



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES, DES COLIFORMES FÉCAUX  
ET DES E. COLI DANS LES ALIMENTS AU MOYEN DE LA MÉTHODE DU NPP

Donna Christensen  
Laboratoire de Calgary  
Agence canadienne d'inspection des aliments  
3650 36 St. N.W.  
Calgary (Alb.) T2L 2L1

Carol Crawford  
Laboratoire de Burnaby  
Agence canadienne d'inspection des aliments  
3155 Willingdon Green  
Burnaby (C.-B.) V5G 4P2

christensend@inspection.gc.ca

crawfordc@inspection.gc.ca

Rick Szabo  
Division de la recherche microbiologique  
Bureau de dangers microbiens  
DGPSA, Direction des aliments  
Repère postal : 2204A2  
Ottawa (Ont.) K1A 0L2

Rick\_Szabo@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

La méthode du nombre le plus probable (NPP) est applicable au dénombrement des coliformes, des coliformes fécaux et des *Escherichia coli* aérogènes dans les aliments, les ingrédients alimentaires et l'eau, y compris l'eau de contact chez les fabricants alimentaires, et vise à déterminer s'il y a conformité avec les exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues, la Loi sur l'inspection des viandes, la Loi sur les produits agricoles et la Loi sur l'inspection du poisson. Lorsqu'une méthode officielle est prescrite pour certains produits, il faut la suivre. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHBP-19 datée de juin 2001.

**Note :** La présente méthode ne doit **pas** servir à isoler et à dénombrer les sérotypes d'*E. coli* qui associées à la maladie humaine, en particulier le sérotype entérohémorragique O157:H7. Plusieurs des sérotypes pathogènes ne donnent pas une réaction positive à l'épreuve des coliformes fécaux, si bien que cette méthode ne permettra pas de les détecter et de les récupérer.

2. DESCRIPTION

La technique du NPP fait appel à la méthode de fermentation multitubes, au cours de laquelle au moins trois dilutions décimales de l'échantillon sont ensemencées dans des éprouvettes de bouillon et incubées

à une température précise, pendant une période donnée. La méthode est progressive : il faut d'abord déterminer si les éprouvettes contiennent des coliformes, déterminer ensuite si les éprouvettes contiennent également des coliformes fécaux, et enfin confirmer s'il y a présence d'*E. coli*. Il est possible d'estimer le nombre le plus probable de micro-organismes présents à l'aide d'un tableau statistique standard de NPP, selon le nombre d'éprouvettes indiquant la présence ou l'absence des trois groupes de micro-organismes.

Il a été démontré que la méthode donne des résultats satisfaisants pour la détection des coliformes, des coliformes fécaux et des *E. coli* aérogènes dans l'eau et dans les aliments contaminés naturellement (voir les références 8.1 - 8.5).

### 3. PRINCIPE

Les termes « coliformes » et « coliformes fécaux » n'ont aucune validité taxonomique et ne sont donc significatifs que lorsque leur présence est exprimée en fonction des paramètres d'analyse que sont le milieu, la durée et la température d'incubation. Voir le chapitre 8 de la référence 8.2 pour une analyse plus approfondie des définitions. Les coliformes, les coliformes fécaux et les *E. coli* sont considérés comme des « micro-organismes indicateurs ».

La présence de « micro-organismes indicateurs » dans les aliments transformés pour des motifs d'innocuité peut indiquer : 1) une transformation insuffisante ou une contamination après transformation et/ou 2) la croissance des micro-organismes (8.2). La présence de coliformes fécaux et de *E. coli* peut indiquer une contamination par des matières fécales; il faut toutefois comprendre que ces micro-organismes peuvent survivre et se multiplier dans divers milieux non intestinaux, y compris l'usine de transformation (8.2). Lorsqu'on détermine la présence de « micro-organismes indicateurs » dans un échantillon, **il faut évaluer les résultats par rapport aux limites de tolérance spécifiées par les normes et les lignes directrices gouvernementales, les organismes de la santé ou les spécifications internes d'un laboratoire**, sans oublier que les normes et les lignes directrices établies sont directement liées à la méthode utilisée pour développer ces normes.

Comme l'indique la section 1, la méthode du NPP peut permettre de déterminer la présence de coliformes, de coliformes fécaux et d'*E. coli* aérogènes dans l'eau et les aliments. En bref, cette méthode fait appel à la dilution en série des micro-organismes cibles dans l'échantillon, en cinq parties aliquotes, jusqu'à extinction (8.4). La concentration probable des micro-organismes cibles est ensuite estimée statistiquement à l'aide d'un tableau de NPP.

