Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 87 (1996)

Heft: 5

Artikel: Dénombrement de Escherichia coli au moyen de géloses chromogènes sélectives - comparaison avec la méthode officielle = Quantitative detection of escherichia coli using chromogenic selective media - a comparison with the official method

Autor: Grand, Marius / Baumgartner, Andreas

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982092

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Trav. chim. aliment. hyg. 87, 623–630 (1996)
Présenté le 3 mai 1996. Accepté le 3 juin 1996

Dénombrement de *Escherichia coli* au moyen de géloses chromogènes sélectives – comparaison avec la méthode officielle

Quantitative Detection of *Escherichia coli* Using Chromogenic Selective Media – a Comparison with the Official Method

Key words: Escherichia coli, β-glucuronidase, MUG, chromogenic media

Marius Grand et *Andreas Baumgartner*
Office fédéral de la santé publique, Berne

Introduction

La présence de *Escherichia coli* dans les denrées alimentaires est étroitement liée à la pratique hygiénique observée lors de la production de ces denrées. La recherche de ces micro-organismes est donc de première importance et l'ordonnance sur l'hygiène en fixe les valeurs limites et les valeurs de tolérance (1). Les méthodes analytiques microbiologiques sont décrites dans le chapitre 56 du Manuel suisse des denrées alimentaires, elles sont périodiquement adaptées au développement dans ce domaine (2).

La méthode 7.07.2, dénombrement de *E. coli,* est basée sur la détection d'une enzyme, la β-glucuronidase, spécifique à ce germe à plus de 90%, et dont l'activité est mise en évidence par une substance chromogène fluorescente à 366 nm (3). Le milieu ne permet pas toutefois un dénombrement aisé si le nombre de colonies est élevé. Il y a en effet diffusion de la réaction chromogène dans l'agar. La mise au point de géloses sélectives contenant un substrat chromogène basé sur le même principe, mais dont la réaction colore directement la colonie *E. coli,* nous a incités à tester ces milieux par l'analyse de denrées alimentaires et d'eau de surface. La présence de ces germes est détectée en 24 h, sans préincubation sauf pour l'eau. La simplicité de l'analyse est un autre atout majeur de la méthode.

Matériel et méthodes

Denrées alimentaires analysées

Les échantillons analysés provenaient de 55 fromages au lait cru, de 14 viandes hachées, de 108 laits crus provenant de producteurs et de 35 eaux de surface (tableau 1).

Tableau 1. Fréquence des échantillons positifs lors de la détermination de *E. coli*

Echantillons		ECD-MUG	EC-Rapid	EC-Chromagar	EC-Chromocult
Laits crus	*n* total	108	108	108	100
	n positifs	11	12	14	16
Fromages au lait cru	*n* total	55	55	55	11
	n positifs	18	18	18	7
Viandes hachées	*n* total	14	14	14	0
	n positifs	1	1	1	0
Eaux de surface	*n* total	35	35	35	35
	n positifs	35	33	34	34

Milieux de culture

- «ECD Agar MUG» (ECD-MUG) [Biolife 401427].
  La colonie *E. coli* est fluorescente à 366 nm, par réaction de la β-glucuronidase avec le 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide (Méthode 7.07.2, du chapitre 56).
- «Rapid' *E. coli*» (EC-Rapid) [Sanofi-Pasteur-Diagnostic 64722].
  La coloration obtenue avec la colonie *E. coli* est bleue.
- «CHROMagar *E. coli*» (EC-Chromagar) [A. Rambach, EC 166, Paris, distribution Labo-Life, Pully].
  La coloration obtenue avec la colonie *E. coli* est bleue.
- «Chromocult Coliformen Agar» (EC-Chromocult) [Merck 1.10426].
  La coloration obtenue avec la colonie *E. coli* est violette.

Ce dernier milieu a été intégré à l'essai à une date ultérieure. Le nombre d'échantillons analysés est par conséquent moins élevé.

Les nouvelles géloses sélectives pour la recherche de *E. coli* contiennent notamment un substrat chromogène, le 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronide

(BCIG), qui colore la colonie en bleu ou violet selon le milieu utilisé en réagissant avec la β-glucuronidase.

