

**Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques -
Manuel des opérations**

APPENDICE I

MÉTHODES DE LABORATOIRE

Cette annexe fournit aux laboratoires approuvés par le PCCSM des informations sur les méthodes d'analyse et d'assurance de la qualité associées à l'examen de l'eau de mer et des mollusques, les références et l'information nécessaires pour effectuer les épreuves bactériologiques, toxicologiques, chimiques et physiques, ainsi que des directives pour l'élaboration et l'implantation d'une procédure d'assurance de la qualité. La démarche décrite dans le présent document permet d'assurer l'uniformité requise pour obtenir des résultats fiables permettant de prendre des décisions en matière de santé publique pour déterminer si les mollusques sont propres à la consommation humaine.

1. Méthodes bactériologiques

Les publications *Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish* (Greenburg et Hunt, 1984) et *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (édition la plus récente) de l'American Public Health Association (APHA) ou leur équivalent, la méthode MFHPB-19 de la Direction générale de la protection de la santé (DGPS), de Santé Canada, *Dénombrement des coliformes, des coliformes fécaux et des E. coli dans les aliments au moyen de la méthode du NPP* (Compendium des méthodes, Méthodes de la DGPS pour l'analyse microbiologique des aliments, volume 2), doivent être suivies pour le prélèvement, le transport et l'examen des échantillons de mollusques et d'eaux coquillières. La référence officielle pour la recherche de *Vibrio parahaemolyticus* dans les mollusques est la Méthode MFLP-39a, de la DGPS de Santé Canada, *Détection des espèces de Vibrio* (Compendium des méthodes, Méthodes de la DGPS pour l'analyse microbiologique des aliments, volume 3) ou son équivalent, la U.S. Food and Drug Administration 2001, *Bacteriological Analytical Manual Online*, <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm> Les laboratoires doivent vérifier la présence de cet organisme lorsque les épreuves courantes effectuées sur les produits de la mer que l'on soupçonne d'être à l'origine de toxi-infections d'origine alimentaire ne permettent pas de mettre en évidence la présence d'autres pathogènes entériques ou toxines bactériennes (Ratcliffe et Wilt, 1971).

La méthode de fermentation en tubes multiples est la plus courante pour évaluer le nombre de bactéries dans l'eau de mer

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

et dans les mollusques. Cette méthode repose sur le principe de dilution jusqu'à extinction pour évaluer le nombre de bactéries dans un échantillon. Des dilutions décimales de l'échantillon sont analysées en parallèle dans des tubes de milieu permettant la croissance sélective de l'organisme que l'on veut dénombrer. On peut donc raisonnablement présumer que la dilution maximale à laquelle la croissance se produit représente un volume renfermant un seul organisme. Les résultats d'une telle analyse sont exprimés sous la forme du Nombre le Plus Probable (NPP) et sont fondés sur le calcul des probabilités.

Tout laboratoire qui souhaite faire l'analyse d'échantillons réglementaires dans le cadre du PCCSM doit être accrédité selon la norme internationale ISO/ CEI 17025:2005 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais par un organisme d'accréditation reconnu

Les normes relatives à la qualité bactériologique de l'eau, basées sur les taux de coliformes fécaux tels qu'établis par la méthode du NPP, sont actuellement appliquées dans la classification des eaux de croissance des mollusques. Les normes relatives au dénombrement des bactéries dans les mollusques basées sur les taux de coliformes fécaux, tels qu'établis par la méthode du NPP, sont actuellement utilisées dans l'évaluation de l'efficacité de la dépuración et de la vérification des données pour ouvrir les endroits qui avaient été fermés à la suite de l'implantation d'un plan de gestion.