La production de gaz sert d'indication de la capacité de fermenter le lactose dans le bouillon LST (épreuve de la détermination des coliformes présomptifs). La production de gaz dans le bouillon BGLB est tenue pour une confirmation de la présence de coliformes. La production de gaz à 44,5 °C ou à 45 °C dans le bouillon EC sert de confirmation de la présence de coliformes fécaux. Enfin, lorsque les bouillons EC positifs sont ensemencés sur gélose L-EMB, l'apparition de colonies nucléées caractéristiques dont le centre est sombre, avec ou sans reflets métalliques, indique la présence d'*E. coli*. Les colonies caractéristiques sur gélose L-EMB doivent faire l'objet d'une confirmation faisant appel à d'autres épreuves biochimiques visant à démontrer la présence d'*E. coli*.

### 4. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'Annexe A du volume 2.

### 5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'Annexe B du volume 2.

Pour les mollusques et les produits du poisson, vous pouvez également avoir besoin de consulter les documents suivants :

- Manuel du programme canadien de contrôle de la salubrité des mollusques
- Manuel d'inspection des produits du poisson
- Manuel des normes et méthodes des produits du poisson

## 6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux listés ci-bas (1 à 8) sont disponibles dans le commerce et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'Annexe G du volume 3 ainsi que la référence citée en 8.8 pour la composition de chaque milieu.

**Note :** Si l'analyste utilise des variantes des milieux indiqués ici (qu'il s'agisse d'un produit disponible dans le commerce ou fabriqué à partir de zéro), il incombe à l'analyste ou au superviseur du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 1) Eau peptonée (0,1% et 0,5%)
- 2) Citrate de sodium aqueux (2,0 %), tempéré à 40-45 °C
- 3) Bouillon tryptosé au lauryl-sulfate (LST)
- 4) Bouillon lactosé au vert brillant et aux sels biliaires à 2 % (BGLB)
- 5) Bouillon d'*Escherichia coli* (EC) ou Bouillon d'EC avec MUG (4-méthylumbelliferyl-β-D-glucuronide).
- 6) Gélose à l'éosine et au bleu de méthylène de Levine (L-EMB) ou gélose Endo
- 7) Gélose MacConkey
- 8) Gélose nutritive (NA) ou autres géloses non sélectives
- 9) Bains-marie recouverts dotés d'un système de circulation afin de maintenir la température à 44,5°C et 45°C. Le niveau d'eau doit être au-dessus du milieu contenu dans les éprouvettes immergées.
- 10) Thermomètre étalonné et homologué
- 11) Incubateur, 35°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 (à l'exception des mollusques, pour lesquels les incubateurs doivent être maintenus à 35 ± 0,5°C). De même, des températures plus basses à 30 °C ou à 25 °C peuvent être à ± 1,0 °C près. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 °C ou 44,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs à ± 0,5 °C près, et celle des bains-marie, à ± 0,2 °C près. Des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

- 12) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 13) Cultures témoins (utiliser des cultures ATCC ou l'équivalent) :
 

témoin(s) positif(s) :	<i>E. coli</i> qui peut produire du gaz à 44,5 °C ou à 45 °C et peut fermenter le lactose et produire des réactions caractéristiques sur gélose L-EMB; si l'on utilise du bouillon EC-MG, une souche qui peut produire de la β-glucuronidase
témoin négatif pour EMB/IMViC :	<i>Enterobacter aerogenes</i> ou un bâtonnet Gram négatif équivalent qui ne donne pas de réactions « positives » sur gélose EMB et ne produit pas d'indole, donne une réaction négative à l'épreuve au rouge de méthyle, une réaction

positive à l'épreuve de Voges-Proskauer et une réaction positive à l'épreuve au citrate.

témoin négatif pour bouillons NPP : *Salmonella berta* ou un bâtonnet Gram négatif équivalent qui est négatif pour la production de gaz dans les bouillons NPP et dans le deuxième bouillon EC

**NOTE :** Certaines souches d'*E. aerogenes* donnent des réactions faussement positives dans des bouillons NPP (LST, BGLB et EC) en produisant une petite bulle de gaz. C'est pourquoi il faut utiliser *S. berta* ou une culture équivalente pour ces bouillons et *E. aerogenes* ou une culture équivalente pour la gélose EMB et les épreuves IMViC.

14) pH mètre capable de distinguer 0,1 unité de pH, dans l'échelle de pH de 5,0 à 8,0, ou papier indicateur capable de distinguer de 0,3 à 0,5 unité dans la même échelle.

15) Produits nécessaires à la confirmation (disponibles dans le commerce) :

On peut avoir besoin des produits suivants pour la confirmation : utiliser A ou B (voir 7.9). Le choix d'autres méthodes d'identification (7.9.5) peut demander d'autres milieux.

