



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DU LAIT EN POUDRE

1. APPLICATION

La présente méthode s'applique à la recherche des bactéries du genre Salmonella dans le lait en poudre, conformément à l'article B.08.014A des Règlements sur les aliments et drogues.

2. ÉCHANTILLONNAGE

2.1 Définition des termes

2.1.1 Lot: Une quantité finie ou une unité de production qui peut être identifiée par le même code. S'il n'y a pas d'identification par code, un lot peut être considéré comme étant (a) la quantité de lait en poudre produite essentiellement sous des conditions identiques au même établissement et ne représentant pas plus que la production d'une journée; ou (b) la quantité de lait en poudre, fabriquée par un seul et même manufacturier; qui est disponible lors de l'échantillonnage à un endroit donné.

2.1.2 Échantillon: Les unités d'échantillonnage (sous-échantillons) prélevées par lot pour analyse.

2.1.3 Unité d'échantillonnage: Il s'agit ordinairement d'un format courant du produit renfermant au moins 100 g. Une unité d'échantillonnage est souvent désignée sous le nom de sous-échantillon.

2.1.4 Unité d'analyse: La quantité de produit prélevée de l'unité d'échantillonnage pour analyse.

2.2 Prélèvement des échantillons

2.2.1 Prendre un échantillon composé de 20 unités d'échantillonnage prélevées au hasard sur chaque lot.

2.2.2 Chaque unité d'échantillonnage doit renfermer au moins 100 g.

2.2.3 Prélever des contenants intacts lorsque possible.

2.2.4 Il est permis de prélever plus d'une unité d'échantillonnage sur de gros contenants

commerciaux ou sur des contenants en vrac lorsque le nombre total d'unités d'échantillonnage requis excède le nombre de contenants du lot. Lorsque le lot comprend des contenants renfermant moins de 100 g, l'unité d'échantillonnage doit se composer de plus d'un contenant (par exemple, quatre contenants de 25 g pour chaque unité d'échantillonnage).

- 2.2.5 Utiliser des techniques aseptiques pour prélever les unités d'échantillonnage lorsque le lait en poudre est en vrac. Déposer chacune des unités d'échantillonnage prélevées dans un contenant stérile distinct.

3. MODE OPÉRATOIRE

Les 20 unités d'échantillonnage doivent être analysées individuellement, à titre de deux ou, de plus de deux unités composites pour déterminer la présence de bactéries du genre Salmonella.

Il faut effectuer les épreuves conformément aux instructions suivantes:

3.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 3.1.1 Analyser les unités d'échantillonnage aussitôt que possible après leur arrivée au laboratoire.

3.2 Préparation des milieux

Utiliser les milieux suivants après les avoir préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant:

- (1) Bouillon nutritif (NB)
- (2) Bouillon de sélénite-cystine (SC)
- (3) Bouillon de tétrathionate-vert brillant (TBG)
- (4) Gélose au sulfite de bismuth (BS)
- (5) Gélose de vert brillant-sulfamide (BGS)
- (6) Gélose de MacConkey (MA)
- (7) Gélose de tri-glucides-fer (TSI)
- (8) Gélose de lysine-fer (LI)
- (9) Gélose à l'urée de Christensen (CU)
- (10) Gélose nutritive (NA)

3.3 Enrichissement en milieu non sélectif (pré-enrichissement)

- 3.3.1 Prélever une unité d'analyse de 25 g de chaque unité d'échantillonnage de 100 g. Lorsqu'une unité d'échantillonnage se compose de plus d'un contenant, mélanger le contenu de chacun des contenants ensemble, de façon aseptique, avant de prélever l'unité d'analyse de 25 g.
- 3.3.2 Resuspendre les unités d'analyse individuelles ou les unités composites dans neuf fois leur poids d'eau distillée.
- 3.3.3 Ajouter une solution de vert brillant pour obtenir une concentration finale de 1:50 000.
- 3.3.4 Agiter la suspension pour assurer une distribution uniforme des microorganismes présents.
- 3.3.5 Vérifier le pH de chaque unité d'analyse ou de chaque unité composite en suspension. Si le pH ne se situe pas entre 5,6 et 7,0, ajuster le à 7,0 avec du NaOH ou du HCl stériles.
- 3.3.6ensemencer un bouillon nutritif avec une culture connue de Salmonella et le transférer par

la suite dans tous les autres milieux utilisés dans l'analyse. Considérer ce dernier comme le témoin positif. Préparer un témoin négatif en incubant les milieux non ensemencés au cours de chaque étape de l'analyse.