Condition des échantillons

Il faut entreprendre l'examen bactériologique des échantillons d'eau immédiatement après leur prélèvement et de préférence dans les 8 heures suivantes. Mais, peu importe les circonstances, les résultats de l'examen bactériologique résultant d'échantillons conservés plus de 30 heures ne doivent jamais être considérés comme valides à des fins de classification. Il faut conserver les échantillons dans une glacière dont la température est maintenue entre 0 et 10 °C jusqu'à leur examen. Aucune autre méthode n'est acceptable. Il faut au moins 100 mL d'eau pour l'épreuve, et seules des bouteilles de verre ou de polypropylène stériles doivent être utilisées pour les prélèvements.

Les échantillons de mollusques doivent être prélevés dans des récipients propres, étanches et résistants aux perforations. Chaque échantillon doit contenir de 10 à 12 mollusques (ou plus pour un poids total de 150 à 250 g) et être exempt de coquilles

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

ouvertes ou fendues. Les échantillons de mollusques doivent être conservés à une température de 10 °C ou moins, mais au-dessus de 0 °C, jusqu'à leur examen. Ils ne doivent en aucun cas être en contact direct avec de la glace. Les échantillons de mollusques doivent parvenir au laboratoire le plus rapidement possible pour être analysés dans les 24 heures suivant leur prélèvement.

Interférences

Les agents bactériostatiques ou bactéricides tels le chlore, l'argent, le plomb et divers complexes organiques peuvent réduire considérablement la densité bactérienne d'un échantillon. La présence d'éléments nutritifs contaminants peut causer une prolifération indésirable des organismes dans l'échantillon et occasionner une surestimation de la densité bactérienne.

Ces deux problèmes peuvent être considérablement atténués si l'on s'assure que :

- a) tous les articles de verre utilisés dans les analyses sont exempts de telles substances;
- b) l'eau distillée/désionisée utilisée dans la préparation des milieux n'est pas contaminée par des bactéries, des champignons ou des algues; et
- c) les échantillons sont traités le plus rapidement possible après le prélèvement.

La prolifération, dans les milieux d'essai, d'organismes sans importance aux fins de l'analyse effectuée peut entraîner des résultats faussement positifs et, de ce fait, une surestimation de la densité bactérienne réelle. Cependant, la spécificité du milieu d'essai élimine normalement la plupart de ces organismes. Les températures d'incubation sont d'une importance capitale et de légers changements de températures peuvent influencer sur le type et le nombre de bactéries se développant dans le milieu d'essai.

Précision et exactitude

La densité bactérienne établie par la méthode du NPP relève d'un calcul statistique et elle doit être traitée comme telle.

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

Les limites de confiance de 95 % pour l'épreuve relative au NPP (5 tubes) se situent entre 24 % et 324 % du NPP et, par conséquent, les résultats d'analyse d'un seul échantillon ne sont nullement concluants. Le degré d'exactitude augmente avec le nombre d'échantillons et, généralement, au moins cinq échantillons sont exigés par lieu de prélèvement afin d'établir une meilleure approximation de la densité bactérienne réelle.

Matériel

- Pipettes sérologiques stériles de 1,0 et 10 mL
- Applicateurs stériles ou anses (à inoculation) 5 mm (platine*)
- Étuve (air) à $35 \pm 0,5$ °C
- Bain-marie à $44,5 \pm 0,2$ °C ou programmable pour deux températures
- Flacons à échantillons stériles, en verre, de 250 mL à grande ouverture*
- Tubes à essai de 20 X 150 mm en Pyrex avec bouchons*
- Tubes à essai de 16 X 150 mm en Pyrex avec bouchons*
- Tubes de culture de 6 X 50 mm (tubes de Durham)
- Supports à tubes
- Autoclave
- Pipettes Pasteur stériles
- Flacons à dilutions pour lait*, 160 mL
- Mélangeur-broyeur
- Contenants à mélangeur-broyeur 1 L (format minimum)*
- Couteau à écaillage et/ou scalpel stériles
- Brosse dure stérile

* Ou substituts appropriés respectant ou excédant les exigences du PCCSM.

