



**DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ**

**OTTAWA**

**DÉNOMBREMENT DES ESCHERICHIA COLI DANS LES ALIMENTS PAR  
LA MÉTHODE DE LA MEMBRANE FILTRANTE QUADRILLÉE ET HYDROPHOBE (MFQH)**

**P.I. Peterkin, A.N. Sharpe et H. Wang**  
**Bureau des dangers microbiens**  
**Direction générale des produits de santé et des aliments**  
**Repère postal : 2204A2**  
**Ottawa (Ont.) K1A 0L2**

**Courriel : Haiyan\_Wang@hc-sc.gc.ca**

**1. APPLICATION**

La méthode peut servir à déterminer le nombre des *E. coli* de biotype 1 dans les aliments autres que les germes de haricot ou d'alfalfa afin d'établir s'il y a conformité avec les exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Lorsqu'il existe une méthode officielle pour un aliment donné, il faut la suivre. Cette version révisée remplace la méthode MFHPB-26 datée d'avril 1997.

**2. DESCRIPTION**

Cette méthode donne des résultats satisfaisants avec le boeuf et le boeuf haché, le poulet et le poulet désossé, le poisson, les noix, le poivre noir, le fromage et les haricots verts (9.2, 9.3, 9.4). L'Association of Official Analytical Chemists (9.2) considère comme «Official Final Action» la méthode de la MFQH. La méthode sert depuis avec succès pour dénombrer la présence de *E. coli*, du biotype 1, dans les aliments et les ingrédients alimentaires, à l'exception des haricots et des germes de haricot et d'alfalfa dont la population importante de *Klebsiella* spp. positif à l'indole empêche de déterminer avec précision le nombre de *E. coli*.

**3. PRINCIPES**

L'analyse au moyen de la MFQH prend de 24 à 30 heures et donne des résultats supérieurs et plus précis que la méthode du nombre le plus probable (NPP) (MFHPB-19), et des résultats égaux ou supérieurs à ceux de la méthode de l'inoculation directe (MFHPB-27)(9.4). Une seule dilution donne une numération exacte pour une plage étendue de niveaux de contamination. La précision du dénombrement est parfois meilleure que lorsqu'on utilise des boîtes ordinaires ou les autres membranes filtrantes, car la MFQH diminue l'effet de l'acuité visuelle individuelle sur le dénombrement (9.5). Lorsqu'on prévoit une faible numération, on peut souvent abaisser la limite de détection en filtrant une plus grande quantité de la suspension.

La numération de *E. coli* dont on soupçonne la présence est fondée sur des températures sélectives d'incubation et la production d'indole par la formation de cellules dont la couleur varie du rose au rouge (9.5). Cette méthode détecte les *E. coli* classés comme fermenteurs tardifs du lactose ou bactéries anaérogènes (environ 10 % des souches) qui passent inaperçus avec la méthode du NPP, mais elle ne distingue pas les

souches de *E. coli* non productrices d'indole (entre 3 et 5 % des souches). L'analyse est très spécifique. Les taux de confirmation globaux de la présence de colonies productrices d'indole sur les membranes filtrantes s'établissent à 95 % dans le cas du *E. coli* de biotype 1 (IMViC +++-), tandis qu'une autre tranche de 3,4 % confirme la présence de coliformes fécaux à cause de réactions IMViC +++- ou +++- (9.1). Ce niveau de spécificité a été confirmé de façon indépendante (9.6). C'est pourquoi il ne devrait pas normalement être nécessaire de confirmer la présence de *E. coli*. Comme la réaction de coloration de l'indole tue les cellules bactériennes, une analyse plus poussée de l'échantillon obligerait à reproduire la MFQH avant la coloration.

#### 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

Les milieux ci-dessous (3 à 5) sont disponibles sur le marché et il faut les préparer et les stériliser en suivant les instructions du fabricant.