Influence de la température d'incubation

Sept souches *Escherichia coli,* dont une entérohémorragique 0157:H7 ainsi qu'une souche de chaque espèce appartenant à *Bacillus cereus, Enterococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Listeria welshimeri, Listeria inocua, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium,* provenant de la collection de notre laboratoire ont été cultivées sur les milieux précités à 37 °C et à 44 °C pendant 24 h afin de mesurer l'importance du paramètre température et la sélectivité des milieux.

Analyse

L'analyse des denrées alimentaires a été faite en ensemençant les géloses en surface par étalement de 0,1 ml de la suspension mère ou d'une dilution consécutive effectuée dans de l'eau physiologique. Les fromages et les viandes, soit 10 g de produit dans 90 ml d'eau physiologique, ont été homogénéisés dans un Stomacher 400 pendant 1 min. Les boîtes ont été incubées pendant 20 – 22 h à 44 °C. Concernant l'eau de surface, on a procédé à la filtration d'un volume compris entre 0,1 ml et 10 ml selon le degré de contamination (diamètre du filtre: 47 mm, pores: 0,45 µm, Millipore HAWG047S3). La membrane a été préincubée 2 h à 37 °C sur Tryptic Soy Agar (Oxoid CM 131), puis transférée sur le milieu sélectif et incubée 20 à 22 h à 44 °C. Les colonies typiques *E. coli* ont été comptées sur chaque milieu. Les tests de confirmation, pour les colonies présumées *E. coli* sur géloses sélectives, ont été effectués avec les galeries Api 20 E (Biomérieux 20100).

Interprétation des résultats

Les résultats ont été évalués au moyen de tests statistiques. Chaque gélose chromogène a été comparée avec la méthode de référence 7.07.2 au moyen du test de *t* de Student (résultats couplés). A cette fin, les résultats ont d'abord été transformés en leur forme logarithmique décimale. Seuls les échantillons positifs, c'est-à-dire contaminés par *E. coli,* ont été pris en considération. Des régressions linéaires ont permis de calculer, le coefficient de corrélation (*r*), l'ordonnée à l'origine (a) (aucune différence significative: a = 0) et la pente (b), (aucune différence significative: b = 1). Chaque gélose chromogène a été comparée de cette manière avec la gélose de référence (figures 1 à 3 et tableau 2).

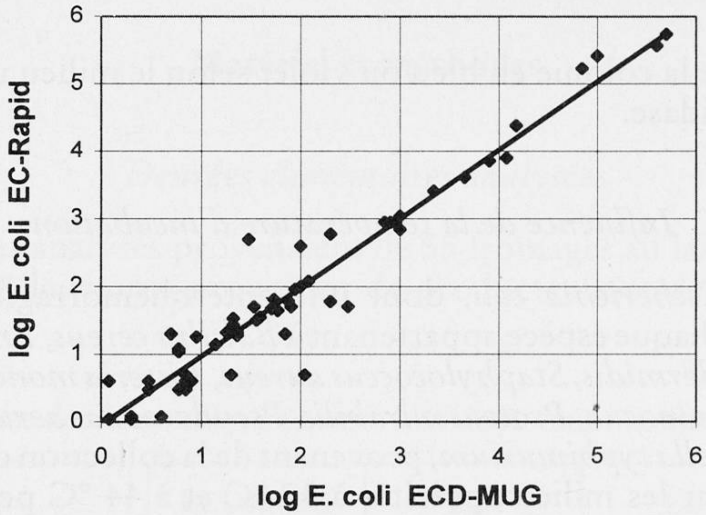

Fig. 1. Comparaison par régression linéaire du milieu de culture ECD-MUG (méthode de référence) au milieu chromogène EC-Rapid