A. Milieu IMViC et réactifs :

- a. Bouillon de tryptone (ou de tryptophane)  
Réactifs pour l'épreuve de l'indole (disponibles dans le commerce)
- b. Bouillon de glucose tamponné  
Réactifs pour l'épreuve de Voges-Proskauer (disponibles dans le commerce)  
Solution de rouge de méthyle
- c. Gélose au citrate de Simmon (SC)

B. Trousses ou systèmes d'identification rapide (tels que API, Vitek ou l'équivalent)

## 7. MARCHE À SUIVRE

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités analytiques peuvent être combinées lorsque les exigences du plan d'échantillonnage applicable peuvent être rencontrées. Effectuer l'analyse en suivant les instructions ci-dessous :

### 7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

7.1.1 Avant l'analyse au laboratoire, sauf dans le cas des aliments stables à température de la pièce, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5 °C) ou au congélateur, selon la nature du produit. Faire dégeler 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. Il faut analyser les mollusques dans les 24 heures suivant le prélèvement des échantillons.

### 7.2 Préparation pour l'analyse

7.2.1 Avoir à sa disposition de l'eau peptonée stérile.

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

7.2.3 Placer les éprouvettes de bouillon LST en rangées de cinq et les marquer de façon à identifier l'échantillon et la dilution à ensemercer (tableau II).

### 7.3 Préparation de l'échantillon, mise en place initiale et rapport - Mollusques crus ou transformés

- 7.3.1 Pour tous les types de mollusques, il faut toujours utiliser de l'eau peptonée à 0,5 % pour toutes les dilutions.
- 7.3.2 Pour les mollusques non congelés, inclure seulement des animaux vivants dans l'échantillon. Choisir 10 animaux ou plus de manière à obtenir au moins 200 g de chair et de jus.
- 7.3.3 Racler toute excroissance et substance fragmentaire qui adhère à la coquille et brosser les mollusques (y compris les fentes à la jonction des coquilles) avec une brosse dure stérile sous un jet d'eau potable. Ne pas utiliser des robinets munis d'aérateurs. Laisser égoutter les mollusques dans un contenant propre ou sur des serviettes propres.
- 7.3.4 Se désinfecter les mains (avec de l'eau et du savon, rincer à l'eau potable puis rincer avec de l'alcool à 70%) ou désinfecter ses gants (trempés dans une solution d'iodophores ou dans un autre désinfectant approprié et rincer ensuite à l'eau potable) avant d'écailler les mollusques. On peut aussi utiliser des gants jetables désinfectés avec de l'alcool à 70%. Il est possible de porter des gants de protection en mailles d'acier sous les gants jetables pour éviter les blessures accidentelles. Utiliser un couteau à écaillage stérile pour ouvrir les mollusques en coupant les muscles adducteurs (ne pas ouvrir par la charnière) et recueillir la chair et le jus dans un contenant stérile.
- 7.3.5 Peser au moins 200 g de mollusques et de jus dans un bocal de mélangeur taré et ajouter un volume égal d'eau peptonée à 0,5 %. Mélanger pendant 1 à 2 minutes. L'homogénéat mélangé correspond à une dilution de 1:2.
- 7.3.6 Pour obtenir une dilution de 1:10, ajouter 20 g de l'homogénéat à 80 ml d'eau peptonée et agiter. Mélanger les dilutions en les agitant 25 fois en suivant un arc d'un pied (30 cm) pendant 7 secondes environ.
- 7.3.7 Préparer les dilutions décimales successives requises en utilisant une pipette stérile distincte pour effectuer chacun des transferts.
- 7.3.8 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant d'effectuer les transferts afin d'assurer que les micro-organismes présents sont distribués de façon uniforme.
- 7.3.9 Préparer les dilutions de l'échantillon immédiatement (dans les deux minutes suivant le mélange) puis ensemercer dans les éprouvettes. Ensemercer chacune des séries de cinq éprouvettes de bouillon LST avec chacune des dilutions à analyser suivant le schéma du tableau II :

Ensemencer les échantillons de mollusques dans le bouillon LST : 10 ml d'une dilution 1:10 dans chacune des 5 éprouvettes de bouillon LST à concentration double, 1 ml de dilution 1:10 dans chacune des 5 éprouvettes de bouillon LST à concentration simple, et 1 ml de dilution 1:100 dans chacune des 5 éprouvettes de bouillon LST à concentration simple.

**Note :** Le Programme canadien du contrôle de la salubrité des mollusques (PCCSM) précise que la durée totale de la mise en place de l'échantillon, à partir de l'écaillage jusqu'à la mise en incubateur des éprouvettes ensemençées, ne doit pas dépasser 20 minutes.

