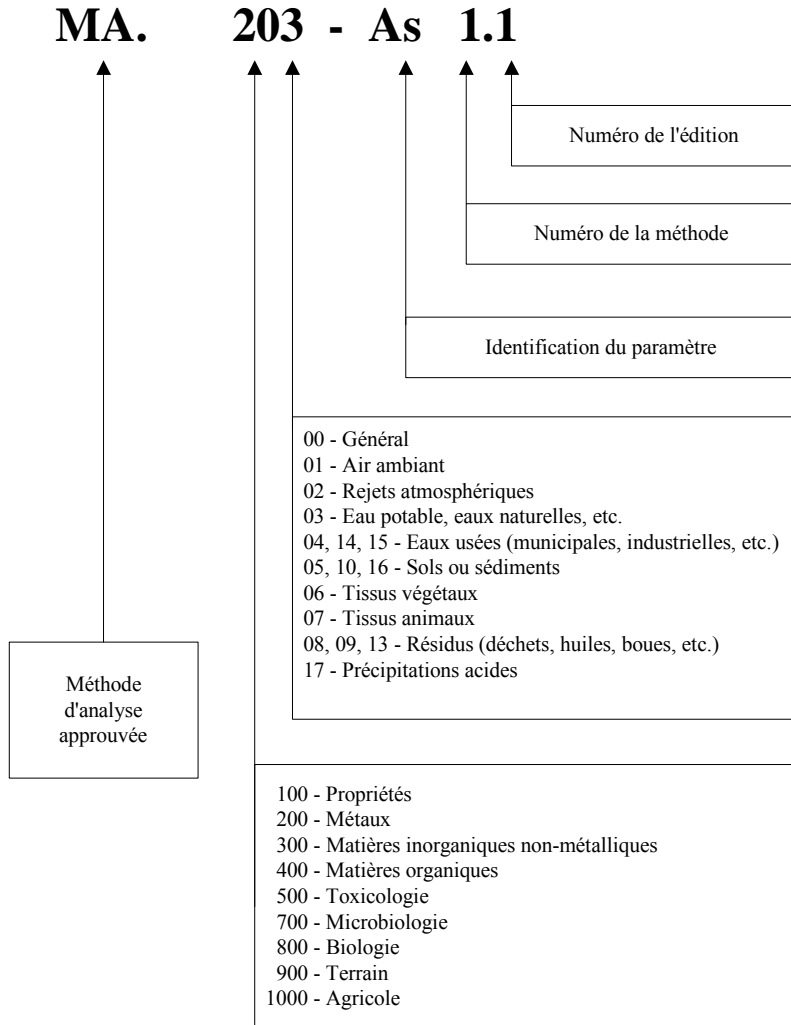


MA. 700 – Sal-tm 1.0
Édition : 1999-04-29
Révision : 2003-11-26 (1)

Méthode d'analyse
Dénombrement des salmonelles :
méthode par tubes multiples

Exemple de numérotation :



Historique de la méthode

Cette méthode a été élaborée et implantée dans le laboratoire de microbiologie du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) pour effectuer la recherche et le dénombrement des salmonelles dans les échantillons solides et liquides. Elle utilise le milieu de culture DSE pour l'enrichissement avec la technique des tubes multiples, le milieu gélosé XLT4 pour isoler les colonies probables de salmonelles à partir des tubes d'enrichissement et des galeries biochimiques d'identification pour confirmer l'appartenance des colonies isolées au genre *Salmonella*. L'élaboration de cette méthode a été initiée pour appuyer les *Critères provisoires pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes* (MENV, 2002).

L'approche employée dans cette méthode est similaire à l'approche présentée dans le document *Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge* (USEPA, 1999) dans la section *Appendix F – Sample Preparation for Fecal Coliform Tests and Salmonella sp. Analysis*. Dans ce document, l'USEPA reproduit une méthode de Kenner et Clark (1972) qui utilise le milieu de culture DSE pour l'enrichissement, le milieu XLD pour l'isolement des colonies probables des salmonelles et divers tests biochimiques pour la confirmation des salmonelles.

La technique employée dans cette méthode pour la détermination de la siccité (pourcentage de matières sèches) s'appuie sur la méthode 2540B du manuel de référence *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA et WEF, 1998).