3.3.7 Incuber le(s) bouillon(s) de pré-enrichissement ensemencé(s) et les témoins à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ pendant 18 à 24 h. La période d'incubation ne doit sous aucun prétexte dépasser 24 h.

3.4 Enrichissement en milieu sélectif

3.4.1 À l'aide d'une pipette stérile, transférer 1 ml du bouillon de pré-enrichissement incubé dans 9 ml de chacun des bouillons de sélénite-cystine et de tétrathionate-vert brillant.

3.4.2 Incuber le bouillon de SC et le bouillon de TBG pendant 24 ± 2 h à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ et à $43^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ respectivement.

3.5 Isolement sur gélose sélective

3.5.1 Après l'incubation, prélever un échantillon à l'aide d'un fil bouclé et ensemencer chacun des bouillons d'enrichissement sélectifs sur une gélose au sulfite de bismuth et sur une gélose de vert brillant-sulfamide afin d'obtenir des colonies bien isolées. Les bouillons peuvent également être ensemencés sur un troisième milieu de culture au choix.

3.5.1.1 On a constaté que la gélose au sulfite de bismuth est un milieu inhibiteur pour les sérotypes de Salmonella autres que S. typhi, à moins qu'elle ne soit entreposée à 4°C pendant 24 h avant d'être ensemencée. On devrait tenir compte de l'effet inhibiteur de ce milieu.

3.5.2 Incuber les boîtes de gélose à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ pendant 24 ± 2 h. Il se peut qu'il soit nécessaire d'incuber les boîtes de gélose au BS pendant 48 ± 2 h.

3.5.3 Après l'incubation, examiner les boîtes pour déceler la présence de colonies présumées de Salmonella. Sur la gélose au vert brillant-sulfamide, de telles colonies sont roses ou rouge fuchsine et le milieu qui les entoure prend une teinte rouge. Sur la gélose au sulfite de bismuth, les colonies sont habituellement noires avec ou sans reflet métallique; si la période d'incubation se prolonge, le milieu qui les entoure noircit graduellement. Il convient de noter toutefois que les souches qui fermentent le lactose et (ou) le saccharose (par exemple, S. arizonae) peuvent présenter des colonies verdâtres ressemblant à celles faites par des coliformes sur la gélose au BGS. La présence d'une forte population de coliformes peut masquer les colonies de Salmonella. Sur la gélose au sulfite de bismuth, certains types de Salmonella peuvent produire des colonies brun foncé plutôt que des colonies noires.

3.5.4 S'il n'y a pas de colonies présumées de Salmonella sur les boîtes de gélose, les bactéries du genre Salmonella sont donc considérées comme étant absentes de l'unité d'analyse ou de l'unité composite d'où proviennent les colonies.

3.6 Purification

3.6.1 Étaler en stries les colonies suspectes sur des boîtes de gélose de MacConkey pour purification.

3.6.2 Incuber les boîtes de gélose à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ pendant 24 ± 2 h.

3.6.3 Après incubation, examiner les boîtes de gélose de MacConkey. Les Salmonella typiquement sont lactose-négatives et forment des colonies incolores sur le milieu. Cependant des biotypes lactose-positifs ont été identifiés et apparaissent comme des colonies roses.

3.7 Épreuves biochimiques

3.7.1 À l'aide d'une aiguille d'ensemencement, piquer des colonies isolées présumées de Salmonella dans les milieux biochimiques énumérés au Tableau 1. Incuber ces milieux à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ pendant 18 à 24 h. Ne pas sceller les tubes de culture de façon hermétique pour ne pas obtenir de résultats erronés.

