



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

DÉNOMBREMENT DES *ESCHERICHIA COLI* DANS LES ALIMENTS
PAR ENSEMENCEMENT DIRECT (ED)

R.A. Szabo et E.C.D. Todd
Division de la recherche microbiologique
Bureau de dangers microbiens, DGPS
Repère postal : 2204A2
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

1. APPLICATION

La présente méthode peut servir au dénombrement des *Escherichia coli* de biotype 1 dans les aliments et les ingrédients alimentaires et vise à déterminer s'il y a conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Lorsqu'une méthode officielle est prescrite pour certains produits, il faut la suivre. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-27, datée de décembre 1995.

2. DESCRIPTION

Cette méthode a été utilisée avec succès pour le dénombrement des *E. coli* dans les produits suivants : viandes rouges, volaille, porc, saucisse, eaux de rinçage des carcasses, poisson, crustacés et coquillages, lait, crème glacée, fromage, purée de pommes, purée de fraises, farine, carottes, pommes de terre, rutabagas et haricots verts (voir section 8). Sauf dans le cas des haricots et des germes de luzerne, où la présence d'un grand nombre de *Klebsiella* spp peut empêcher de dénombrer avec précision les *E. coli*, l'ensemencement direct permet de dénombrer les *E. coli* présents dans d'autres aliments et ingrédients alimentaires.

3. PRINCIPE

La méthode classique du nombre le plus probable (NPP) utilisée pour dénombrer les *E. coli* dans les aliments prend de 8 à 12 jours, tandis que la méthode de l'ensemencement direct (ED) prend de 24 à 30 heures. Dans des études antérieures de comparaison de ces deux méthodes, la méthode du NPP s'est révélée moins précise et a produit des nombres plus faibles d'*E. coli* dans des échantillons de viande congelée. En outre, la méthode du NPP ne permet pas de dénombrer les fermenteurs tardifs du lactose et les *E. coli* anaérogènes qui constituent environ 10 % des souches d'*Escherichia* (2). Le principal inconvénient de la méthode d'ensemencement direct, c'est qu'elle ne permet pas de dénombrer les *E. coli* non producteurs d'indole qui représentent de 3 à 5 % des souches d'*E. coli* (2). Cet inconvénient est compensé par la brièveté de la méthode et le fait qu'elle facilite le dénombrement des *E. coli* anaérogènes.

4. DÉFINITIONS

Voir l'annexe A du volume 2.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 2.

6. MATÉRIEL ET PRODUITS SPÉCIAUX

- 1) Membranes filtrantes de 0,45 mm, d'un diamètre de 85 mm (MF) (vendu par Nuclepore Canada, Inc., Toronto, n° de cat. 145318).
- 2) Eau peptonée (0,1 %).
- 3) Gélose nutritive (NA).
- 4) Gélose de sels biliaires et de tryptone (TBA).
- 5) Réactif de détection de l'indole.
- 6) Un incubateur à chemise d'eau capable de maintenir une température de $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou un incubateur de précision semblable.
- 7) Mélangeur ou stomacher Colworth 400.

7. MARCHE À SUIVRE

Analyser individuellement chacune des unités d'échantillonnage. Effectuer l'analyse en suivant les instructions ci-dessous :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage au laboratoire

- 7.1.1 Au cours de l'entreposage et du transport, les mesures suivantes s'appliquent : sauf dans le cas des aliments de longue conservation, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur ($0-5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Les unités d'échantillonnage de produits congelés doivent demeurer congelées.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Nettoyer la surface de l'aire de travail au moyen d'un désinfectant approprié.
- 7.2.2 Marquer clairement les boîtes de Pétri en double en indiquant l'échantillon, l'unité d'échantillonnage, la dilution et la date d'ensemencement.
- 7.2.3 Avoir à portée de la main de l'eau de dilution peptonée stérile.

7.3 Préparation des échantillons

- 7.3.1 Pour que l'unité d'analyse soit vraiment représentative, agiter les liquides ou les solides à écoulement libre jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas d'un solide, prélever des portions à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.
- 7.3.2 Dans le cas d'échantillons solides, mélanger ou déposer dans le «stomacher» 11 (10) g (l'unité d'analyse) et 99 (90) mL d'eau peptonée pendant 2 minutes. Préparer des dilutions décimales dans de l'eau peptonée. Si l'on prévoit un dénombrement faible, mélanger 11 (10) g à 44 (40) mL d'eau peptonée (1:5). Dans le cas des échantillons liquides, agiter 11 (10) mL avec 99 (90) mL (1:10) ou 44 (40) mL d'eau peptonée (1:5). Les échantillons liquides peuvent aussi être ensemencés non dilués (voir ci-dessous).