Cette édition révisée de la méthode ne contient pas de modification dans la procédure analytique; les modifications apportées à l'historique et à la bibliographie constituent les seuls changements effectués à l'édition originale du 29 avril 1999.

Reproduction et traduction, même partielles, interdites sans l'autorisation du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, ministère de l'Environnement du Québec.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Dénombrement des salmonelles ; méthode par tubes multiples. MA. 700 – Sal-tm 1.0,
Ministère de l'Environnement du Québec, 2003, 19 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
1. DOMAINE D'APPLICATION	7
2. PRINCIPE ET THÉORIE	7
3. FIABILITÉ	8
3.1. Interférences	8
3.2. Limite inférieure de quantification	8
3.3. Limite supérieure de quantification	8
3.4. Fidélité	8
3.5. Pourcentage de récupération	9
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	10
5. APPAREILLAGE	10
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	11
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	14
7.1. Préparation de l'échantillon	14
7.2. Analyse de l'échantillon	14
7.3. Observation des résultats	15
7.4. Confirmations biochimiques	16
7.5. Détermination du pourcentage de matières sèches	16
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	16
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	18
10. BIBLIOGRAPHIE	19

INTRODUCTION

En avril 1997, le document « Critères provisoires pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes (épandage, entreposage temporaire, compostage, fabrication et utilisation de terreaux) » a été produit par le Service de l'assainissement agricole et des activités de compostage de la Direction des politiques des secteurs agricole et naturel du ministère de l'Environnement et de la Faune. Ce document définit, entre autres, des critères de référence microbiologiques pour l'utilisation des matières résiduelles fertilisantes. Un de ces critères est basé sur le dénombrement des salmonelles, un groupe de microorganismes pathogènes.

Les salmonelles appartiennent au groupe des Entérobactéries; elles sont en forme de bâtonnets Gram négatifs et sont anaérobies facultatives. Les salmonelles sont pathogènes pour l'humain et peuvent causer des fièvres entériques, des gastroentérites et des septicémies.

Habituellement, dans une matrice comme l'eau de consommation, un dénombrement n'est pas nécessaire dans le cas des microorganismes pathogènes; seul un test présence-absence suffit. Dans le document intitulé « Critères provisoires pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes (épandage, entreposage temporaire, compostage, fabrication et utilisation de terreaux) », la norme pour les salmonelles est de $< 3 \text{ NPP}/4 \text{ g}$ de matière sèche, et donc une méthode de dénombrement est nécessaire. La méthode décrite dans ce document utilise le principe de croissance en tubes multiples et est inspirée du document publié par l'USEPA « *Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge* ».

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode consiste à dénombrer les salmonelles par croissance en tubes multiples. Elle s'applique aux résidus des fabriques de pâtes et papiers, aux composts domestiques ainsi qu'à toutes les matrices solides ou liquides.

Cette méthode peut être utilisée également comme test présence-absence dans les cas où seulement un dépistage est requis. Habituellement, 25 g d'échantillon sont alors incubés dans 225 ml du bouillon d'enrichissement. Il est repiqué par la suite sur la gélose sélective. S'il y a des colonies caractéristiques, les confirmations biochimiques sont effectuées et nous pouvons ainsi déterminer s'il y a présence de salmonelles dans 25 g d'échantillon.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Le principe de la méthode NPP (NPP signifie nombre le plus probable) consiste à ensemercer de nombreux volumes ou des dilutions d'un même échantillon dans des tubes de bouillon d'enrichissement et par la suite à confirmer la présence de salmonelles par repiquage des tubes sur gélose sélective.

Chacune des géloses sélectives positives correspond à un tube d'enrichissement particulier. Le nombre le plus probable de salmonelles peut alors être estimé dans une quantité spécifiée d'échantillon à partir du nombre et de la répartition des tubes positifs.

3. FIABILITÉ

3.1. INTERFÉRENCES

Les échantillons doivent être en suspension dans l'eau tamponnée stérile (suspension de départ) le moins longtemps possible, de préférence moins de 20 minutes, car il peut en résulter un changement de la population bactérienne initiale.

Une bonne agitation de la suspension de départ et des tubes contenant l'échantillon est importante pour éviter une sous-évaluation du résultat final.

