



## DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

## OTTAWA

DÉNOMBREMENT DES *E. coli* ET DES COLIFORMES  
DANS DES PRODUITS ET DES INGRÉDIENTS ALIMENTAIRES  
AU MOYEN DE PLAQUES DE DÉNOMBREMENT DE *E. coli* PETRIFILM<sup>MD</sup> 3M<sup>MD</sup>

Division de l'évaluation, Bureau de dangers microbiens

Direction des aliments, DGPSA

Repère postal : 2204A1

Ottawa (Ontario) K1A OL2

Don\_Waburton@hc-sc.gc.ca

**1. APPLICATION**

Cette méthode s'applique au dénombrement des *Escherichia coli* et d'autres coliformes dans des produits et des ingrédients alimentaires. Ce produit peut aussi servir à l'échantillonnage environnemental (voir Méthode de laboratoire MFLP-41A et MFLP-41B). Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-34 datée d'avril 1997.

**Ne pas utiliser cette plaque seule pour la détection de *E. coli* O157.** Comme la plupart des autres milieux pour les coliformes et *E. coli*, cette plaque n'indiquera pas de façon spécifique si des souches O157 sont présentes. Puisque la plupart des souches O157 sont des *E. coli* atypiques, elles apparaîtront comme des non-*E. coli* coliformes (rouge avec gas).

**2. PRINCIPE**

Les plaques Petrifilm sont un produit prêt à utiliser mis au point par la société 3M, de St. Paul, MN. Des pellicules sont recouvertes de milieux de culture; il n'est donc pas nécessaire de préparer les milieux et des économies en main-d'œuvre et en temps sont ainsi réalisées. Il est possible de dénombrer les *E. coli* et autres coliformes au moyen des plaques Petrifilm de dénombrement *E. coli* (EC). On utilise des plaques de culture bactérienne contenant un milieu sec et un gélifiant hydrosoluble à froid. Des échantillons de 1 mL sont ajoutés directement sur les plaques. Une pression est appliquée sur la pellicule supérieure avec le diffuseur en plastique afin d'étaler l'échantillon sur 20 cm<sup>2</sup>. Après avoir laissé le gélifiant se solidifier, les plaques sont ensuite incubées et dénombrées. Des études de validation et des études collaboratives ont démontré que la méthode des plaques Petrifilm EC ne diffère pas de façon significative par rapport aux méthodes traditionnelles (7.1, 7.2, 7.5 - 7.8, 7.10, 7.11, 7.14, 7.15).

**3. DÉFINITIONS**

3.1 Voir l'appendice A du volume 2.

- 3.2 Les plaques de dénombrement Petrifilm EC contiennent des nutriments modifiés du milieu au rouge-violet et aux sels biliaries (VRB); un gélifiant hydrosoluble à froid; du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl--D-glucuronide (BCIG) comme indicateur de l'activité de la glucuronidase; et du chlorure de 2, 3, 5-triphényltétrazolium (TTC) comme indicateur. La plupart des *E. coli* contiennent une enzyme glucuronidase (7.15). La glucuronidase provoque le clivage de l'indicateur BCIG et la formation de colonies bleues, ce qui différencie l'*E. coli* des autres coliformes.
- 3.3 *E. coli* et les autres coliformes produisent du gaz provenant de la fermentation du lactose dans le milieu. Le gaz est emprisonné par les pellicules et apparaît sous forme d'une petite bulle(s) associée à une colonie rouge ou bleue sur la plaque.
- 3.4 Des diffuseurs en plastique sont fournis avec les plaques Petrifilm. La face lisse et plate sert à étaler l'échantillon dans la zone de croissance.

#### 4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'appendice B du volume 2.

#### 5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

- 1) Plaques Petrifilm de dénombrement *E. coli* (EC) 6404/6414 (3M Canada Inc., Case postale 5757, London (Ontario) N6A 4T1).
  - A. Plaques Petrifilm EC. Conserver à une température de 8 °C ou moins.
  - B. Diffuseur en plastique.
  - C. Feuillet d'instructions. Le « Guide d'interprétation » est disponible sur demande.
- 2) Diluants appropriés : tampon phosphate Butterfield (7.9), tampon phosphate IDF (7.13), diluant peptone-sel (méthode ISO 6887), eau peptonée à 0,1 %, solution saline (0,85 à 0,9%), bouillon Lethen sans bisulfate ou eau distillée. Si un tampon au citrate est indiqué dans une méthode standard, le remplacer par un tampon phosphate Butterfield préchauffé (40 ° - 45 °C).

**Note:** Ne pas utiliser de tampon au citrate ou de thiosulfate de sodium avec la méthode des plaques Petrifilm.

- 3) Appareil « stomacher », mélangeur ou l'équivalent.
- 4) Incubateur capable de maintenir une température de 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. 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.