- 7.3.10 Suivre l'incubation du bouillon LST et les étapes de confirmation pour les coliformes, les coliforme fécaux et *E. coli*, selon les besoins, et consigner les résultats comme NPP par 100 g de mollusques, en suivant les instructions de l'Annexe D.

#### 7.4 Préparation de l'échantillon, mise en place initiale et rapport - Eau

- 7.4.1ensemencer chacune des séries de cinq éprouvettes de bouillon LST avec chacune des dilutions à analyser selon le schéma du tableau II :

ensemencer chacune des 5 éprouvettes de 10 ml de bouillon LST à concentration double (première rangée) avec 10 ml de l'échantillon d'eau non dilué. Ensemencer chacune des 5 éprouvettes de 10 ml de bouillon LST à concentration simple (deuxième rangée) avec 1 ml de l'échantillon d'eau non dilué. Ensemencer chacune des 5 éprouvettes de 10 ml de bouillon LST à concentration simple (troisième rangée) avec 0,1 ml de l'échantillon d'eau non dilué.

- 7.4.2 Suivre l'incubation du bouillon LST et les étapes de confirmation pour les coliformes, les coliforme fécaux et *E. coli*, selon les besoins, et consigner les résultats sous forme de NPP par 100 ml d'eau, en suivant les instructions de l'Annexe D.

#### 7.5 Préparation de l'échantillon, mise en place initiale et rapport - Toutes les autres denrées

- 7.5.1 Pour que l'unité d'analyse soit 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. Afin de réduire la charge de travail, on peut combiner les unités pour l'analyse. Il est recommandé qu'un échantillon composite ne contienne pas plus de 500 g.

- 7.5.2 Préparer une dilution 1:10 de l'aliment en y mélangeant de façon aseptique 11 (10) g ou ml (l'unité d'analyse) à 99 (90) ml du diluant requis, de la façon indiquée aux tableaux I et II. Si cinq sous-échantillons sont combinés pour l'analyse, mélanger de façon aseptique 50 g ou ml à 450 ml du diluant requis.

Pour les produits du poisson, on peut utiliser une autre méthode. Peser 100 g de produits du poisson et ajouter 300 ml d'eau peptonée à 0,1%. Mélanger pendant 2 minutes. L'homogénéat mélangé correspond à une dilution de 1:4. Peser 40 g de l'homogénéat dans 60 ml d'eau peptonée à 0,1% pour obtenir une dilution de 1:10. Pipetter dans le bouillon LST de la façon indiquée en 7.3.9 et exprimer les résultats sous forme de NPP/100g.

- 7.5.3 Dans le cas des produits qu'il faut homogénéiser, utiliser un mélangeur ou un stomacher pendant le temps minimum nécessaire pour produire une suspension homogène. Pour éviter de surchauffer, 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 part aliquote sous l'interface liquide/mousse.
- 7.5.4 Vérifier le pH de la suspension d'aliment. Si le pH ne se situe pas entre 5,5 et 7,5, il faut l'ajuster à 7,0 avec du NaOH 1N ou du HCl 1N stérile.
- 7.5.5 Laisser l'homogénéat (dilution 1:10) d'aliments secs reposer à la température de la pièce pendant 15 minutes. Dans tous les autres cas, poursuivre l'analyse sans tarder.
- 7.5.6 Préparer les dilutions décimales successives requises en utilisant une pipette stérile distincte pour effectuer chacun des transferts. Mélanger les dilutions en les agitant 25 fois en suivant un arc d'un pied (30 cm) pendant 7 secondes environ.
- 7.5.7 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant d'effectuer les transferts afin d'assurer que les micro-organismes présents sont distribués de façon uniforme.
- 7.5.8 Ensemencer chacune des séries de cinq éprouvettes de bouillon LST avec chacune des dilutions à analyser selon le schéma (tableau II) suivant.
- 7.5.9 Ensemencer chacune des 5 éprouvettes de 10 ml de bouillon LST à concentration simple (première rangée) avec 1 ml de la dilution  $10^{-1}$ . Ensemencer chacune des 5 éprouvettes

des rangées successives de bouillon LST à concentration simple avec 1 ml des autres dilutions.

- 7.5.10 Suivre l'incubation du bouillon LST et les étapes de confirmation pour les coliformes, les coliformes fécaux et *E. coli*, selon les besoins. Calculer le NPP par g (ml) d'aliment (par 100 g de mollusques ou de produits du poisson ou par 100 ml d'eau) en suivant les instructions de l'Annexe D pour convertir en NPP le nombre d'éprouvettes positives. Consigner les résultats.