Milieux de culture bactériologiques

Sauf pour le milieu A-1 (qui doit être préparé à partir de ses composantes individuelles) et pour la gélose MacConkey modifiée (qui peut être préparée à partir de ses composantes individuelles) tous les milieux indiqués ci-dessous sont disponibles sur le marché sous forme déshydratée.

Bouillon lauryl tryptose

Ce milieu est disponible sur le marché.

Tryptose - 20,0 g

Lactose - 5,0 g

K_2HPO_4 - 2,75 g

KH_2PO_4 - 2,75 g

NaCl - 5,0 g

Lauryl sulfate de sodium - 0,1 g

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

Eau distillée/désionisée - 1,0 L

Ajouter 35,6 g à 1,0 L d'eau distillée ou désionisée et chauffer légèrement jusqu'à dissolution complète. Pour préparer un bouillon à double concentration, dissoudre les quantités ci-dessus dans 500 mL d'eau. Verser 10 mL de bouillon dans des tubes à essai contenant un tube de Durham inversé. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH du milieu devrait être de 6,8 après la stérilisation.

Bouillon bilié au vert brillant à 2 %

Ce milieu est disponible sur le marché.

Peptone - 10,0 g
Lactose - 10,0 g
Bile de boeuf - 20,0 g
Vert brillant - 0,0133 g
Eau distillée/désionisée - 1,0 L

Ajouter 40 g à 1,0 L d'eau distillée ou désionisée et chauffer légèrement jusqu'à dissolution complète. Verser des aliquotes de 5 à 10 mL dans des tubes à essai contenant un tube de Durham inversé. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH du milieu devrait être de 7,2 après la stérilisation.

Milieu EC

Ce milieu est disponible sur le marché.

Tryptose ou trypticase - 20,0 g
Lactose - 5,0 g
Sels biliaires n° 3 - 1,5 g
 K_2HPO_4 - 4,0 g
 KH_2PO_4 - 1,5 g
NaCl - 5,0 g
Eau distillée/désionisée - 1,0 L

Ajouter 37 g de poudre à 1,0 L d'eau distillée ou désionisée et chauffer légèrement jusqu'à dissolution complète. Verser des aliquotes de 5 à 10 mL dans des tubes à essai contenant un tube de Durham inversé. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH du milieu devrait être de 6,9 après la stérilisation.

Milieu A-1

Lactose - 5,0 g
Tryptone - 20,0 g
NaCl - 5,0 g

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

Salicine - 0,5 g
Triton X-100 - 1,0 mL
Eau distillée/désionisée - 1,0 L

Ajouter les ingrédients secs ci-dessus à 1,0 L d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger, puis ajouter 1 mL de Triton X-100 et continuer à mélanger jusqu'à dissolution complète. On prépare le milieu à double concentration en dissolvant les quantités indiquées ci-dessus dans 500 mL d'eau. Verser des aliquotes de 10 mL dans des tubes à essai contenant un tube de Durham inversé. Autoclaver à 121 °C pendant 10 minutes. Le pH du milieu devrait être de 6,9 après la stérilisation.

Gélose de Levine à l'éosine et au bleu de méthylène

Ce milieu est disponible sur le marché.
Hydrolysats pancréatique de gélatine - 10,0 g
Lactose - 10,0 g
 K_2HPO_4 - 2,0 g
Éosine Y - 0,4 g
Bleu de méthylène - 0,065 g
Gélose - 15,0 g
Eau distillée/désionisée - 1,0 L

Ajouter 37,4 g de poudre à 1,0 L d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger. Chauffer en agitant souvent et faire bouillir pendant 1 minute pour dissoudre complètement la poudre. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH du milieu devrait être de 7,0 après la stérilisation. Laisser refroidir jusqu'à une température d'environ 45 °C, puis verser dans des boîtes de pétri. Laisser refroidir les boîtes à la température ambiante.

