



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉNOMBREMENT DES *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* DANS LES ALIMENTS

Division de l'évaluation microbiologique  
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments, DGPSA  
Repère postal 2204A2  
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

**1. APPLICATION**

La présente méthode est applicable au dénombrement des *Clostridium perfringens* viables dans les aliments et vise à déterminer s'il y a conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-23 datée de septembre 1997.

**2. DESCRIPTION**

Il a été démontré que cette méthode donne des résultats satisfaisants avec des produits de viande et de volaille contaminés naturellement (8.2-8.4).

**3. PRINCIPE**

La méthode permet d'estimer le nombre de *Clostridium perfringens* viables par g ou ml d'aliment. Une portion du produit est mélangé et incubé avec un milieu sélectif selon la technique de la gélose coulée en boîte de Pétri. Les colonies noires caractéristiques sont dénombrées comme colonies présumées de *Clostridium perfringens*. Au moins cinq de ces colonies sont soumises à des analyses de confirmation. Le nombre de *Clostridium perfringens* confirmés est calculé d'après le ratio du nombre de colonies présumées confirmées sur le nombre de colonies présumées analysées.

**4. DÉFINITIONS DES TERMES**

Voir l'annexe A du volume 2.

**5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS**

Voir l'annexe B du volume 2.

**6. FOURNITURES ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX**

Les milieux et les réactifs suivants (1-3) sont disponibles commercialement et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 2 et le document de référence 8.1 pour obtenir la formulation de chaque milieu.

- 1) Gélose de sulfite de cyclosérine (SC) (appelée à l'origine Gélose de sulfite de cyclosérine et de tryptose sans jaune d'œuf)
- 2) Gélose de motilité au nitrate (NM)
- 3) Réactifs pour le test de nitrate
- 4) Citrate de sodium à 2 % (tempéré à 45 °C) (peut servir pour les échantillons de fromage)
- 5) Diluant à l'eau peptonée (EP) (0,1 %)
- 6) Gélatine lactosée (LG)
- 7) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 8) pH mètre ou papier indicateur capable de distinguer de 0,3 à 0,5 unité pH dans l'échelle de pH 5,0 à 8,0
- 9) HCl 1N et NaOH 1N
- 10) Un système capable de générer des conditions anaérobies tel que les jarres anaérobies (avec un système d'échappement des gaz ou enveloppes jetables génératrices de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gazeux et un dessiccant, comme du CaSO<sub>4</sub> anhydre); le système de génération d'atmosphère anaérobie AnaeroGen™ (Oxoid) ou un incubateur anaérobie capable de maintenir une température de 35 °C.
- 11) Mélange gazeux composé de 5 % de CO<sub>2</sub>, 10 % de H<sub>2</sub> et 85 % de N<sub>2</sub> (si un incubateur anaérobie ou des jarres dotées d'un système d'échappement des gaz sont utilisés)
- 12) Indicateur d'anaérobiose
- 13) Incubateur aérobie capable de maintenir une température de 35 °C
- 14) Bain-marie à 45 °C (si du citrate de sodium doit être utilisé)

**NOTE :** Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer 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 réglé à 35 +/-1.0 °C. De même, une température plus basse de 30 ou 25 °C peut 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 que l'on cherche à isoler.

- 15) Compteur de colonies

## 7. MARCHE À SUIVRE

Il faut analyser chacune des unités d'échantillonnage individuellement. Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes :

### 7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Avant l'analyse au laboratoire, à l'exception des aliments stables à la température de la pièce, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5°C) ou au congélateur, selon 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 le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

## 7.2 Préparation pour l'analyse

7.2.1 Avoir à portée de la main du diluant à l'eau peptonée tamponnée à 0,1 % ou un autre diluant requis (tableau 1).

7.2.2 Nettoyer la surface de travail au moyen d'un désinfectant approprié.

## 7.3 Préparation de l'échantillon

7.3.1 Pour obtenir une unité d'analyse vraiment représentative, agiter les liquides ou les matières fluides 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 pour constituer l'unité d'analyse.

7.3.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en agitant, en passant au stomacher ou au mélangeur, de façon aseptique, 25 g ou ml (l'unité d'analyse) dans 225 ml du diluant requis, tel qu'indiqué au tableau 1. Si la taille de l'échantillon diffère de 25 g ou ml, il faut maintenir à 1:10 le ratio échantillon : diluant tel que 11(10) g ou ml dans 99 (90) ml.