## 7.6 Incubation du bouillon LST

- 7.6.1 Afin de vérifier les conditions de croissance dans les bains-marie à haute température, ensemercer le témoin positif des bouillons NPP dans une éprouvette de bouillon LST et le témoin négatif des bouillons NPP dans une éprouvette de bouillon LST pour chaque bain utilisé. Transférer dans tous les milieux utilisés aux différentes étapes de l'analyse. Préparer une éprouvette de milieu non ensemercé correspondant à chaque étape de l'analyse comme le témoin de milieu.
- 7.6.2 Mélanger doucement l'inoculum et le milieu par agitation ou par rotation, mais éviter d'emprisonner de l'air dans les ampoules de Durham.
- 7.6.3 Incuber les éprouvettes ensemençées de bouillon LST à 35 °C pendant 24 ± 2 h. Vérifier s'il y a eu production de gaz (la production de gaz peut être une bulle de gaz ou de l'effervescence), consigner les résultats et entreprendre les épreuves requises de confirmation de coliformes, de coliformes fécaux et d'*E. coli* pour les éprouvettes positives qui contiennent du gaz.
- 7.6.4 Incuber les éprouvettes qui ne contiennent pas de gaz (sauf pour les mollusques crus et les produits du poisson) pendant 24 ± 2 h de plus. Examiner, consigner le nombre d'éprouvettes supplémentaires qui contiennent du gaz, ajouter au résultat obtenu à l'étape 7.6.3 et soumettre les éprouvettes supplémentaires qui contiennent du gaz aux épreuves requises de confirmation de coliformes, de coliformes fécaux et d'*E. coli*.
- 7.6.5 S'il n'y a pas eu formation de gaz dans toutes les éprouvettes après 48 ± 4 h d'incubation (24 ± 2 h pour les mollusques crus et les produits du poisson), l'épreuve de présomption est négative.

## 7.7 Étapes de confirmation pour la détermination des coliformes

- 7.7.1 Utiliser du bouillon BGLB réparti en volumes de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules de Durham.
- 7.7.2 Mélanger le contenu des éprouvettes de bouillon LST positives, par agitation ou par rotation, et transférer une anse de chaque éprouvette dans une éprouvette de bouillon BGLB (éviter d'entraîner la pellicule). On peut utiliser des bâtonnets en bois stériles ou d'autres dispositifs appropriés pour effectuer les transferts.
- 7.7.3 Mélanger doucement l'inoculum et le milieu par agitation ou par rotation, mais éviter d'emprisonner de l'air dans les ampoules de Durham.
- 7.7.4 Incuber les éprouvettes de bouillon BGLB ensemençé à 35 °C pendant 24 ± 2 h. Vérifier s'il y a eu production de gaz (bulle de gaz ou effervescence) et consigner les résultats.
- 7.7.5 Incuber les éprouvettes négatives pendant 24 ± 2 h de plus. Examiner de nouveau, consigner le nombre d'éprouvettes positives supplémentaires et ajouter au résultat obtenu en 7.7.4.
- 7.7.6 S'il y a eu formation de gaz au cours de la période d'incubation de 48 ± 4 h, l'épreuve de confirmation est positive.

- 7.7.7 Calculer le NPP de coliformes confirmés par g (ml) d'aliment (par 100 g de mollusques ou de produits du poisson ou par 100 ml d'eau) en suivant les instructions de l'Annexe D pour convertir en NPP le nombre d'éprouvettes positives. Consigner les résultats.