- 5) pH mètre ou papier pH capable de distinguer de 0,3 à 0,5 unité pH dans l'échelle de pH 5,0 à 8,0
- 6) NaOH 1N
- 7) Compteur de colonies et/ou loupe lumineuse

## 6. MARCHE À SUIVRE

Procéder de la façon suivante pour effectuer l'analyse :

### 6.1 Manipulation de l'échantillon d'aliment

6.1.1 À l'exception des aliments stables à la température de la pièce, garder les échantillons au réfrigérateur (2-8 °C) ou au congélateur avant de les analyser 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.

6.1.2 Analyser les échantillons le plus rapidement possible après leur arrivée au laboratoire.

### 6.2 Préparation pour l'analyse

6.2.1 Avoir du diluant stérile à portée de la main. Désinfecter la surface de travail.

6.2.2 Déposer la plaque Petrifilm sur une surface plate. Identifier l'échantillon sur la pellicule.

### 6.3 Préparation de l'échantillon

6.3.1 Pour que l'unité d'analyse soit représentative, agiter les liquides jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas des solides, prélever des portions représentatives à différents endroits de l'échantillon. Préparer une dilution 1:10 au moyen d'un diluant approprié (voir 5.2). Mélanger soigneusement.

6.3.2 Dans le cas des produits acides, ajuster le pH de l'échantillon dilué entre 6,6 et 7,2 avec du NaOH 1N.

### 6.4 Inoculation et incubation

6.4.1 Relever la pellicule supérieures et inoculer avec précaution 1 mL d'échantillon ou d'échantillon dilué au centre de la pellicule inférieure. Utiliser une pipette ou un pipetteur pour l'inoculation de l'échantillon.

6.4.2 Rabattre doucement la pellicule supérieures sur l'échantillon en évitant d'emprisonner des bulles d'air.

6.4.3 Distribuer l'échantillon également en appuyant sur le centre du diffuseur en plastique, la face plate en dessous. Ne pas faire glisser le diffuseur sur la pellicule. Laisser reposer la plaque pendant au moins une minute afin de laisser solidifier le gel.

6.4.4 Remettre les plaques inutilisées dans le sachet métallique. Replier l'extrémité ouverte du sachet et sceller avec du ruban adhésif. Conserver le sachet dans un endroit sec et frais. Il faut utiliser les plaques au plus tard un mois après avoir l'ouverture du sachet. L'exposition des plaques Petrifilm à une température de plus de 25 °C ou à une humidité >50 % HR peut en affecter le rendement. Ne pas utiliser les plaques qui présentent une décoloration orange ou brune. Chaque sachet de plaques Petrifilm porte une date de péremption et un numéro de lot. Le numéro de lot figure aussi sur chaque pellicule.

6.4.5 Incuber les plaques à plat, le côté clair sur le dessus, en piles d'au plus 20 plaques. Incuber les plaques pendant  $24 \pm 2$  heures. Examiner les plaques pour *E. coli* et autres coliformes. Il faut plus de temps à certaines colonies d'*E. coli* pour former le précipité bleu. Réincuber les plaques pendant  $24 \pm 2$  heures de plus afin de détecter tout *E. coli* supplémentaire (7.1 et 7.2).

## 6.5 Lecture des résultats

- 6.5.1 Effectuer le dénombrement rapidement après l'incubation. S'il est impossible de le faire sur-le-champ, garder les plaques dans le congélateur. Il faut toutefois éviter d'en prendre l'habitude.
- 6.5.2 Utiliser un compteur de colonies standard et, au besoin, une loupe lumineuse pour faciliter le dénombrement.
- 6.5.3 La zone de croissance circulaire a environ 20 cm<sup>2</sup>. On peut effectuer des estimations lorsque les plaques contiennent plus de 150 colonies en comptant le nombre moyen de colonies dans un ou plusieurs carrés représentatifs et en calculant la moyenne par carré. Multiplier la moyenne par 20 pour déterminer le nombre total par plaque.
- 6.5.4 Calculer le nombre de colonies par mL ou g d'échantillon à partir du nombre de colonies calculé sur des plaques choisies à des dilutions qui donnent un résultat significatif sur le plan statistique.
- 6.5.5 Lorsque l'on compte des colonies sur des plaques en double de dilutions consécutives, il faut calculer le nombre moyen de colonies pour chaque dilution avant de calculer le nombre moyen de micro-organismes.
- 6.5.6 Pour isoler des colonies afin de les identifier avec plus de précision, relever la pellicule supérieure et prélever la colonie sur le gel.

