers à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °}$ pendant $48\text{ h} \pm 2\text{ heures}$. Éviter d'empiler ou d'entasser les boîtes afin de les laisser atteindre rapidement et uniformément la température désirée.

7.6 Numération des colonies

7.6.1 Compter les colonies rapidement après la période d'incubation.

- 7.6.2 Si possible, choisir les boîtes de gélose qui donnent de 20 à 200 colonies (y compris celles qui sont très petites). Si le total ne se situe pas entre ces deux chiffres, choisir les boîtes dont le nombre de colonies se rapproche le plus de la plage de 20 à 200.
- 7.6.3 Compter les colonies en utilisant un compteur approprié et un registre. Compter celles qui sont roses et entourées d'un halo de précipité violet.
- 7.6.4 Calculer le nombre par g d'entérobactéries présumées en multipliant le total moyen par plaque par le facteur de dilution. Si l'on a utilisé une dilution de 0,1 mL, multiplier par 10 pour calculer le nombre par g (mL).

7.7 Épreuve de confirmation

- 7.7.1 À partir des boîtes de Pétri contenant la gélose VRBG, prélever les colonies typiques et repiquer sur de la gélose VRBG fraîche pour les purifier. Incuber à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °}$ pendant 20 à 24 heures. Le nombre de colonies prélevées est la racine carrée du nombre de colonies présumées sur la boîte de Pétri, jusqu'à un maximum de 10 colonies.
- 7.7.2 À partir des boîtes de Pétri VRBG, prélever des colonies typiques et bien isolées et repiquer sur de la gélose nutritive inclinée. Incuber la gélose nutritive à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °}$ pendant 20 à 24 heures.
- 7.7.3 Procéder à la coloration de Gram, à l'épreuve à l'oxydase et aux épreuves de fermentation du glucose :

7.7.3.1 **Coloration de Gram** : les entérobactéries sont des bâtonnets Gram négatifs.

7.7.3.2 **Épreuve à l'oxydase** - utiliser une trousse commerciale (Pathotek ou l'équivalent, p. ex.) ou déposer un carré de papier filtre de 6 cm de côté dans une boîte de Pétri vide et ajouter au centre trois gouttes d'une solution aqueuse à 1 % de dichlorhydrate de tétraméthylparaphénylènediamine. Utiliser une aiguille en platine pour bien étaler les cellules sur le papier imprégné de réactif en formant une ligne de 3 à 6 cm de longueur. Observer la couleur. L'épreuve à l'oxydase donne un résultat positif si les cellules transférées virent au violet foncé en cinq à 10 secondes. Les entérobactéries produisent un résultat négatif à l'épreuve à l'oxydase.

7.7.3.3 Fermentation du glucose

Ensemencer au fil de platine deux éprouvettes de gélose au glucose et au sel avec chaque culture. Utiliser un inoculum faible.

Couvrir la gélose d'une des éprouvettes d'une couche de 0,5 à 1,0 cm de vaseline fondue ou d'huile minérale stérile. Incuber les éprouvettes à une températures de 35 à 37 °C pendant 48 heures et noter les résultats. L'épreuve donne un résultat positif lorsqu'une réaction acide (coloration jaune) se produit dans les deux éprouvettes. Elle donne un résultat négatif lorsque la réaction acide ne se produit que dans l'éprouvette laissée à l'air libre ou qu'elle ne se produit dans aucune des deux éprouvettes. Les entérobactéries donnent une réaction positive.

- 7.7.4 Compter le nombre d'isolats qui sont des bâtonnets Gram négatifs, qui donnent une réaction négative à l'épreuve à l'oxydase et qui fermentent le glucose en produisant de l'acide.

7.8 Inscription des résultats

- 7.8.1 Calculer le nombre confirmé d'entérobactéries par g de la façon suivante :

$$\text{N}^{\text{bre}} \text{ confirmé} = \text{nombre présumé} \times \frac{\text{Nombre de colonies confirmées comme étant des entérobactéries}}{\text{N}^{\text{bre}} \text{ de colonies testées}}$$

- 7.8.2 Pour indiquer les résultats (tableau 2), arrondir les dénombrements à deux chiffres significatifs près et inscrire seulement les deux premiers chiffres de gauche (par exemple, pour 2 850, inscrire 2 900).
- 7.8.3 Si la dilution la plus faibleensemencée ne présente aucune colonie ou aucune colonie typique, la valeur inscrite sera la moyenne la plus faible que l'on peut obtenir d'un volume donné versé dans un ensemble donné de boîtes préparées en double, précédée du signe « moins de » (<). Par exemple, pour un ensemble de boîtes préparées en double etensemencées avec 1 mL par boîte, la valeur moyenne est de <0,5. La moyenne la plus faible possible pour une colonie sur une des deux boîtes préparées en double est la suivante :

$$\frac{1 + 0}{2} = 0,5.$$

Cette valeur s'applique à une dilution de 10^0 (facteur de dilution = 1). Pour les autres dilutions, multiplier la valeur numérique de 0,5 par la réciproque de la dilution, c'est-à-dire le facteur de dilution,

p. ex $\frac{1}{10^{-1}} = 10.$

8. MÉTHODE DU NPP

8.1 Pré-enrichissement

- 8.1.1 À partir de chaque dilution d'homogénat d'aliment, inoculer cinq tubes d'eau peptonée tamponnée (12.1) en procédant de la façon illustrée au tableau III.
- 8.1.2 Incuber les tubes inoculés à $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ$ pendant 24 ± 2 heures.
- 8.1.3 Utiliser comme culture témoin un mélange de *Klebsiella* et de *Proteus vulgaris*. Il faut transférer par la suite les témoins positifs dans tous les milieux utilisés aux différentes étapes de la marche à suivre.