## 7.8 Étapes de confirmation pour la détermination des coliformes fécaux

- 7.8.1 Utiliser du bouillon EC (avec ou sans MUG) réparti en volumes de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules de Durham.
- 7.8.2 Mélanger le contenu des éprouvettes positives de bouillon LST (obtenues en 7.6) par agitation ou par rotation et transférer une anse du contenu de chaque éprouvette dans une éprouvette de bouillon EC (éviter d'entraîner la pellicule). On peut utiliser des bâtonnets en bois stériles ou d'autres dispositifs appropriés pour effectuer les transferts. Ce transfert doit se faire en même temps que l'étape 7.7 ci-dessus.
- 7.8.3 Mélanger doucement l'inoculum et le milieu par agitation ou par rotation, mais éviter d'emprisonner de l'air dans les ampoules de Durham.
- 7.8.4 Incuber les éprouvettes de bouillon ECensemencées dans un bain-marie à 45 °C pendant 24 ± 2 h (pour les mollusques et les produits du poisson, incuber à 44.5°C). Maintenir le niveau de l'eau dans le bain-marie à au moins 1 cm au-dessus du niveau du milieu contenu dans les éprouvettes.
- 7.8.5 Examiner pour déterminer s'il y a eu production de gaz (bulle de gaz ou effervescence), consigner les résultats et soumettre toutes les éprouvettes positives à l'épreuve d'identification d'*E. coli* le jour même (7.9)
- 7.8.6 Incuber les éprouvettes négatives (sauf les mollusques crus et les produits du poisson) pendant 24 ± 2 h de plus. Examiner, consigner le nombre d'éprouvettes positives supplémentaires, ajouter aux résultats obtenus à l'étape 7.8.5 et entreprendre l'épreuve d'identification d'*E. coli* pour les éprouvettes positives supplémentaires.
- 7.8.7 S'il n'y a pas eu formation de gaz dans toutes les éprouvettes après 48 ± 4 h d'incubation (24 ± 2 h pour les mollusques crus et les produits du poisson), l'épreuve de présomption est négative.
- 7.8.8 La production de gaz pendant les 48 ± 4 h d'incubation (24 ± 2 h pour les mollusques et les produits du poisson crus) constitue un résultat positif à l'épreuve de détermination des coliformes fécaux.
- 7.8.9 Il faut aussi examiner les éprouvettes contenant le bouillon EC-MUG à la lumière UV (366 nm) pour y déceler l'activité de la glucuronidase. Une fluorescence bleu-vert indique une épreuve présomptive positive d'*E. coli*. Ces éprouvettes peuvent servir aux épreuves décrites en 7.9, qui visent à confirmer la présence d'*E. coli*.

<p><b>Précautions :</b> Suivre les mesures de sécurité décrites dans les instructions du fabricant pour utiliser la lumière UV. Il faut aussi examiner les témoins négatifs du bouillon EC-MUG à la lumière UV pour s'assurer qu'il n'y a pas de fluorescence dans les éprouvettes.</p>
---

- 7.8.10 Calculer le NPP de coliformes fécaux par g (ml) d'aliment (par 100 g de mollusques ou de produits du poisson ou par 100 ml d'eau) en suivant les instructions de l'Annexe D pour convertir en NPP le nombre d'éprouvettes positives. Consigner les résultats.

## 7.9 Étapes de confirmation pour l'identification d'*E. coli*

- 7.9.1 Agiter doucement chacune des éprouvettes positives de bouillon EC contenant du gaz ou chacune des éprouvettes de bouillon EC-MUG fluorescent (7.8.5 et 7.8.6) et ensemercer en stries une anse de la culture sur une boîte de gélose L-EMB ou Endo.

- 7.9.2 Incuber les boîtes de gélose à 35 °C pendant 18 à 24 h et les examiner afin de déceler la présence de colonies non mucoïdes, nucléées, dont le centre est sombre, avec ou sans reflets métalliques, lesquelles indiquent la présence d'*E. coli*.

**Note :** Il incombe au superviseur du laboratoire de déterminer les dilutions et les séries d'éprouvettes NPP présumées (éprouvettes positives pour production de gaz) qui doivent faire l'objet de la confirmation (et, subséquemment, le nombre de colonies prélevé par boîte) afin d'établir convenablement le NPP confirmé final.

- 7.9.3 Si les colonies sont bien isolées sur les géloses L-EMB ou Endo, prélever une colonie typique et l'ensemencer sur une gélose non sélective telle que la gélose NA ( les géloses EMB ou MacConkey peuvent aussi être utilisées). Avant d'entreposer les boîtes à 4 °C, encercler sur la gélose EMB une autre colonie typique à être placée sur milieu non sélectif si la première colonie n'est pas confirmée comme *E. coli*. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 h. Utiliser ces cultures pour procéder à l'épreuve de confirmation.

Si les colonies ne sont pas bien isolées sur les boîtes de gélose L-EMB ou Endo, prélever deux colonies typiques et réensemencer sur une gélose EMB afin d'obtenir des colonies isolées. Choisir une colonie typique bien isolée de l'une des géloses EMB et ensemencer sur une gélose non sélective telle que la gélose NA (les géloses EMB ou MacConkey peuvent aussi être utilisées). Réfrigérer la deuxième gélose EMB au cas où il fallait l'utiliser ultérieurement. Incuber comme indiqué ci-dessus et utiliser ces cultures pour procéder à l'épreuve de confirmation.

**Note :** La confirmation peut être faite soit en effectuant les épreuves GIMViC (7.9.4) ou en utilisant une trousse d'identification rapide (7.9.5).

#### 7.9.4 GIMViC

À partir des géloses ensemencées (NA, EMB ou MacConkey), inoculer une éprouvette de bouillon EC (milieu G) et les milieux IMViC. L'ensemble des milieux GIMViC comprend le milieu « G » qui est le deuxième bouillon EC, le milieu « I », qui est le bouillon de tryptone, les milieux « M » et « V » qui sont du bouillon glucosé tamponné, et le milieu « C », qui est la gélose au citrate de Simmon. Si les épreuves GIMViC ne sont pas effectuées dans les 96 h suivant l'ensemencement des géloses non sélectives, préparer des pentes ou géloses fraîches avant d'ensemencer les milieux GIMViC.