Dans le cas d'échantillons liquides, les bouteilles d'échantillonnage de 250 ml remplies à pleine capacité doivent être rejetées, car elles ne permettent pas d'agiter l'échantillon de façon à disperser uniformément les bactéries présentes dans tout le volume initial. Le rejet d'une portion aliquote de l'échantillon au laboratoire risquerait de modifier la concentration initiale des bactéries par unité de volume d'échantillon et de fausser le résultat. L'analyse de tels échantillons doit faire l'objet d'une remarque à cet effet sur le rapport d'analyse.

Pour chaque échantillon, un tube de chacune des dilutions de l'échantillon est inoculé avec des concentrations variant entre 10 et 100 UFC viables d'une souche de référence de salmonelles afin de vérifier la présence de substances inhibitrices (contrôle positif).

3.2. LIMITE INFÉRIEURE DE QUANTIFICATION

La limite inférieure de quantification est de 1 NPP/4 g d'échantillon humide. Cependant, les résultats étant exprimés en NPP/4 g d'échantillon sec, cette limite peut varier. Par exemple, un échantillon ayant un pourcentage de matières sèches de 30 % a une limite inférieure de quantification de 3 NPP/4 g d'échantillon sec.

Pour les échantillons ayant un pourcentage de matières sèches inférieur à 23 %, il faut augmenter la quantité d'échantillon et de milieu de culture afin de pouvoir respecter le critère de < 3 NPP/4 g d'échantillon sec en cas d'absence de salmonelles.

3.3. LIMITE SUPÉRIEURE DE QUANTIFICATION

La limite supérieure de quantification est de 640 NPP/4 g d'échantillon humide. Cependant, les résultats étant exprimés en NPP/4 g d'échantillon sec, cette limite peut varier. Par exemple, un échantillon ayant un pourcentage de matières sèches de 30 % a une limite supérieure de quantification de 21 000 NPP/4 g d'échantillon sec.

3.4. FIDÉLITÉ

3.4.1. Répliquabilité

Les valeurs de la répliquabilité se trouvent dans le tableau suivant.

Matrice	Nombre de données	Réplicabilité
Lisier de porc (liquide)	n = 6	± 33 NPP/ml à une concentration de 70 NPP/ml
Compost (solide)	n = 11	± 5 NPP/g humide à une concentration de 22 NPP/g humide
Boue municipale (solide)	n = 9	± 42 NPP/g humide à une concentration de 116 NPP/g humide
Boue de fabrique de pâtes et papiers (solide)	n = 10	± 5 NPP/g humide à une concentration de 21 NPP/g humide

3.4.2 Répétabilité

Les valeurs de la répétabilité se trouvent dans le tableau suivant.

Matrice	Nombre de données	Répétabilité
Lisier de porc (liquide)	n = 10	± 7 NPP/ml à une concentration de 28 NPP/ml
Compost (solide)	n = 10	± 9 NPP/g humide à une concentration de 24 NPP/g humide
Boue municipale (solide)	n = 10	± 3 NPP/g humide à une concentration de 8 NPP/g humide
Boue de fabrique de pâtes et papiers (solide)	n = 10	± 3 NPP/g humide à une concentration de 9 NPP/g humide

3.5. POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION

Le pourcentage de récupération a été établi à partir d'une souche de référence de *Salmonella typhimurium*. Les valeurs se trouvent dans le tableau suivant.

Matrice	Nombre de données	Pourcentage de récupération
Lisier de porc (liquide)	n = 6	92,9 %
Compost (solide)	n = 11	100 %
Boue municipale (solide)	n = 9	91 %
Boue de fabrique de pâtes et papiers (solide)	n = 10	100 %

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

Prélever un échantillon représentatif dans un contenant de polypropylène stérile. Pour les échantillons liquides, il est important de laisser un espace d'environ 3 cm entre l'échantillon et le bouchon du contenant de prélèvement afin de permettre une bonne agitation. Conserver l'échantillon à environ 4 °C. Le délai de conservation entre le prélèvement et l'analyse ne doit pas excéder 48 heures. Si possible, transmettre les échantillons au laboratoire dans un délai de 24 heures après le prélèvement. Lors de la réception au laboratoire, les échantillons qui ne peuvent être analysés dans les 4 heures suivant leur arrivée doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse.