Gélose pour dénombrement en plaque (Plate Count Agar) ou Gélose - méthode standard

Ce milieu est disponible sur le marché.
Hydrolysats pancréatique de caséine - 5,0 g
Extrait de levure - 2,5 g
Dextrose - 1,0 g
Gélose - 15,0 g
Eau distillée/désionisée - 1,0 L

Ajouter 23,5 g de poudre à 1,0 L d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger. Chauffer en agitant souvent et faire bouillir pendant 1 minute pour dissoudre complètement la poudre. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH du milieu devrait être de 7,0 après la stérilisation.

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

Gélose MacConkey modifiée (double concentration)

Peptone - 34,0 g
Polypeptone - 6,0 g
Lactose - 20,0 g
Sels biliaires n° 3 - 1,5 g
Gélose - 27,0 g
Rouge neutre - 0,06 g
Cristal violet - 0,02 g
Eau distillée/désionisée - 1,0 L

Ajouter les ingrédients ci-dessus à 1,0 L d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger. Chauffer en agitant souvent jusqu'à ébullition. Retirer du feu et faire bouillir de nouveau (ne pas autoclaver). Laisser tempérer au bain-marie à 45 - 50 °C pour une période pouvant atteindre six heures.

Tampon phosphate

Ce tampon est préparé à partir de deux solutions-mères de tampons :

Solution-mère de tampon phosphate : dissoudre 34,0 g de phosphate monobasique de potassium (KH_2PO_4) dans 500 mL d'eau distillée, ajuster le pH à 7,2 avec du NaOH 1 N (environ 150 à 175 mL de NaOH 1 N peuvent être nécessaires pour obtenir un pH de 7,2), puis compléter le volume à 1,0 L avec de l'eau distillée.

Solution de chlorure de magnésium : Dissoudre 81,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 1,0 L d'eau distillée/désionisée

Solution finale de tampon phosphate pour les dilutions :
1,25 mL de solution-mère de tampon phosphate
5,0 mL de solution de chlorure de magnésium
1,0 L d'eau distillée/désionisée

Verser suffisamment de tampon à dilution dans les bouteilles ou les tubes de dilution pour qu'après la stérilisation à l'autoclave (121 °C, pendant 15 minutes), ceux-ci contiennent le volume requis ± 2 %.

Eau peptonée à 0,5 %

Peptone ou gelysate - 5,0 g
Eau distillée/désionisée - 1,0 L

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

Dissoudre la peptone dans de l'eau distillée ou désionisée, puis verser suffisamment de solution dans les bouteilles ou les tubes de dilution pour qu'après la stérilisation à l'autoclave (121 °C, pendant 15 minutes), ceux-ci contiennent le volume requis ± 2 %.

Marche à suivre

Analyse de l'eau - Numération des coliformes et des coliformes fécaux

En général, cinq aliquotes de 10 mL, cinq de 1,0 mL et cinq de 0,1 mL de l'échantillon sont introduites de manière aseptique dans des tubes contenant du bouillon lauryl tryptose. Les aliquotes de 10 mL servent àensemencer le bouillon lauryl tryptose concentré. Pour certains échantillons, il faut effectuer une série de dilutions décimales afin d'éviter les résultats non concluants. Les dilutions sont faites avec le tampon phosphate et doivent être choisies de façon que la moitié des tubes, environ, donnent des résultats positifs. Après des incubations de 24 (± 2) et 48 (± 4) heures à $35 \pm 0,5$ °C, on vérifie la croissance d'organismes et la production de gaz. La croissance et la production de gaz sont toutes deux nécessaires pour un résultat positif. Le NPP est calculé et les résultats sont exprimés sous forme de « NPP de coliformes présumés/100 mL ».