Pour chacun des isolats à identifier, inoculer une éprouvette de chacun des milieux GIMViC. Ensemencer les témoins positif et négatif d'IMViC dans chacun des milieux IMViC et les témoins positif et négatif de NPP dans le deuxième bouillon EC. On peut aussi effectuer les épreuves GIMViC au moyen de systèmes d'analyse disponibles dans le commerce.

##### Production de gaz à 44,5 °C ou à 45 °C (G)

Incuber les éprouvettes ensemencées de milieu G (bouillon EC) dans un bain-marie à 44,5 °C ou à 45,0 °C pendant 24 ± 2 h. Vérifier s'il y a production de gaz. S'il n'y a pas de gaz, incuber pendant 24 ± 2 h de plus et examiner de nouveau. Consigner les résultats.

##### Indole (I)

Incuber les éprouvettes ensemencées de bouillon de tryptone ou de tryptophane à 35 °C pendant 24 ± 2 h. Ajouter à chaque éprouvette du réactif pour l'indole (disponible dans le commerce) en suivant les instructions du fabricant. L'apparition d'une couleur rouge foncé dans la couche d'alcool indique une réaction positive. Une couleur orange indique probablement la présence de skatole et la réaction peut être consignée comme ±. On considère que la couleur jaune indique une réaction négative.

### Épreuve au rouge de méthyle (RM) et de Voges-Proskauer (VP) (MVi)

Ensemencer deux éprouvettes de bouillon glucosé tamponné et incubé à 35 °C pendant 48 ± 2 h. Utiliser les réactifs RM et VP (disponibles dans le commerce) en suivant les instructions du fabricant. La réaction de VP est positive si une couleur rose éosine fait son apparition après 5 à 10 minutes. L'épreuve au RM est positive s'il y a formation d'une couleur rouge et négative si la couleur est jaune.

### Épreuve au citrate de Simmon (C)

Pour ensemer les pentes de gélose SC, utiliser une aiguille droite et appliquer une petit inoculum. Éviter de transférer des nutriments avec l'inoculum, car ces nutriments (carbone) pourraient provoquer la formation d'une couleur bleue et une interprétation erronée. Incuber les pentes de gélose à 35 °C pendant 48 ± 2 h et observer pour y déceler toute croissance. Toute croissance visible (réaction positive) est généralement accompagnée d'un changement de couleur, qui vire du vert au bleu foncé.

### Interprétation

Le tableau III contient les réactions GIMViC caractéristique d'*E. coli*. On peut au besoin différencier les coliformes courants en utilisant les données du tableau IV.

Si l'on obtient, dans les milieux GIMViC, des réactions caractéristiques d'*E. coli*, il n'est pas nécessaire d'analyser le deuxième isolat. Cependant, si le premier isolat présente des résultats non caractéristiques des milieux GIMViC, il faut soumettre le deuxième isolat aux réactions GIMViC. Répéter les étapes de confirmation. Si les deux isolats ne produisent pas des résultats IMViC typiques d'*E. coli*, on considère alors qu'il n'y a pas d'*E. coli* dans l'éprouvette de bouillon EC primaire d'où proviennent les isolats.

#### 7.9.5 Trousses d'identification rapide

On peut également utiliser des trousse d'identification rapide pour identifier *E. coli*. Suivre les instructions du fabricant.

#### 7.9.6 Calcul du NPP

Calculer le NPP d'*E. coli* par g(ml) d'aliment (par 100 g de mollusques ou de produits du poisson ou par 100 ml d'eau) en suivant les instructions de l'Annexe D du volume 2, en fonction du nombre d'éprouvettes contenant des isolats qui ont produit des réactions GIMViC caractéristiques d'*E. coli* indiquées ci-dessus ou confirmées comme *E. coli* au moyen de trousse d'identification rapide.

## 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 American Public Health Association. 1984. Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish; Quatrième édition. A.E. Greenberg et D.A. Hunt (éds.). American Public Health Association Inc., Washington, D.C.
- 8.2 American Public Health Association. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods; Quatrième édition. Frances P. Downes et Keoth Ito (éds.). American Public Health Association, Washington, D.C.
- 8.3 American Public Health Association. 1992. Standard Methods for the Examination of Dairy Products; 16<sup>e</sup> édition. R.T. Marshall (éd.). American Public Health Association Inc., Washington, D.C.
- 8.4 American Public Health Association. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water; Vingtième édition. Lenore Clesceri, A.E. Greenberg et A.D. Eaton (éds.). American Public Health Association, Inc., Washington, D.C.