5. APPAREILLAGE

Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

- 5.1. Pipettes stériles de 10,0 ml et 1,0 ml de type TD
- 5.2. Autoclave
- 5.3. Incubateur dont la température est ajustée à $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$
- 5.4. Incubateur dont la température est ajustée à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$
- 5.5. Balance analytique avec une précision de 0,01 g
- 5.6. pH-mètre
- 5.7. Agitateur Vortex
- 5.8. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.9. Bain-marie ajusté à $40\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$
- 5.10. Boîtes de Pétri 100 x 15 mm
- 5.11. Fil à boucle
- 5.12. Tubes de borosilicate 16 x 150 mm stériles
- 5.13. Tubes de borosilicate 18 x 150 mm stériles
- 5.14. Réfrigérateur maintenant une température entre 1 °C et 4 °C
- 5.15. Récipient en aluminium
- 5.16. Étuve réglée à $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$
- 5.17. Dessiccateur

6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S. à moins d'indication contraire. L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture et des réactifs est de l'eau distillée, déminéralisée ou ultra-pure. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

- 6.1. Phosphate de potassium dibasique, KH_2PO_4 (CAS n° 7778-77-0)
- 6.2. Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS n° 1310-73-2)
- 6.3. Protéose peptone (CAS n° 73049-73-7)
- 6.4. Extrait de levure (CAS n° 8013-01-2)
- 6.5. Dulcitol, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ (CAS n° 608-66-2)
- 6.6. Phosphate de sodium dibasique anhydre, Na_2HPO_4 (CAS n° 7558-79-4)
- 6.7. Sélénite de sodium, Na_2SeO_3 (CAS n° 10102-18-8)
- 6.8. Sulfate de calcium anhydre (« *Drierite* »), comme dessiccant
- 6.9. Souche de *Salmonella typhimurium*
- 6.10. Solution d'hydroxyde de sodium 1,0 N

Dissoudre 40,0 g de NaOH (cf. 6.2) dans environ 800 ml d'eau, laisser refroidir et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à la température de la pièce.

- 6.11. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de KH_2PO_4 anhydre (cf. 6.1) dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N (cf. 6.10) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

- 6.12. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.11) par litre d'eau. Répartir en volumes suffisants pour avoir 99 ml ± 2 ml, 90 ml ± 2 ml et 450 ml ± 5 ml après stérilisation. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

- 6.13. Bandelettes pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase Pathotec[®] cytochrome oxydase, Remel Lenexa, KS
- 6.14. Galerie d'identification biochimique Microscan[®] Gram négative

6.15. Bouillon dulcitol sélénite :

Protéose peptone	4,0 g
Extrait de levure	1,5 g
Dulcitol	4,0 g
Sélénite de sodium	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	1,25 g
KH ₂ PO ₄	1,25 g
Eau	1 000 ml

Dissoudre les ingrédients dans l'eau par agitation sans chauffer. Ajuster le pH à $7,0 \pm 0,2$. Porter à ébullition, ne pas autoclaver. Répartir en volumes de 10 ml dans des tubes borosilicate 18 x 150 mm stériles. Ce bouillon se conserve une semaine à 4 °C. Ce produit n'est pas disponible dans le commerce.

6.16. Bouillon dulcitol sélénite (double force) :

Protéose peptone	8,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Dulcitol	8,0 g
Sélénite de sodium	10,0 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
Eau	1 000 ml

Dissoudre les ingrédients dans l'eau par agitation sans chauffer. Ajuster le pH à $7,0 \pm 0,2$. Porter à ébullition, ne pas autoclaver. Répartir en volumes de 10 ml dans des tubes borosilicate 18 x 150 mm stériles. Ce bouillon se conserve une semaine à 4 °C. Ce produit n'est pas disponible dans le commerce.

6.17. Gélose XLT4 :

Peptone n° 3	1,6 g
Extrait de levure	3 g
L-Lysine	5 g
Xylose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Saccharose	7,5 g
Citrate d'ammonium ferrique	0,8 g
Thiosulfate de sodium	6,8 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	18 g
Phénol rouge	0,08 g

Suspendre 59,0 g de milieu déshydraté dans 1 000 ml d'eau, ajouter 4,6 ml de supplément pour agar XLT4 et chauffer jusqu'à ébullition pour dissoudre complètement. Éviter de surchauffer. Ne pas autoclaver. Le pH final doit être à $7,4 \pm 0,2$. Répartir dans des boîtes de Pétri de 100 x 15 mm et laisser solidifier. Les boîtes de Pétri se conservent deux semaines à 4 °C. Le milieu de base XLT4 et le supplément sont disponibles dans le commerce.