Pour confirmer la présence de coliformes, des inoculats provenant des tubes aux résultats positifs pour la présence de coliformes présumés après 24 et 48 heures d'incubation sont versés de manière aseptique dans des tubes contenant du bouillon bilié au vert brillant (2 %). Ces ensemencements se font 24 heures et 48 heures après l'inoculation initiale en bouillon lauryl tryptose, selon le temps nécessaire à la production de gaz dans le bouillon lauryl tryptose. Après des incubations de 24 (± 2) et 48 (± 4) heures à $35 \pm 0,5$ °C, on vérifie la croissance d'organismes et la production de gaz. Les résultats sont exprimés sous forme de « NPP de coliformes confirmés/100 mL ».

Pour la numération des coliformes fécaux, des inoculats des tubes, dont les résultats sont positifs pour la présence de coliformes présumés après 24 et 48 d'incubation, sont versés de manière aseptique dans des tubes de milieu EC. Ces tubes sont incubés à $44,5 \pm 0,2$ °C pendant 24 ± 2 heures, après quoi on vérifie la croissance d'organismes et

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

la production de gaz. Les résultats sont exprimés sous forme de « NPP de coliformes fécaux/100 mL ».

Épreuve rapide du NPP de coliformes fécaux (Méthode du milieu A-1)

Les méthodes d'ensemencement et de dilution sont les mêmes ici que celles décrites dans la section précédente pour le bouillon lauryl tryptose, sauf que le milieu utilisé est un milieu A-1. Les tubes sont incubés d'abord dans une étuve à $35 \pm 0,5$ °C pendant $3 \pm 0,5$ heures, puis dans un bain-marie à $44,5 \pm 0,2$ °C pour une période supplémentaire de 21 ± 2 heures. (On peut aussi utiliser un bain-marie programmable pour les deux températures d'incubation.) Au terme des 24 heures d'incubation, on vérifie la croissance d'organismes et la production de gaz. Le NPP est calculé et les résultats sont exprimés sous forme de « NPP de coliformes fécaux/100 mL ». L'utilisation du milieu A-1 pour la détermination rapide des coliformes fécaux est actuellement limitée à la numération des coliformes fécaux dans les eaux coquillières; le milieu A-1 ne convient pas à l'analyse d'autres types d'eaux ou d'effluents.

Analyse des mollusques

Avant d'appliquer la méthode standard de numération des coliformes (NPP) aux mollusques, il faut préparer les échantillons à analyser. D'abord, nettoyer les mollusques avant de les écailler; les couteaux à écailler, les brosses à nettoyer et les récipients pour le mélangeur doivent tous être stériles. Avant d'ouvrir les mollusques, les nettoyer avec une brosse dure stérile, puis les rincer avec de l'eau potable. Laisser égoutter les mollusques dans un endroit propre avant de les ouvrir. Un minimum de 100 g de mollusques (au moins 10 à 12 mollusques, chair et liqueur) sont ouverts de manière aseptique (à l'aide d'instruments stériles) et déposés dans le récipient stérile, taré, d'un mélangeur. Ajouter un poids équivalent de tampon phosphate stérile, puis mélanger à haute vitesse, pendant 90 à 120 secondes. Puis, prélever immédiatement 20 g du mélange et les ajouter, de manière aseptique, à 80 mL de tampon de dilution, pour obtenir une dilution 1/10 de l'échantillon original. Préparer une dilution 1/100, en ajoutant 10 mL de la dilution 1/10 à 90 mL de tampon de dilution. Appliquer la méthode standard de numération NPP (en utilisant le bouillon lauryl tryptose et le milieu EC) à l'échantillon ainsi dilué en utilisant des inoculats de 1 et 10 mL de la dilution 1/10 et des inoculats de 1 mL de la dilution 1/100.

**Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques -
Manuel des opérations**

Calculs

Les valeurs de NPP, exprimées sous forme de NPP/100 mL pour les codes des tubes les plus courants, sont présentées dans la référence pertinente pour la méthode du NPP avec 5 tubes. Si l'échantillon a été dilué, la valeur du NPP indiquée au tableau est multipliée par le facteur de dilution approprié.