**NOTE:** Le poids ou le volume entre parenthèses indique une autre façon de préparer les dilutions.

7.3.3 Mélanger pendant le temps minimum requis pour produire une suspension homogène. Pour éviter de surchauffer le mélange, ne pas mélanger pendant plus de 2,5 min. Dans le cas des aliments qui ont tendance à mousser, régler le mélangeur à basse vitesse et prélever ensuite une portion aliquote sous l'interface liquide/mousse.

7.3.4 S'il faut mélanger la dilution 1:10 par agitation, agiter la bouteille de dilution 25 fois en suivant un arc de 30 cm pendant 7 secondes environ.

7.3.5 Si le « stomacher » est utilisé, laisser macérer pendant 1 min.

7.3.6 Vérifier le pH de la suspension d'aliment. Si le pH est en dehors de la plage 5,5 et 7,5, ajuster le pH à 7,0 avec du NaOH 1N ou du HCl 1N stérile.

7.3.7 Laisser l'homogénat (dilution 1:10) d'aliments secs reposer à la température de la pièce pendant 15 min. Dans tous les autres cas, poursuivre l'analyse le plus rapidement possible.

7.3.8 Préparer des dilutions décimales successives au besoin en utilisant une pipette stérile distincte pour effectuer chaque transfert.

7.3.9 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant d'effectuer les transferts afin d'assurer l'uniformité de la distribution des micro-organismes présents.

## 7.4 Ensemencement et incubation

7.4.1 Pipetter 1 ml des dilutions requises dans chacune des boîtes de Pétri stériles préparées en double.

7.4.2 Verser dans chaque boîte environ 20 ml de gélose de sulfite de cyclosérine (SC) et mélanger doucement par rotation.

- 7.4.3 Incuber les boîtes en position verticale, en anaérobiose, à 35 °C pendant 20 h. Une incubation plus longue peut provoquer un noircissement excessif le long des bords inférieurs des boîtes. Si les boîtes sont placées à l'envers, les gaz pourraient déplacer la gélose.

On peut incuber un nombre limité de boîtes dans des jarres anaérobies et utiliser des enveloppes jetables génératrices de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gazeux ou un système d'échappement des gaz. Si des enveloppes sont utilisées, il faut recouvrir le fond des jarres de CaSO<sub>4</sub> anhydre ou d'un autre produit dessiccant approprié.

Alternativement, le système de génération d'atmosphère anaérobie AnaeroGen™ (Oxoid) peut être utilisé.

Pour incuber un grand nombre de boîtes, il est préférable d'utiliser un incubateur anaérobie. Il faut évacuer trois fois l'air des incubateurs et des jarres anaérobies et le remplacer par un mélange composé de 5 % de CO<sub>2</sub>, de 10 % de H<sub>2</sub> et de 85 % de N<sub>2</sub>. Chaque jarre et incubateur doit contenir un indicateur d'anaérobiose.

## 7.5 Dénombrement des colonies présumées de *Clostridium perfringens*

- 7.5.1 Après 20 h d'incubation, vérifier les indicateurs pour s'assurer de l'anaérobiose (sans anaérobiose, il faut interrompre l'analyse).
- 7.5.2 Choisir des boîtes qui contiennent de 20 à 200 colonies noires d'un diamètre d'environ 1 à 2,5 mm. Il ne faut pas compter les colonies noires en tête d'épingle.
- 7.5.3 Dénombrer les colonies présumées et établir la moyenne des boîtes en double. Le dénombrement présumé N (nombre de colonies par g (ml)) est  $N=A \times D$ , où A représente la moyenne du dénombrement présumé pour les boîtes préparées en double et D, le facteur de dilution. Si le nombre le plus faible de colonies par boîte dépasse 150, dénombrer ou estimer le nombre, consigner les résultats en y ajoutant la lettre E, par exemple,  $1,8 \times 10^6 E$ , pour indiquer un degré de précision plus faible. Si le nombre des colonies est trop élevé pour qu'on puisse en faire l'estimation, consigner le nombre minimal estimable en y ajoutant un signe > : p. ex.,  $>2,0 \times 10^6$ .

Si le nombre le plus élevé de colonies par boîte est inférieur à 15, consigner le résultat en y ajoutant la lettre E : p. ex.,  $1,2 \times 10^3 E$ . Si l'on ne trouve aucune colonie présumée, consigner le dénombrement ainsi :  $<0,5 \times D$ .