- 8.5 International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1978. Microorganisms in Foods; Their Significance and Method of Enumeration; Deuxième édition; University of Toronto Press.
- 8.6 McGuire, O.E. 1964. Wood Applicators for the Confirmatory Test in Bacteriological Analysis of Water. Public Health Reports. **79**: 812-814.
- 8.7 Powers, E.M. et T.G. Latt. 1977. Simplified 48-Hour IMViC Test: an Agar Plate Method. Appl. Environ. Microbiol. **34**: 274-279.

TABLEAU 1. Préparation de la dilution initiale

Type de produit alimentaire	Préparation*	Traitement
<b>Liquides :</b> lait, eau, etc.	pipetter directement dans le LST ou dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
liquides visqueux	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 mélangeur ou au «stomacher»
tous les fromage	peser dans du citrate de sodium ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) aqueux à 2 % porté au préalable à 40-45 °C	passer au mélangeur ou au «stomacher»
épices	peser dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
mollusques, produits du poisson	peser dans le diluant à l'eau peptonée	passer au mélangeur ou au stomacher

\* On peut mettre l'échantillon dans un sac de stomacher, un bocal de mélangeur ou une bouteille de dilution vide et ajouter le diluant avant de mélanger.

TABLEAU II. Méthode d'identification et d'ensemencement

Inscription sur les éprouvettes*	Dilution		Volume de dilution ensemencé dans les éprouvettes de bouillon de LST	Quantité du produit que renferme chaque éprouvette
<b>EAU</b>				
1	non dilué	$10^1$	10 ml d'eau non diluée dans 10 ml de milieu à concentration double	10 ml
0	non dilué	$10^0$	1 ml d'eau non diluée dans 10 ml de milieu à concentration simple	1 ml
-1	non dilué	$10^{-1}$	0,1 ml d'eau non diluée dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,1 ml
<b>MOLLUSQUES CRUS (optionnel pour les produits du poisson)</b>				
0	non dilué	$10^0$	10 ml d'une dilution à $10^{-1}$ de solides dans 10 ml de milieu à concentration double	1 g
-1	1:10	$10^{-1}$	1 ml d'une dilution à $10^{-1}$ dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,1 g
-2	1:100	$10^{-2}$	1 ml d'une dilution à $10^{-2}$ dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,01 g
<b>TOUTES LES AUTRES DENRÉES</b>				
0	non dilué	$10^0$	1 ml de liquide non dilué dans 10 ml de milieu à concentration simple	1 ml
0	non dilué	$10^0$	10 ml d'une dilution à $10^{-1}$ de solides dans 10 ml de milieu à concentration double	1 g
-1	1:10	$10^{-1}$	1 ml d'une dilution à $10^{-1}$ dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,1 g ou ml
-2	1:100	$10^{-2}$	1 ml d'une dilution à $10^{-2}$ dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,01 g ou ml
-3	1:1000	$10^{-3}$	1 ml d'une dilution à $10^{-3}$ dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,001 g ou ml
-4	1:10000	$10^{-4}$	1 ml d'une dilution à $10^{-4}$ dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,0001 g ou ml

On peut ensemercer d'autres dilutions de l'aliment de la même façon, dans le milieu à concentration simple, selon le niveau anticipé de contamination de l'aliment. Pour l'inoculation de la dilution initiale des mollusques, voir la section 7.3

\* On peut utiliser d'autres systèmes d'identification.

TABLEAU III

Résultats GIMViC typiques des biotypes *E. coli*

	Gaz à 44,5 °C – 45 °C	Indole	Rouge de méthyle	Voges- Proskauer	Citrate
	G	I	M	V	C
Type I	+	+	+	-	-
Type II (anaérogène)	-	-	+	-	-

Tableau IV\*\*

Différenciation des coliformes communs

	Formation de gaz dans bouillon EC à 44,5 °C- 45 °C	Test à l'indole	Test au rouge de méthyle	Réaction Voges-Proskauer	Croissance sur citrate
<i>Escherichia coli</i>					
Type I (typique)	+	+	+	-	-
Type II (anaérogène)	-	-	+	-	-
Intermédiaires					
Type I	-	-	+	_*	+
Type II	-	+	+	_*	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>					
Type I	-	-	-	+	+
Type II	-	+	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>					
Irrégulier	-	-	-	+	+
Type I	-	+	+	-	-
Type II	+	-	+	-	-
Type VI	+	-	-	+	+
Irrégulier					
autres types			Réactions variables		

\* On constate à l'occasion des réactions positives faibles.

\*\* Référence 8.5