9. ÉPREUVE DE PRÉSUMPTION

- 9.1 Examiner les tubes de culture et les agiter pour en mélanger le contenu.
- 9.2 Inoculer une anse de chaque tube de culture renfermant de l'eau peptonée et où des cultures commencent à se former dans 10 mL de bouillon d'enrichissement pour entérobactéries (EE) (12.2) et mélanger.
- 9.3 Incuber les tubes EE inoculés à $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ$ pendant 20 à 24 heures.
- 9.4 Rechercher les signes de croissance bactérienne dans les tubes et noter les résultats sous forme de « NPP présumé » et d'entérobactéries par g d'échantillon. Suivre les instructions de l'annexe A pour transformer le nombre de tubes positifs en valeurs représentant le NPP.

10. ÉPREUVE DE CONFIRMATION

- 10.1 Le milieu de confirmation est de la gélose rouge violet - sels biliaires - glucose (VRBG, 12.4). Préparer en suivant les instructions du fabricant. Verser dans les boîtes de Pétri et veiller à ce que la surface de la gélose soit sèche.
- 10.2 Il faut soumettre à l'épreuve de confirmation tous les tubes EE qui présentent une croissance bactérienne.
- 10.3 Mélanger doucement les tubes EE qui présentent une croissance bactérienne et ensemencer par stries une anse de bouillon sur une boîte de Pétri contenant de la gélose VRBG.
- 10.4 Incuber les boîtes de Pétri de gélose VRBG inoculées à $35\text{-}37 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 à 24 heures.

- 10.5 Les colonies d'entérobactéries typiques sont entourées d'un halo violet.
- 10.6 Prélever quatre des colonies caractéristiques de chaque boîte de Pétri contenant la gélose VRBG et ensemencer par stries sur des boîtes de Pétri distinctes contenant de la gélose nutritive.

NOTE: Il faut soumettre une seule des quatre colonies prélevées à la coloration de Gram, à l'épreuve à l'oxydase et à l'épreuve de fermentation du glucose. Si le premier isolat donne des réactions caractéristiques des entérobactéries, il n'est pas nécessaire de soumettre les trois autres aux épreuves. Dans le cas contraire, il faut le faire.

- 10.7 Incuber les boîtes de gélose nutritive à $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ pendant 24 heures.
- 10.8 Sur une des quatre boîtes de gélose nutritive, prélever une colonie isolée et procéder à une coloration de Gram, une épreuve à l'oxydase et une épreuve de fermentation du glucose (voir 7.7.3).
- 10.9 Calculer le NPP d'entérobactéries à partir des tubes EE présentant une croissance de bactéries Gram négatives, en bâtonnets, qui produisent une réaction négative à l'épreuve à l'oxydase et fermentent le glucose. Suivre les instructions de l'annexe D du volume 3.

11. RÉFÉRENCES

- 11.1 American Public Health Association. 1978. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th Edn. APHA Inc. Washington DC.
- 11.2 American Public Health Association. 1976. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA Inc. Washington DC.
- 11.3 Druce, R.G., N.N. Bebbington, K. Harcombe et S.B. Thomas. 1957. J. Appl. Bact. **20**:1-10.
- 11.4 Mossel, D.A.A. et C.L. Vega. 1973. Hlth. Lab. Sci. **11**:303-307.

12. PRÉPARATION DES MILIEUX

Lorsqu'on utilise la stérilisation à la vapeur, il est essentiel d'attendre assez longtemps pour permettre à la charge de parvenir à la température requise avant de chronométrer la période de stérilisation proprement dite. Cette période d'attente varie considérablement selon la nature et la taille de la charge. Il faut donc prévoir des temps d'exposition appropriés pour assurer la stérilisation des solutions en contenant et des milieux de culture résistants à la chaleur. (Se reporter au mode d'emploi du stérilisateur.)

12.1 PEPTONE TAMPONNÉE

Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique dodécahydraté	9 g
Phosphate monopotassique	1.5 g

Dissoudre les éléments constitutants dans un litre d'eau distillée en portant à ébullition. Ajuster le pH de façon à le fixer à $7,0 \pm 0,1$ après stérilisation. Répartir les milieux en volumes de 10 mL dans des tubes de 150 x 15 mm. Stériliser à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 20 minutes.