3.7.2 On peut utiliser d'autres milieux pour observer les réactions énumérées au Tableau 1. Si on veut obtenir des données biochimiques supplémentaires, on peut utiliser d'autres milieux de réactions ou des trousse de diagnostic commerciales.

3.7.3 Si on ne peut observer de réactions biochimiques évoquant la présence de Salmonella dans les isolements d'une unité d'analyse ou d'une unité composite, on peut supposer que ces unités ne renferment pas de bactéries du genre Salmonella. Si on soupçonne la présence de Salmonella, passer à l'épreuve sérologique.

3.7.4 L'épreuve sérologique doit être faite sur les cultures de TSI ou de LI 12 h au plus après l'incubation. Si ça ne peut être fait, les cultures doivent être réfrigérées à $2-8^{\circ}\text{C}$ pendant un maximum de 72 h.

3.7.5 Si l'épreuve sérologique n'est pas effectuée dans les 72 h qui suivent l'incubation, ensemercer les cultures suspectes des géloses TSI et LI sur des géloses nutritives inclinées.

3.7.6 Incuber les géloses nutritives inclinées à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ pendant 24 ± 2 h.

3.7.7. Si l'épreuve sérologique ne peut être faite dans les 12 h qui suivent l'incubation des géloses nutritives, elles doivent être entreposées à $2-8^{\circ}\text{C}$, pour un maximum de 24 h.

3.8 Épreuve sérologique

3.8.1 Épreuve avec un antisérum polyvalent somatique (Groupes A à I et Vi)

- (a) Sur une lame d'agglutination, délimiter les zones suivantes: C+ (témoin positif), C- (témoin négatif), et T (culture à l'essai). Si on analyse plus d'une culture à la fois, il faut identifier plusieurs zones d'essai T_1 , T_2 , T_3 etc.
- (b) Déposer une goutte de solution physiologique sur chacune des zones marquées T et C+, et deux gouttes sur la zone marquée C-.
- (c) D'un milieu biochimique (de la pente et non du culot) ou encore d'une gélose nutritive inclinée, prélever une quantité suffisante de culture pour préparer une suspension dense dans les zones d'essai et dans la zone du témoin négatif.
- (d) Pour le témoin positif, utiliser une culture connue de Salmonella et préparer une suspension dans la zone marquée C+.
- (e) Préparer l'antisérum polyvalent somatique selon les directives du fabricant et en déposer une goutte sur chacune des zones de suspension d'essai et sur la zone du témoin positif.
- (f) À l'aide d'une aiguille ou d'un fil bouclé stériles, mélanger chacune des

suspensions comprenant la culture, la solution physiologique et le sérum (cultures à l'essai et témoin positif); de même, mélanger la suspension comprenant la solution physiologique et la culture du témoin négatif. Faire osciller les lames pendant une minute.

- (g) Examiner les lames sur un fond sombre pour déceler la présence d'une agglutination. Les cultures agglutinent normalement en moins d'une minute.
- (h) Des réactions faussement positives peuvent se produire. Il est possible de corriger cette anomalie en effectuant des épreuves supplémentaires avec des antisérums somatiques de groupage et des antisérums flagellaires.
- (i) Les résultats ne sont pas concluants s'il se produit une agglutination dans la zone du témoin négatif (autoagglutination).

3.8.2 Épreuve avec des antisérums somatiques de groupage

Il est préférable d'analyser les cultures avec des antisérums somatiques de groupage; toutefois, on peut envoyer la culture à un centre de typage pour identification. La plupart des Salmonella isolées dans les aliments appartiennent aux groupes B, C, D et E. Il importe de savoir qu'à moins d'avoir un ensemble complet de sérums de groupage, certaines Salmonella peuvent ne pas être décelées. Dans de tels cas, toute culture présentant des réactions biochimiques caractéristiques de Salmonella doit être envoyée à un centre de typage pour identification.