NOTE: Les poids ou les volumes entre parenthèses indiquent une autre façon d'effectuer la dilution.

- 7.3.3 Vérifier le pH de la suspension d'aliment. Si le pH ne se situe pas entre 5,5 et 7,6, il faut l'ajuster à

7,0 en y ajoutant du NaOH 1N ou du HCl 1N stériles.

- 7.3.4 Si la congélation ou un autre traitement ont pu affecter les micro-organismes de l'échantillon, procéder de la façon suivante. Sinon, passer directement à 7.3.9. Sur la plaque de gélose nutritive préparée à l'avance et dont la surface est sèche, déposer une membrane filtrante et la faire adhérer à la gélose à l'aide d'un étaleur en verre ou en plastique stérile. Éviter d'emprisonner des bulles d'air.
- 7.3.5 Ensemencer en double 0,5 mL de deux dilutions décimales consécutives ou, si l'on prévoit un dénombrement faible, 1 mL de la dilution 1,5 ou 0,5 mL de l'unité d'échantillonnage non diluée (échantillon liquide) sur la membrane filtrante qui recouvre la gélose nutritive. Utiliser un étaleur en plastique ou en verre pour étaler uniformément l'inoculum sans dépasser le bord de la membrane filtrante.
- 7.3.6 Lorsque l'inoculum a été absorbé, incuber les plaques à l'endroit, en piles d'au plus trois plaques, dans un incubateur à 35-37 °C pendant 4 heures.
- 7.3.7 Utiliser des pinces stériles pour retirer la membrane filtrante de la gélose nutritive et la transférer sur la surface d'une plaque de gélose de sels biliaires et de triptone préparée à l'avance et dont la surface est sèche. Éviter d'emprisonner des bulles d'air.
- 7.3.8 Incuber les plaques de gélose de sels biliaires et de triptone à l'endroit, en piles d'au plus trois plaques, dans un incubateur à 44,5 °C ± 0,5 °C pendant 18 à 24 heures.
- 7.3.9 Si les échantillons ne sont ni congelés ni traités, sauter l'étape de la gélose nutritive. Procéder de la façon suivante :

Sur la surface sèche d'une plaque de gélose de sels biliaires et de triptone préparée à l'avance, déposer une membrane filtrante et la faire adhérer à la gélose au moyen d'un étaleur en verre ou en plastique stérile. Éviter d'emprisonner des bulles d'air.

Ensemencer en double comme en 6.3.5, mais sur la membrane filtrante recouvrant la plaque de gélose de sels biliaires et de triptone. Incuber les plaques à l'endroit, en piles d'au plus trois plaques, à 44,5 °C ± 0,5 °C pendant 20-24 h.

- 7.3.10 Après l'incubation des plaques de gélose de sels biliaires et de triptone à 44,5 °C ± 0,5 °C, retirer les couvercles des boîtes de Pétri, les essuyer jusqu'à ce qu'ils soient secs et déposer 2,0 mL de réactif de détection de l'indole (9.4) dans chacun d'entre eux. Retirer la membrane filtrante de la surface de la gélose et la déposer dans le couvercle correspondant de telle façon que toute sa surface inférieure est imbibée de réactif. Laisser reposer le tout à la température de la pièce pendant 10 à 15 minutes et retirer la membrane filtrante en la faisant glisser sur le bord du couvercle pour enlever le surplus de réactif. Déposer la membrane sur une surface plane (p. ex., un autre couvercle propre de boîte de Pétri) et la faire sécher sous une lampe UV «germicide» (p. ex., Philips TUV, 15 W ou GE G 30T8, 30W) pendant une vingtaine de minutes. Il est préférable d'effectuer cette opération sous une hotte, dans une enceinte à écoulement d'air laminaire appropriée ou dans une enceinte de confinement biologique pour éviter toute exposition aux vapeurs d'acide chlorhydrique qui se dégagent au cours du séchage.