6.18. Gélose infusion coeur-cervele :

Infusion de cervelle de veau	200 g
Infusion de coeur de boeuf	250 g
Peptone	10 g
Dextrose	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2.5 g
Agar	15 g

Peser 52,0 g de milieu déshydraté dans un erlenmeyer de 2 000 ml et le dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Chauffer le milieu au point d'ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Répartir en volumes de 7,5 ml dans des tubes de 16 x 125 mm. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes et refroidir les tubes de façon à avoir des géloses inclinées. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Les tubes se conservent un mois à 4 °C. Ce milieu est disponible dans le commerce.

6.19. Bouillon infusion coeur-cervele :

Infusion de cervelle de veau	200 g
Infusion de coeur de boeuf	250 g
Peptone	10 g
Dextrose	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2,5 g

Peser 37,0 g de milieu déshydraté dans un erlenmeyer de 2 000 ml et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Chauffer le milieu sur une plaque chauffante en remuant avec un agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète. Répartir en volumes de 50 ml dans des bouteilles de verre. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Le bouillon se conserve un mois à 4 °C. Ce bouillon est disponible dans le commerce.

6.20. Gélose R2A :

Extrait de levure	0,5 g
Protéose peptone n° 3	0,5 g
Acides casamino	0,5 g
Dextrose	0,5 g
Fécule soluble	0,5 g

Pyruvate de sodium	0,3 g
Phosphate de potassium dibasique	0,3 g
Sulfate de magnésium	0,05 g
Agar	15 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 18,2 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Chauffer le milieu au point d'ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Refroidir et répartir dans des bouteilles de verre. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH doit être de $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C. Les bouteilles de milieu se conservent pendant un mois à 4 °C. Ce milieu de culture est disponible dans le commerce.

6.21. Suspension de salmonelles :

Inoculer un volume de 50 ml de bouillon infusion coeur-cerveau avec une souche de *Salmonella typhimurium* (cf. 6.9) et incuber à 35 °C pendant 18-24 heures.

Diluer la culture obtenue à 10^{-7} dans de l'eau tamponnée stérile (cf. 6.12). Utiliser 0,1 ml de cette dilution pour ensemercer les tubes de bouillon d'enrichissement contenant l'échantillon (contrôles positifs).

On peut effectuer un dénombrement en triplicata par incorporation dans la gélose R2A de 0,1 ml de la culture diluée à 10^{-7} pour s'assurer qu'elle contient entre 10 et 100 UFC viables de salmonelles. Incuber les géloses à 35 °C pendant 24 heures.

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

7.1. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- Bien homogénéiser l'échantillon, peser 50 g et incorporer dans 450 ml d'eau tamponnée stérile (cf. 6.12). Agiter très vigoureusement de façon à homogénéiser le plus possible l'échantillon. Cette concentration correspond à la dilution 10^{-1} . Suivre la même procédure dans le cas d'un échantillon liquide.
- Pipetter 10 ml de la dilution 10^{-1} dans 90 ml d'eau tamponnée stérile. Cette préparation correspond à la dilution 10^{-2} . On peut également faire d'autres dilutions pour inoculer d'autres séries de tubes si nous voulons augmenter la limite supérieure de quantification.

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

- Pipetter 10 ml de la dilution 10^{-1} dans 6 tubes contenant 10 ml de bouillon dulcitol sélénite double force (cf. 6.16) et agiter au Vortex. Chacun des 6 tubes de cette première série contient 1,0 g d'échantillon.

- Pipetter 1,0 ml de la dilution 10^{-1} dans 6 tubes contenant 10 ml de bouillon dulcitol sélénite (cf. 6.15) et agiter au Vortex. Chacun des 6 tubes de cette deuxième série contient 0,1 g d'échantillon.
- Pipetter 1,0 ml de la dilution 10^{-2} dans 6 tubes contenant 10 ml de bouillon dulcitol sélénite et agiter au Vortex. Chacun des 6 tubes de cette troisième série contient 0,01 g d'échantillon.
- Inoculer 1 tube de chacune des 3 séries avec la suspension diluée de salmonelles (cf. 6.21) et agiter au Vortex. Ce sont les contrôles positifs.
- Incuber les tubes dans un bain-marie à $40\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ pendant 24 heures \pm 2 heures.
- Incuber également un tube de bouillon dulcitol sélénite sans échantillon. Ceci est le contrôle négatif.
- Après l'incubation, faire un prélèvement avec un fil à boucle dans chacun des tubes de bouillon dulcitol sélénite et inoculer pour chacun des tubes une gélose XLT4 (cf. 6.17). Faire les inoculations de façon à obtenir des colonies isolées. Bien identifier chacune des géloses avec le numéro d'échantillon, l'identification du tube ainsi que la dilution.
- Inoculer également des géloses XLT4 avec les tubes de contrôle positifs et négatifs.
- Incuber les géloses dans un incubateur à $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ pendant 24 heures \pm 2 heures.