## 6.6 Interprétation des résultats

- 6.6.1 Les colonies bleues associées à la formation de gaz confirment la présence d'*E. coli*. Il se peut que les colonies qui ne sont pas associées à la présence de bulles de gaz (bulle > un diamètre de colonie de distance de la colonie) ne soient pas des *E. coli*.
- 6.6.2 Les autres colonies de coliformes seront rouges et associées à des bulles de gaz. Le nombre total de coliformes est constitué des colonies rouges associées à des bulles de gaz et des colonies bleues associées à des bulles de gaz à 24 heures.
- 6.6.3 Ne pas compter les colonies sur la barrière de mousse blanche parce qu'elles sont éloignées de l'influence sélective du milieu.
- 6.6.4 Lorsqu'ils sont présents en grandes quantités, certains *E. coli* et autres coliformes peuvent provoquer une ou plusieurs des situations suivantes : formation excessive de gaz, petites colonies indistinctes ou zone de croissance rouge foncé ou bleue. *E. coli* fait virer la zone de la croissance au bleu tandis que des concentrations élevées d'autres coliformes (autres que *E. coli*) font virer la zone de croissance au rouge foncé. Lorsque ces situations se produisent, diluer davantage l'échantillon afin d'obtenir un compte plus précis.
- 6.6.5 Certains *E. coli*, incluant la plupart des *E. coli* O157:H7 (7.12), sont négatifs à la glucuronidase et ne produisent pas le précipité bleu. De plus, *E. coli* O157:H7 peut ne pas croître à des températures supérieures à 42 °C.

## 7. RÉFÉRENCES

- 7.1 AOAC International. 2000. Official Method 991.14. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17<sup>th</sup> Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- 7.2 AOAC International. 2000. Official Method 998.08. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17<sup>th</sup> Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- 7.3 American Public Health Association (APHA). 1992. Standard Methods For the Examination of Dairy Products, 16th ed. APHA, Washington, DC. pp. 248, 251-252, 261-262.

- 7.4 APHA. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. APHA, Washington, DC. pp. 61, 80-89, 338.
- 7.5 Baylis, C. L., C de W Blackburn and S.B. Pettitt. 1994. Evaluation of Petrifilm Plates for the Enumeration of Total Aerobic Flora, Coliforms, and *E. coli*, in Foods. Leatherhead Food RA.
- 7.6 Betts, G. D., R.P. Betts and R. Taylor. 1994. Technical Memorandum N. 703: Evaluation of 3M Petrifilm for Aerobic Plate Count, Yeast and Mould Count and *Escherichia coli* Count. Campden Food & Drink Research Association, Chipping Campden Gloucestershire, UK.
- 7.7 Curiale, M. S., T. Sons, D. McIver, J.S. McAllister, B. Halsey, D. Roblee and T.L. Fox. 1991. Dry Rehydratable Film for Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Foods: Collaborative Study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. **74**: 635-648.
- 7.8 Curiale, M. S., P. Fahey, T.L. Fox and J.S. McAllister. 1989. Dry Rehydratable Films for Enumeration of Coliforms and Aerobic Bacteria in Dairy Products: Collaborative Study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. **72**: 312-318.
- 7.9 Food and Drug Administration. 1998. Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. Rev. A. AOAC International, Gaithersburg, MD. 4.11, Appendix 1.10 and Appendix 3.64 (R11).
- 7.10 Ganger, V., M.S. Curiale, K.L. Lindberg, and S. Gambrel-Lenarz. 1999. Dry Rehydratable Film Method for Enumerating Confirmed *Escherichia coli* in Poultry, meats, and Seafood: Collaborative Study. J. AOAC Int. **82**:73-78.
- 7.11 Ginn, R. E., V.S. Packard and R.L. Fox. 1986. Enumeration of Total Bacteria and Coliforms in Milk by Dry Rehydratable Film Methods: Collaborative Study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. **69**: 527-531.
- 7.12 Hayes, P.S., K. Blom, P. Feng, J. Lewis, N.A. Strockbine and B. Swaminathan. 1995. Isolation and Characterization of a  $\beta$ -D-Glucuronidase-Producing Strain of *Escherichia coli* O157:H7 in the United States. J. Clin. Microbiol. **33**:3347-3348.
- 7.13 International Dairy Federation (IDF). 1996. International IDF Standard 122C:1996. Milk and Milk Products - Preparation of Samples and Dilutions for Microbiological Examination. Brussels, Belgium.
- 7.14 Matner, R. R., T.L. Fox, D.E. McIver and M.S. Curiale. 1990. Efficacy of Petrifilm E. coli Count Plates for *E. coli* and Coliform Enumeration. J. Food Protection. **53**: 145-150.
- 7.15 Matushek, M. G., M.S. Curiale, J.S. McAllister and T.L. Fox. 1992. Comparison of Various Plating Procedures for the Detection and Enumeration of Coliforms in Ice Cream and Ice Milk. J. Food Protection. **55**: 113-115.
- 7.16 Ogden, I.D. and A.J. Watt. 1991. An Evaluation of Fluorogenic and Chromogenic Assays for the Direct Enumeration of *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiological **13**:212-215.