- (a) Sur une lame d'agglutination, délimiter les zones suivantes: C+ (témoin positif), C- (témoin négatif) et T (culture à l'essai). Si on analyse plus d'une culture à la fois, il faut identifier plusieurs zones d'essai T₁, T₂, T₃ etc.
- (b) Utiliser un témoin positif pour chaque groupe analysé comme il est indiqué dans 3.8.1.d.
- (c) Déposer une goutte de solution physiologique sur les zones marquées T et C+ et deux gouttes sur la zone marquée C-.
- (d) D'un milieu biochimique (de la pente et non du culot) ou encore d'une gélose nutritive inclinée, prélever une quantité suffisante de culture pour préparer une suspension dense dans les zones d'essai et dans la zone du témoin négatif.
- (e) Préparer les antisérums de groupage selon les instructions du fabricant et en déposer une goutte sur chacune des zones de suspension d'essai et sur la zone du témoin positif.
- (f) À l'aide d'une aiguille ou d'un fil bouclé stériles, mélanger chacune des suspensions comprenant la culture, la solution physiologique et le sérum (cultures à l'essai et témoin positif); de même, mélanger la suspension comprenant la solution physiologique et la culture du témoin négatif. Faire osciller les lames pendant une minute.
- (g) Examiner les lames sur un fond sombre pour déceler la présence d'une agglutination. Les cultures agglutinent normalement en moins d'une minute.
- (h) Si le mélange de culture, de solution physiologique et de sérum ne s'est pas agglutiné, répéter le tout avec un autre antisérum de groupage.
- (i) Les résultats ne sont pas concluants s'il se produit une agglutination dans la zone du témoin négatif (autoagglutination).
- (j) Si l'épreuve sérologique est positive, il faut envoyer la culture à un centre de typage des Salmonella pour un sérotypage.

3.8.3 Si toutes les épreuves sérologiques d'un isolat s'avèrent négatives, mais que les réactions biochimiques de cet organisme suggèrent la présence de Salmonella (voir le Tableau 1) cette culture doit être envoyée à un centre de typage pour vérification.

4. INTERPRÉTATION

Le lot de lait en poudre à partir duquel on a prélevé l'échantillon est considéré comme conforme à l'article B.08.014A des Règlements sur les aliments et drogues lorsque des bactéries du genre Salmonella ne sont pas trouvées dans les 20 unités d'échantillonnage analysées (individuellement ou à titre d'unités composites).

TABLEAU 1

Milieux minimums d'épreuves biochimiques

Milieu	Réaction	Observations	Réaction présentée par la plupart des <u>Salmonella</u>
Gélose de tri-glucides-fer (TSI)	Utilisation du lactose et du saccharose ou de l'un ou l'autre	Réaction positive: pente jaune Réaction négative: la teinte rouge s'intensifie	Négative (Certaines souches peuvent présenter une réaction positive)
	Utilisation du dextrose	Réaction positive: culot jaune avec ou sans formation de gaz Réaction négative: aucun changement du culot	Positive
	Production de H ₂ S	Réaction positive: noircissement du culot qui s'étend parfois jusqu'à la pente Réaction négative: aucun noircissement	Positive On peut rencontrer des producteurs lents de H ₂ S. Si on est en présence de <u>Salmonella</u> lactose-positive, réaction de formation de H ₂ S peut être inhibée sur gélose TSI
	Formation de gaz	Réaction positive: formation de poches de gaz dans le milieu Réaction négative: absence de poches de gaz	Positive
Gélose de lysine-fer (LI)	Production de H ₂ S	Mêmes réactions que pour TSI	Positive
	Lysine-décarboxylase	Réaction positive: culot s'empourpre Réaction négative: culot devient jaune	Positive
	Lysine-désaminase	Réaction positive: pente de couleur rouge vin Réaction négative: aucun changement de la pente	Négative
Gélose à l'urée de Christensen*	Production d'uréase	Réaction positive: pente de couleur rouge rose Réaction négative: aucun changement de la pente	Négative

Bien que la lysine-désaminase soit utilisée pour différencier Proteus de Salmonella, l'épreuve de l'uréase est un indicateur plus exact de l'espèce Proteus.