7.3. OBSERVATION DES RÉSULTATS

- Après la période d'incubation, sortir et ranger les géloses par ordre de numéro d'échantillon, de tubes et de dilutions.
- Examiner les géloses. Les colonies caractéristiques des salmonelles sont noires, roses avec ou sans centre noir ou jaunes avec centre noir sur la gélose XLT4, alors que les autres bactéries forment des colonies jaunes sans centre noir. Les rares espèces de salmonelles qui ne produisent pas de sulfure d'hydrogène (H_2S négative) formeront des colonies roses à rose-jaune. Ceci est une identification présomptive.
- Observer les contrôles positif et négatif. Il doit y avoir présence de colonies caractéristiques sur la gélose du contrôle positif et absence de colonie sur la gélose du contrôle négatif. L'absence de colonies caractéristiques provenant des témoins positifs signifie qu'à cette concentration l'échantillon inhibe la croissance des salmonelles dans le bouillon d'enrichissement. Il faut donc prendre un autre échantillonnage et refaire l'analyse en augmentant le ratio volume de bouillon d'enrichissement/gramme d'échantillon. Par exemple, on pourrait incuber 5 x 1,0 g d'échantillon dans 5 x 100 ml de bouillon d'enrichissement, 5 x 0,1 g d'échantillon dans 5 x 50 ml de bouillon d'enrichissement, etc.

7.4. CONFIRMATIONS BIOCHIMIQUES

- Repiquer sur gélose infusion coeur-cerveille inclinée (cf. 6.18) les colonies typiques des salmonelles trouvées sur la gélose XLT4.
- Incuber les géloses infusion coeur-cerveille dans un incubateur à 35 °C ± 0,5 °C pendant 18-24 heures.
- Effectuer la détection de l'activité de la cytochrome-oxydase en faisant un frottis de chaque colonie sur une bandelette pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase (cf. 6.13). Comme toutes les Entérobactéries, les salmonelles ne possèdent pas d'enzyme appelé cytochrome oxydase (réaction négative). Pour l'utilisation des bandelettes, voir les instructions du fabricant.
- Faire une galerie d'identifications Microscan[®] Gram négatives (cf. 6.14) pour chacune des colonies oxydase négatives. Pour l'utilisation des galeries d'identifications Microscan[®], voir les instructions du fabricant.
- On peut également obtenir le sérotypage des salmonelles lorsque cela est nécessaire dans un laboratoire de référence.

7.5. DÉTERMINATION DU POURCENTAGE DE MATIÈRES SÈCHES

- Peser 10 g ou plus d'échantillon humide dans un récipient en aluminium ou dans tout autre contenant approprié. Noter le poids.
- Sécher l'échantillon à l'étuve à 105 °C et laisser refroidir au dessiccateur. Peser le contenant jusqu'à l'obtention d'un poids constant en répétant le cycle séchage-refroidissement-pesage.
- Les résultats sont exprimés d'après l'équation suivante :

$$P = \frac{A}{B} \times 100$$

où

- P : pourcentage de matières sèches contenues dans l'échantillon (%);
- A : poids de l'échantillon sec (g);
- B : poids de l'échantillon humide (g).

8. **CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS**

Noter le nombre de tubes positifs de chaque série dans lesquels il y a présence de salmonelles. Consulter la table NPP (tableau 1) afin d'obtenir le nombre le plus probable.

NOTE - Les résultats du tableau 1 s'appliquent lorsque 3 séries de 5 tubes contenant 0,1, 0,01 et 0,001 g d'échantillon sont utilisées. Cette méthode utilisant plutôt des séries de tubes de 1,0, 0,1 et 0,01 g d'échantillon, il faut donc diviser par 10 le résultat obtenu dans le tableau 1.