NOTE :	S'il faut conserver les colonies pour quelque raison que ce soit, il faut les prélever sur la membrane avant la coloration.
---------------	---

- 7.3.11 Les colonies dont la couleur varie du rose au rouge et qui apparaissent sur la membrane filtrante sont productrices d'indole et sont dénombrées comme des *E. coli* de biotype 1. Utiliser le facteur de dilution pour calculer le nombre d'*E. coli* de biotype 1 par g ou mL et inscrire les résultats.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Anderson, J.M. et A.C. Baird-Parker. 1975. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype I in food. J. Appl. Bacteriol. **39**: 111-117.
- 8.2 Ewing, W.H. 1972. Differentiation of enterobacteriaceae by biochemical reactions. CDC Atlanta, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare.
- 8.3 Holbrook, R., J.M. Anderson et A.C. Baird-Parker. 1980. Modified direct plate method for counting *Escherichia coli* in foods. Food Technol (Ans.) **32**: 78-83.
- 8.4 Rayman, M.K. et B. Aris. 1981. The Anderson-Baird-Parker direct plating method versus the most probable number procedure for enumerating *Escherichia coli* in meats. J Can Microbiol **27**: 147-149.
- 8.5 Rayman, M.K., G.A. Jarvis, C.M. Davidson, S. Long, J.M. Allen, T. Tong, P. Dodsworth, S. McLaughlin, S. Greenberg, B.G. Shaw, H.J. Beckers, S. Qvist, P.M. Nottingham et B.J. Stewart. 1979. ICMSF methods studies. XIII. An international comparative study of the MPN procedure and the Anderson-Baird-Parker direct plating method for the enumeration of *Escherichia coli* biotype I in raw meats. J Can Microbiol **25**: 1321-1327.
- 8.6 Sharpe, A.N., P.I. Peterkin et M.K. Rayman. 1981. Detection of *Escherichia coli* in foods: Indole staining methods for cellulosic and polysulfone membrane filters. Appl. Environ. Microbiol. **41**: 1310-1315.
- 8.7 Sharpe, A.N., M.K. Rayman, D.M. Burgener, D. Conley, A. Loit, M. Milling, P.I. Peterkin, U. Purvis et S. Malcolm, 1983. Collaborative study of the MPN, Anderson/Baird-Parker direct plating, and hydrophobic grid-membrane filter methods for the enumeration of *Escherichia coli* in foods. J Can Microbiol **29**: 1247-1252.
- 8.8 Yoovidhya, T. et G.H. Fleet. 1981. An evaluation of the A-1 most probable number and the Anderson and Baird-Parker plate count methods for enumerating *Escherichia coli* in the Sydney rock oyster, *Crassostrea commercialis*. J. Appl. Bacteriol. **50**: 519-528.

9. PRÉPARATION DES MILIEUX ET DES RÉACTIFS :

Lorsqu'on stérilise à la vapeur, il est essentiel que la charge atteigne la température requise avant le début réel de la période de stérilisation. Le temps nécessaire varie considérablement en fonction de la nature et de la grosseur de la charge. Il faut donc respecter les périodes de stérilisation nécessaires si l'on veut assurer la stérilisation des solutions et des milieux de culture thermostables. Consulter le manuel du stérilisateur.

9.1 GÉLOSE NUTRITIVE

Extrait de boeuf (Bacto ou l'équivalent)	3 g
Peptone (Bacto ou l'équivalent)	5 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1000 mL

Dissoudre les ingrédients et les déposer dans un autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Verser 15-20 mL par boîte de Pétri sur une surface plane. Les boîtes de gélose se gardent une semaine à 4 °C. La gélose nutritive est disponible sur le marché.

9.2 GÉLOSE DE SELS BILIAIRES ET DE TRYPTONE

Tryptone (Difco ou l'équivalent)	20 g
Sels biliaires n° 3 (Oxoid)	1.5 g
Gélose	15 g

Eau distillée 1000 mL

Dissoudre les ingrédients et les déposer dans un autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Verser 15-20 mL des ingrédients par plaque sur une surface plane. Les plaques se gardent une semaine à 4 °C. La gélose de sels biliaires et de tryptone est disponible sur le marché.

9.3 EAU PEPTONÉE

Peptone 1,0 g
Eau distillée 1000 mL

Dissoudre la peptone dans l'eau distillée et verser la solution dans des bouteilles de dilution et dans des éprouvettes pour obtenir un volume final de 99 mL, 90 mL et 9,0 mL respectivement après stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes.

9.4 RÉACTIF DE DÉTECTION DE L'INDOLE

p - diméthylamino-benzaldéhyde (DAB) 0, g
Acide chlorhydrique (HCl) 1N 100 mL

Dissoudre le DAB dans du HCl 1N et garder dans un endroit obscur à moins de 20 °C. Le réactif est stable pendant au moins 2 semaines. Avant de les utiliser sur des échantillons inconnus, il faut tester les nouveaux lots de DAB avec des *E. coli* reconnus comme producteurs d'indole.