12.2 BOULLION D'ENRICHISSEMENT POUR LES ENTÉROBACTÉRIES (EE)

Peptone	10,0 g
Glucose	5,0 g
Phosphate disodique dihydraté	8,0 g
Phosphate monopotassique	2,0 g
Bile de boeuf	20,0 g
Vert brillant	0,015 g

Il faut utiliser de la bile de boeuf et du vert brillant purifiés seulement pour ne pas inhiber les cellules débilitées d'entérobactéries très peu nombreuses. Dissoudre les ingrédients dans un litre d'eau distillée, porter à ébullition et répartir en volumes de 10 mL dans des tubes.

Ce milieu est offert sur le marché sous forme déshydratée. Reconstituer en suivant les instructions figurant sur le contenant.

12.3. GÉLOSE GLUCOSE-SEL

Tryptone	2 g
Glucose	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate dipotassique	0,3 g
Gélose	3 g
Bleu de bromothymol (solution alcoolique à 0,1 %)	30 g

Ajouter tous les ingrédients sauf le glucose à 870 mL d'eau distillée, porter à ébullition en agitant jusqu'à dissolution complète répartie en volumes de 4, 5 à 5 mL dans des tubes à culture, passer à l'autoclave (121 °C pendant 15 minutes) et refroidir à 45 °C. Stériliser par filtration une solution aqueuse de glucose à 10 % et en ajouter, dans des conditions aseptiques, 0,5 mL à chaque tube du milieu de base. Bien mélanger et laisser refroidir à température de la pièce. Le pH final est de 7,1.

12.4 GÉLOSE ROUGE VIOLET-SELS BILIAIRES-GLUCOSE

Extrait de levure	3,0 g
Peptone	7,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Sels biliaires n° 3	1,5 g
Lactose	10,0 g
Rouge neutre	0,03 g
Violet de gentiane	0,002 g
Gélose	15,0 g
Glucose	10,0 g

Ajouter les ingrédients à un litre d'eau distillée (ajouter les colorants sous forme de solution aqueuse à 1 % filtrée) et porter à ébullition en agitant jusqu'à ce que tous les ingrédients soient dissous. Ne pas stériliser ce milieu davantage. Laisser refroidir à 45 °C et couler dans des boîtes de Pétri, de 15 cm de diamètre de préférence. Si les boîtes ne servent pas sur-le-champ, il faut les conserver dans un réfrigérateur à une température de 5 à 8 °C. Ce milieu est disponible sur le marché sous forme déshydratée. Reconstituer en suivant les instructions figurant sur le contenant.

12.5 **RÉACTIF POUR L'ÉPREUVE À L'OXYDASE DE KOVAC**

Chlorhydrate de tétraméthyl-p-phénylènediamine	1,0 g
Eau distillée	100 mL

Ce réactif peut se conserver jusqu'à deux semaines au réfrigérateur, dans une bouteille foncée. Des bandelettes toutes prêtes sont disponibles sur le marché.

TABLEAU I

Traitement des suspensions d'aliments.

Genre d'aliment	Préparation	Traitement
Liquides:		
lait, eau, etc.	pipetter directement dans des boîtes de Pétri ou ajouter au diluant après avoir pesé	agiter
liquides visqueux	peser dans le diluant	agiter
Solides :		
solides hydrosolubles	peser dans le diluant	agiter
poudres, viandes	peser dans le diluant	mélanger
fromage fondu	peser dans du citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à 2 % réchauffé au préalable à 45 °C	mélanger
épices	peser dans le diluant	agiter

TABLEAU II

Exemples de façons d'inscrire les résultats

Exemples du nombre moyen de colonies	Dilution	Inscrire comme n^{bre} de bactéries par g (mL)
numération entre 30 et 300 p. ex., 244	1:1000	240 000
numération supérieure à 300 p. ex., 440	Dilution la plus élevée 1:1000	440 000 E
numération inférieure à 30 p. ex., 25	Dilution la plus faible 1:1000	25 000 E
Aucune numération, 0	Dilution la plus faible 1:1000	<500

TABLEAU III

Schéma de marquage et d'inoculation - Méthode du NPP

Marquage du tube*	Dilution de l'unité d'analyse utilisée	Volume d'unité d'analyse diluée inoculée dans les tubes d'eau peptonée tamponnée	Quantité du produit par tube
0	non diluée	10^0 1 mL de liquide non dilué dans 10 mL de milieu à concentration simple	1 g ou mL
0	non diluée	10^0 10 mL de dilution à 10^{-1} dans 10 mL de milieu à concentration double	1 g ou mL
1	1:10	10^{-1} 1 mL de dilution à 10^{-1} dans 10 mL de milieu à concentration simple	0,1 g ou mL
2	1:100	10^{-2} 1 mL de dilution à 10^{-2} dans 10 mL de milieu à concentration simple	0,01 g ou mL
3	1:1000	10^{-3} 1 mL de dilution à 10^{-3} dans 10 mL de milieu à concentration simple	0,001 g ou mL
4	1:10000	10^{-4} 1 mL de dilution à 10^{-4} dans 10 mL de milieu à concentration simple	0.0001 g ou mL

Les aliments peuvent être dilués davantage et inoculés de la même façon dans du milieu à concentration simple selon le niveau prévu de contamination de l'aliment.

* On peut utiliser d'autres schémas de marquage.