Tableau 1 - Indices NPP par gramme ou millilitre d'échantillon et limites de confiance à 95 % (avec 3 séries de 5 tubes contenant 0,1, 0,01 et 0,001 g d'échantillon)

Combinaison de tubes positifs	NPP/g	Limite de confiance à 95 %		Combinaison de tubes positifs	NPP/g	Limite de confiance à 95 %	
		inférieure	supérieure			inférieure	supérieure
0-0-0	< 2	-	-	4-3-0	27	12	67
0-0-1	2	1,0	10	4-3-1	33	15	77
0-1-0	2	1,0	10	4-4-0	34	16	80
0-2-0	4	1,0	13	5-0-0	23	9,0	86
1-0-0	2	1,0	11	5-0-1	30	10	110
1-0-1	4	1,0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-0	4	1,0	15	5-1-0	30	10	120
1-1-1	6	2,0	18	5-1-1	50	20	150
1-2-0	6	2,0	18	5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1,0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2,0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2,0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3,0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3,0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5,0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3,0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4,0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4,0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6,0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6,0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7,0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5,0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7,0	45	5-5-1	300	100	1 300
4-1-0	17	7,0	46	5-5-2	500	200	2 000
4-1-1	21	9,0	55	5-5-3	900	300	2 900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1 600	600	5 300
4-2-0	22	9,0	56	5-5-5	≥ 1 600	-	-
4-2-1	26	12	65				

Lorsqu'on a utilisé plus de trois séries de tubes, choisir la plus petite quantité d'échantillon donnant un certain nombre de résultats positifs ainsi que les deux séries de tubes précédents (voir exemples A et B, tableau 2). Multiplier l'indice lu dans la table NPP par le facteur de dilution utilisé pour obtenir l'estimation du nombre d'organismes présents dans le volume de référence.

Lorsque cela est possible, utiliser des séries de tubes pour lesquelles les résultats sont ni tous positifs et ni tous négatifs. Dans le cas contraire, choisir les séries de tubes comportant des résultats positifs plutôt que des résultats négatifs (exemple C, tableau 2).

Si moins de trois séries de tubes donnent des résultats positifs, utiliser la série comportant la plus forte concentration en échantillon et les deux suivantes (exemple D, tableau 2). Situation identique si aucune série de tubes n'est positive.

Si une seule des séries de tubes donne un résultat positif, utiliser cette dilution et celle immédiatement supérieure et inférieure (exemple E, tableau 2).

Tableau 2 - Exemples de déduction du NPP à partir du nombre de résultats positifs dans des séries de 5 tubes en utilisant le tableau 1

Exemple dans le texte	Quantité d'échantillon dans la série de tubes					NPP/g
	1,0 g	0,1 g	0,01 g	0,001 g	0,0001 g	
A	5*	3*	2*	0		14
B	5	5*	3*	2*	0	140
C	5*	5*	2*	0	0	50
D	3*	1*	0*	0		1
E	0*	1*	0*	0		< 1

* Résultats servant à déterminer les indices NPP.

Puisque les résultats des tableaux 1 et 2 sont exprimés en NPP/g humide, faire le calcul pour avoir un résultat final en NPP/4 g sec selon la formule suivante :

Résultat en NPP/4 g sec :

$$\frac{\text{Résultat en NPP / g humide}}{\% \text{ de matières sèches}} \times 100 \times 4$$

Exemple : un échantillon qui a 32 % de matières sèches a un dénombrement de salmonelles de 140 NPP/g humide.

$$\frac{140}{32} \times 100 \times 4 = 1750 \text{ NPP / 4 g sec}$$

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les contrôles positifs et négatifs doivent donner les résultats attendus.

La température du bain-marie doit être maintenue à 40 °C ± 0,2 °C pendant toute la durée de l'incubation.

La température de l'incubateur doit être maintenue à 37 °C ± 0,5 °C pendant toute la durée de l'incubation.

Les prescriptions applicables trouvées dans le document DR-12-SCA-02, intitulé « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie », devront être réalisées et conformes.

10. BIBLIOGRAPHIE

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, 1998.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie, DR-12-SCA-02, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT, Critères provisoires pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes, Service de l'assainissement agricole et des activités de compostage, novembre 2002.

USEPA, Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, EPA/625/R-92/013, rev. October 1999.