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

2. Méthodes toxicologiques

Les laboratoires doivent utiliser une des méthodes suivantes :

- les méthodes officielles qui ont été vérifiées afin de déterminer les caractéristiques de performance dans chaque laboratoire;
- d'autres méthodes qui ont été validées au moyen de protocoles reconnus à l'échelle internationale;
- les méthodes qui ont été approuvées dans le cadre de la portée de l'accréditation du laboratoire.

3. Méthodes chimiques et physiques

- Pour les déterminations chimiques et physiques, suivre les méthodes officielles de l'AOAC et de l'APHA en vigueur.
- Exprimer les résultats des analyses chimiques et physiques en unités standard. (Par exemple, exprimer la salinité en ppm, parties par millier, plutôt qu'en lectures d'aréomètre.)

4. Assurance de la qualité

Le laboratoire approuvé par le PCCSM (gouvernemental ou privé) doit veiller à ce que tous les échantillons soient prélevés, conservés, transportés et analysés de façon à assurer la validité des résultats analytiques.

En combinaison avec les exigences ISO, le laboratoire doit élaborer un plan d'assurance qualité propre au laboratoire. Le plan d'assurance qualité doit comprendre notamment :

- Une description l'organisation du laboratoire;
- Une description des exigences en matière de formation du personnel et de conservation des registres de formation;
- Un Mode Opérateur Normalisé (MON) écrit pour toute méthode de laboratoire utilisée;
- Une description des mesures internes de contrôle de la qualité aux fins de l'étalonnage, de l'entretien ou de la réparation des appareils, ou encore de la vérification de leur fonctionnement et de la tenue

Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques - Manuel des opérations

- de registres;
- Une description des mesures de sécurité applicables au laboratoire et définir les registres dans lesquels seront conservées les fiches signalétiques et les données relatives à la formation du personnel;
 - Une description des registres à tenir et à conserver relativement à l'évaluation interne de la performance du laboratoire;
 - Une description des registres à tenir et à conserver relativement à l'évaluation externe de la performance du laboratoire.

Tout laboratoire qui effectue des analyses dans le cadre du PCCSM à des fins réglementaire doit être accrédité selon la norme internationale ISO/IEC 17025:2005 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais par un organisme d'accréditation reconnu. Aux termes de cette norme, tout laboratoire candidat ou accrédité doit prouver sa compétence technique en réussissant des épreuves de compétence administrées par un fournisseur d'épreuves de compétence agréé.

Le comité conjoint ACIA-EC sur les laboratoires du PCCSM servira de point de contact clé en ce qui concerne les discussions et les demandes internes, externes et à l'échelle internationale liées aux questions, aux méthodes et au statut d'accréditation.

**Program canadien de contrôle de la salubrité des mollusques -
Manuel des opérations**

RÉFÉRENCES

- 1 Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd Edition, APHA, 1984
- 2 Bonnes pratiques de laboratoire.
- 3 Interim Guides for the Depuration of the Northern Quahog *Mercenaria mercenaria*, Northeast Marine Health Sciences Laboratory, North Kingstown, RI, 1968.
- 4 NBS Monograph 150, U.S. Department of Commerce, Washington, D.C., 1976.
- 5 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th Edition, 1990.
- 6 Proceeding 8th National Shellfish Sanitation Workshop, 1984.
- 7 Public Health Service, Public Health Report, Reprint #1621, 1947.
- 8 Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories, Association of Official Analytical Chemists, 1991.
- 9 Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish, 4th Edition, American Public Health Association, 1970.
- 10 Shellfish Sanitation Interpretation #SS-39, Interstate Shellfish Sanitation Conference, 1986.
- 11 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition, APHA/WEF/AWWA, 1992.
- 12 Title 21, Code of Federal Regulations, Part 58, Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Study, Washington, D.C.
- 13 Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th Edition, APHA, 1992.