## 7.6 Épreuves de confirmation

- 7.6.1 Choisir au hasard au moins cinq colonies présumées dans les boîtes appropriées (ou toutes les colonies présumées s'il y en a moins de cinq). Utiliser un fil-aiguille ordinaire (ou un fil-aiguille comportant une anse minuscule) pour ensemercer chacune des colonies choisies dans une gélose de motilité au nitrate (NM). En parallèle, ensemercer chacune de ces colonies profondément dans une gélatine au lactose (LG).
- 7.6.2 Fermer les éprouvettes hermétiquement et incuber à 35-37 °C pendant 24 heures. Incuber deux éprouvettes NM et LG non ensemercées comme témoins. Il n'est pas nécessaire de les incuber en anaérobiose.
- 7.6.3 Ajouter de 0,2 à 0,4 ml de réactif au nitrate à chaque éprouvette de gélose NM où l'on constate une croissance de bacilles non motiles le long de la ligne d'ensemencement. Le développement d'une coloration rouge à la partie supérieure indique qu'il y a eu réduction du nitrate en nitrite. Une réaction faiblement colorée, un peu plus intense que celle qui se produit dans les éprouvettes-témoins, est considérée comme négative. Ajouter une petite quantité de poudre de zinc à la culture négative. Le développement d'une coloration rouge indique un test négatif et l'absence d'un changement de coloration indique un test positif (aucun nitrate restant, ce dernier ayant été totalement réduit par la culture au delà du stade

nitrite). Si la croissance bactérienne est limitée à la partie inférieure de l'éprouvette et si la coloration est faible ou nulle, aspirer et jeter la couche supérieure du milieu de l'éprouvette et ajouter de nouveau du réactif au nitrite à ce qui reste.

- 7.6.4 Examiner les éprouvettes LG pour déterminer s'il y a production de gaz et si la couleur vire du rouge au jaune, ce qui indique une fermentation du lactose.
- 7.6.5 Placer les éprouvettes LG dans de l'eau glacée pendant 10 min, ou au réfrigérateur (4 °C) pendant une heure. S'il ne se produit aucune liquéfaction après 24 h d'incubation mais s'il y a indication de non-motilité, de réduction du nitrate en nitrite et de fermentation du lactose, incuber de nouveau l'éprouvette LG pendant 24 h de plus. Les isolats qui sont non-motiles, réduisent le nitrate, fermentent le lactose et liquéfient la gélatine en dedans de 48 h confirment la présence de *Clostridium perfringens*.
- 7.6.6 En plus des épreuves mentionnées, les trousseaux d'identification rapide peuvent être utilisés, telles que API 20A, API An-ident ou les cartes Anaerobic Vitek
- 7.6.7 Calculer le nombre confirmé de *Clostridium perfringens* à partir du dénombrement présumé et du nombre relatif de colonies confirmées :

$$\text{Dénombrement confirmé/g(ml)} = \text{Dénombrement présumé/g(ml)} \times \frac{\text{N}^{\text{bre}} \text{ de colonies confirmées}}{\text{N}^{\text{bre}} \text{ de colonies analysées}}$$

Si aucune colonie n'est confirmée, inscrire le dénombrement ainsi : <0,5 x D, où D représente le facteur de dilution.

## 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (rédacteur). CRC Press Inc.
- 8.2 Hauschild, A.H.W. et R. Hilsheimer. 1974. Enumeration of food-borne *Clostridium perfringens* in egg yolk-free tryptose-sulfite-cycloserine agar. *Appl. Microbiol.* **27**:521-526.
- 8.3 Hauschild, A.H.W. 1975. Criteria and procedures for implicating *Clostridium perfringens* in food-borne outbreaks. *Rev Can Santé publique* **66**:388-392.
- 8.4 Hauschild, A.H.W., R.J. Gilbert, S.M. Harmon, M.F. O'Keefe et R. Vahlefiled. 1977. ICMSF methods studies. VIII. Comparative study for the enumeration of *Clostridium perfringens* in foods. *J Can Microbiol* **23**:884-892.

TABLEAU 1

## Préparation de la dilution initiale

Type de produit alimentaire	Préparation*	Traitement
<b>Liquides :</b>		
lait, eau, etc.	pipetter directement dans des boîtes de Pétri et/ou dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
Liquides visqueux et non miscibles	peser dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
<b>Solides :</b>		
Solides hydrosolubles	peser dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
Poudres, viandes	peser dans le diluant à l'eau peptonée	passer au stomacher ou mélanger
Fromage	peser dans du citrate de sodium aqueux 2 % ( $\text{Na}_3\text{C}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) chauffé au préalable à 45 °C	passer au stomacher ou mélanger
Épices	peser dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
Crustacés et coquillages	peser dans le diluant à l'eau peptonée	passer au stomacher ou mélanger

\* Avant le mélange, l'échantillon peut être pesé dans un sac à «stomacher», dans un pot à mélangeur ou dans une bouteille de dilution auquel est ajouté le diluant.