- 1) MFQH (1 600 mailles, pores de 0,45  $\mu\text{m}$ ). (Disponible sous forme de filtres ISO-GRID chez Oxoid Ltd., Nepean (Ont.))
- 2) Pinces pour membranes filtrantes (Millipore Corp., Bedford, MA.)
- 3) Eau peptonée, (0,1 %) (PEP), ou diluant Peptone/Tween 80 (PT)
- 4) Boîtes de gélose nutritive (GN) (si une étape de réanimation est nécessaire).
- 5) Boîtes de gélose de triptone et de bile (TBA)
- 6) Solutions enzymatiques (annexe E du volume 2; 9.7) au besoin pour certains produits alimentaires.
- 7) Appareil Stomacher ou l'équivalent
- 8) Papier filtre Whatman n° 1, 7 cm de diamètre
- 9) Réactif de détection de l'indole
- 10) Appareil de filtration carré avec entonnoir et embouts de pipette de préfiltrage (Filtaflex Ltd., Case postale 1224, Almonte (Ont.)), ou unité de filtration ISO-GRID (Oxoid, Nepean (Ont.))
- 11) MFQH pour comptage manuel (Oxoid Ltd., Nepean (Ont.)) (facultatif)
- 12) Incubateur capable de maintenir une température de 44,5°C

**NOTE :** Il incombe à chaque laboratoire de veiller à ce que les températures des incubateurs ou des bains-marie soient maintenues au degré recommandé. 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 peut-être réglée à +/- 1,0 °C. Lorsqu'on recommande des températures plus élevées, toutefois, comme 43 ou 45,5 °C, il est crucial de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à +/-0,5 °C de la température recommandée parce que des températures plus élevées peuvent être mortelles pour le micro-organisme que l'on cherche à isoler.

## **7. MARCHE À SUIVRE**

Analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement. Effectuer le test en procédant de la façon suivante :

### **7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage**

7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder les unités d'échantillonnage réfrigérées (0 à 5 °C) ou congelées, selon la nature du produit, sauf dans le cas des aliments qui se conservent à la température de la pièce. Dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou pendant le temps et à la température nécessaires pour empêcher la croissance ou la mort des bactéries.

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 de l'eau peptonée stérile (PEP) ou du diluant stérile peptone/Tween 80 (PT), des boîtes de gélose nutritive (GN), des boîtes de gélose de tryptone et de bile (TBA) et les solutions enzymatiques nécessaires pour la catégorie des produits alimentaires (voir l'annexe E du volume 2;9.5). Utiliser le diluant PT lorsqu'on utilise l'appareil de filtration carré.

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

7.2.3 Indiquer clairement sur les boîtes de Pétri utilisées en double l'échantillon, l'unité d'échantillonnage, la dilution et la date d'ensemencement.

### **7.3 Préparation de dilutions**

7.3.1 Pour s'assurer que l'unité d'analyse est vraiment représentative, agiter les liquides ou les substances fluides jusqu'à l'homogénéité. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, constituer l'unité d'analyse en faisant plusieurs prélèvements à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.

7.3.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en ajoutant, dans des conditions aseptiques, 10 g ou mL (l'unité d'analyse) à 90 mL du diluant à l'eau peptonée ou PT. Il est préférable d'utiliser un mélangeur «Stomacher» pour mettre les organismes en suspension, car il réduit au minimum la quantité de débris alimentaires en suspension. Transférer une portion représentative de la dilution 1:10 pour préparer les dilutions en série nécessaires. Consulter l'annexe E du volume 2 afin de déterminer s'il faut procéder à un traitement enzymatique. Ce traitement n'est pas nécessaire pour les échantillons filtrés à une dilution de 1:100 ou plus.

7.3.2.1 Mélanger au «Stomacher» pendant une minute.

7.3.2.2 S'il faut mélanger la dilution 1:10 en l'agitant, agiter la bouteille de dilution 25 fois en effectuant des arcs de 30 cm pendant 7 secondes environ.

- 7.3.3 La filtration par la méthode de la MFQH élimine les acides ou autres inhibiteurs. Il n'est donc pas nécessaire de vérifier et d'ajuster le pH de la suspension.
- 7.3.4 La méthode de la MFQH permet d'effectuer des numérations à partir de suspensions contenant jusqu'à 5 000 organismes/mL. Il n'est habituellement pas nécessaire de préparer d'autres dilutions. Préparer au besoin des dilutions décimales successives en utilisant une pipette stérile différente pour chaque transfert. Noter la dilution (C) utilisée pour l'analyse.
- 7.3.5 Lorsqu'on s'attend à une numération faible, il faut filtrer plus de 1,0 mL de la suspension. Filtrer le volume total disponible en une seule opération. Ne pas essayer de filtrer des parts aliquotes successives de 1 mL. Noter le volume (V) filtré.
- 7.3.6 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant d'effectuer les transferts de façon à distribuer uniformément les micro-organismes présents.

#### **7.4 Filtration**

- 7.4.1 Agiter chaque sac de «Stomacher» ou bouteille de dilution pour remettre en suspension les matières qui pourraient s'y être déposées.
- 7.4.2 Tenir la MFQH avec des pinces stériles.
- 7.4.3 Suivre les instructions du fabricant pour utiliser l'appareil de filtration ou pour préfiltrer. Pipetter dans des conditions aseptiques 1,0 mL de la dilution choisie et ensemercer la MFQH. Ouvrir le robinet du filtre et laisser tout le liquide s'écouler. Enlever la MFQH de façon aseptique. Répéter l'essai en double.
- 7.4.4 Suivre les instructions du fabricant pour nettoyer l'appareil.
- 7.4.5 Répéter au besoin avec d'autres dilutions.

#### **7.5 Ensemencement et incubation**

- 7.5.1 Si les micro-organismes de l'échantillon ont pu être affectés par la congélation ou par un autre traitement, commencer par l'étape 7.5.2. Sinon, passer directement à l'étape 7.5.3.
- 7.5.2 Transférer la MFQH à la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive en la roulant sur la gélose de façon à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les boîtes de Pétri à l'envers en évitant d'en empiler plus de 3, à une température de 35 à 37 °C pendant 4 heures.
- 7.5.3 Transférer la MFQH à la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose TBA en la roulant sur la gélose de façon à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les boîtes de Pétri à l'envers, en évitant d'en empiler plus de trois, à 44,5 °C pendant 18 à 24 heures.

#### **7.6 Coloration**

- 7.6.1 Préparer le réactif de coloration en mélangeant des quantités égales (p. ex., 15 mL) de chacune des solutions 1 et 2 du réactif de détection de l'indole. LAISSER LE RÉACTIF DE COLORATION ATTEINDRE LA TEMPÉRATURE DE LA PIÈCE.
- 7.6.2 Déposer un papier filtre dans le couvercle d'une boîte de Pétri et verser dessus 1,5 mL du réactif de coloration à la température de la pièce.
- 7.6.3 Transférer la MFQH sur le papier filtre en évitant d'emprisonner des bulles d'air en-dessous. Maintenir à une température de 35 à 37 °C pendant 5 minutes ou à la température de la pièce pendant 15 minutes. Déposer de nouveau la MFQH à la surface de la gélose pour la numération.

## **7.7 Numération et établissement de la valeur de la MFQH**

- 7.7.1 Les colorations dont la teinte varie du rose au rouge à l'intérieur des mailles de la MFQH sont causées par des organismes producteurs d'indole et il faut les compter comme des *E. coli* de biotype 1.
- 7.7.2 Utiliser un interpréteur de MFQH pour effectuer une numération automatique. Suivre les instructions du fabricant.
- 7.7.3 Lorsqu'il faut effectuer une numérotation manuelle, utiliser un «Linecounter». La méthode de la MFQH donne des numérations précises sur une plage plus étendue qu'avec les boîtes de Pétri. Compter les MFQH qui contiennent de 20 à 1 580 mailles roses. Traiter avec prudence les résultats des MFQH contenant plus de 1 580 mailles roses.
- 7.7.3.1 Compter 1 (un) pour chaque maille dont la coloration est rose ou rouge. (NE PAS compter les colonies individuelles lorsqu'une maille contient plus d'une colonie rose.) Compter toutes les mailles roses, sauf lorsqu'il y en a de toute évidence plus de 200.
- 7.7.3.2 Lorsque la densité est plus élevée (jusqu'à 50 % des mailles occupées), tourner la MFQH jusqu'à ce que l'indicateur du centre soit à gauche ou à droite. Compter les mailles positives (roses) dans les quatre rangées situées immédiatement sous le centre et dans les quatre rangées situées immédiatement au-dessus du centre (8 rangées). Multiplier cette numération partielle de la MFQH par 5 pour estimer la valeur de la MFQH.
- 7.7.3.3 Lorsque la MFQH est tellement remplie qu'il semble plus facile de compter les mailles négatives (non roses), on peut le faire en procédant comme en (7.7.3.1) et (7.7.3.2). Soustraire le total négatif de la MFQH de 1 600 ou 320, selon le cas. Multiplier par 5 pour obtenir la valeur de MFQH si l'on n'a compté que le cinquième de la MFQH.
- 7.7.3.4 Lorsque toutes les mailles de la MFQH sont roses, noter que les colonies sont trop nombreuses pour être comptées.
- 7.7.4 Noter les valeurs de la MFQH des deux essais effectués en double. S'il n'y a aucune maille rose, indiquer zéro pour la valeur de la MFQH.

## **7.8 Calcul du nombre le plus probable de *E. coli***

Voir l'annexe C du volume 2 (9.7).

## **8. RÉSULTATS**

- 8.1 Indiquer le NPPUC moyen calculé en 7.8 en arrondissant à deux chiffres significatifs près (p. ex., inscrire  $2,9 \times 10^3$  pour 2 850).
- 8.2 Lorsque la dilution la plus faible ne donne aucune maille rose dans la MFQH, la valeur à indiquer est la moyenne la plus faible que l'on peut obtenir lorsqu'un volume donné est ensemencé sur une série de MFQH effectuées en parallèle, précédée par le signe «moins de» (<): p. ex., pour 1,0 mL et une série de MFQH en parallèle (1 mL par MFQH), la valeur est < 0.5. Il faut multiplier ce chiffre par le facteur de dilution de l'inoculum sur la MFQH.

## **9. RÉFÉRENCES**

- 9.1 Anderson, J.M. et A.C. Baird-Parker. 1975. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype 1 in food. J. Appl. Bacteriol. **39**:111-117.
- 9.2 AOAC. 1985. Official final action hydrophobic grid membrane filter method for detecting coliforms, fecal coliforms and *E. coli* in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**:481.
- 9.3 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**(6):1310-1315.
- 9.4 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* biotype 1 in foods. Can. J. Microbiol. **29**:1247-1252.
- 9.5 Sharpe, A.N. et P.I. Peterkin. 1988. *Membrane filter food microbiology*. Research Studies Press Ltd., Taunton, Somerset, U.K.
- 9.6 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.
- 9.7 Santé Canada. 1993. Annexes A, B, C et E, *Compendium de méthodes*. Volume 2. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.

## 10. PRÉPARATION DES MILIEUX

Lorsqu'on utilise la stérilisation à la vapeur, il est essentiel d'attendre assez longtemps pour laisser la charge parvenir à la température requise avant de chronométrer la période de stérilisation proprement dite. Cette période d'attente varie selon la nature et la taille de la charge. Il faut donc prévoir des temps d'exposition suffisants pour s'assurer que la stérilisation des solutions dans des contenants et des milieux de culture résistant à la chaleur est complète. Consulter le manuel du stérilisateur.

### 10.1 Gélose nutritive

Extrait de bœuf	3 g
Peptone	5 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1000 mL

Dissoudre les ingrédients et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Verser de 15 à 20 mL du mélange par boîte sur une surface plane. Les boîtes se gardent 8 semaines à 4 °C.

### 10.2 Diluant peptone/Tween 80

Peptone	1 g
Tween 80 (mono-oléate de polyoxyéthylène sorbitane)	10 g
Eau distillée	1000 mL

Dissoudre les ingrédients dans de l'eau distillée chaude. Verser dans des bouteilles de dilution pour obtenir 90 mL après passage à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

### 10.3 Eau peptonée

Peptone	10 g
---------	------

Eau distillée 1 000 ml

Mélanger les ingrédients dans de l'eau distillée et en porter le volume à 1 L. Mélanger soigneusement. Verser et passer à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

#### **10.4 Gélose de tryptone et de sels biliaires**

Tryptone	20 g
Sels biliaires n° 3	1,5 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1000 mL

Dissoudre les ingrédients et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Verser de 15 à 20 mL du mélange par boîte sur une surface plane. Les boîtes se gardent 4 semaines à 4 °C.

### **11. PRÉPARATION DES RÉACTIFS**

#### **11.1 Réactif de détection de l'indole**

Le réactif de détection de l'indole est composé d'un mélange de deux solutions à parts égales. Il faut utiliser le mélange dans les 15 minutes qui suivent la préparation.

##### Solution 1

4-Diméthylaminobenzaldéhyde	2,5 g
Éthanol (95 %)	90 mL
HCL concentré	10 mL

Brasser le mélange jusqu'à dilution. Ne pas chauffer. Préparer de la solution fraîche chaque semaine. Garder à l'obscurité à une température inférieure à 20 °C.

##### Solution 2

Persulfate de potassium	2,0 g
Eau distillée	200 mL

Brasser le mélange jusqu'à dilution. Garder à l'obscurité à une température inférieure à 20 °C. Se garde pendant 1 mois.

Vérifier le rendement de chaque nouveau lot hebdomadaire de réactif de détection de l'indole en l'appliquant sur une membrane filtrante contenant des colonies de *E. coli* reconnues comme productrices d'indole.