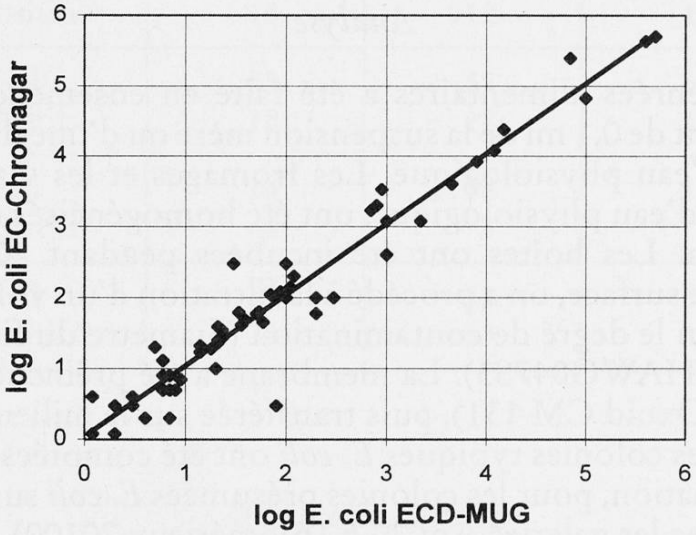

Fig. 2. Comparaison par régression linéaire du milieu de culture ECD-MUG (méthode de référence) au milieu chromogène EC-Chromagar

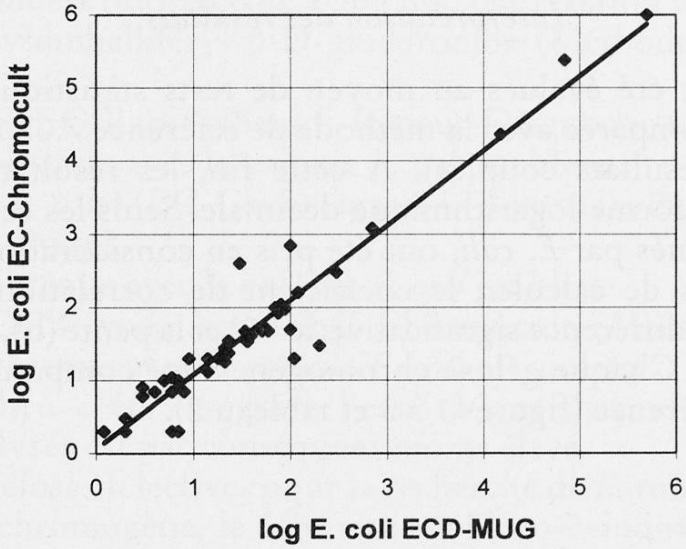

Fig. 3. Comparaison par régression linéaire du milieu de culture ECD-MUG (méthode de référence) au milieu chromogène EC-Chromocult Agar

Tableau 2. Comparaison statistique des milieux de culture chromogènes au milieu de culture ECD-MUG (méthode de référence)

Milieux de culture	Nombre d'échantillons	Coefficient de corrélation	Grandeurs du test de variance F		
			F (a = 0)	F (b = 1)	Tabl. P = 95%
EC-Pasteur	57	0,966	0,315	0,220	4,02
EC-Chromagar	57	0,968	0,278	0,002	4,02
EC-Chromocult	46	0,961	0,483	0,201	4,08

Résultats et discussion

Influence de la température

L'étude de l'influence de la température d'incubation sur la sélectivité des milieux chromogènes a permis les observations suivantes pour les souches de laboratoire:

- nous n'avons constaté aucune différence de croissance, d'aspect des colonies ou de sélectivité des milieux dans notre essai entre l'incubation à 37 °C et 44 °C pour les souches *E. coli.* Celles-ci ont formé des colonies typiques sur les milieux respectifs à l'exception de la souche entérohémorragique O157:H7 qui ne possède pas de β-glucuronidase et par conséquent ne produit aucune réaction chromogénique de la colonie. Ce résultat est en accord avec les travaux publiés à ce jour (4).
- Sur les milieux EC-Rapid et EC-Chromagar, *Pseudomonas aeruginosa* présente une couleur bleu pâle lorsque les colonies se touchent et sont en grand nombre sur la boîte.
- Les souches *Salmonella enteritidis* et *Proteus mirabilis* forment des colonies blanches.
- Aucune croissance n'a été observée pour *B. cereus, E. faecalis,* les listerias et les staphylocoques.

La plupart des méthodes publiées à ce jour, fixent à 44 °C l'incubation des milieux de culture pour la recherche de *E. coli.* Cette température peut avoir un effet inhibiteur sur certains micro-organismes susceptibles d'influencer la croissance du germe recherché. C'est la raison pour laquelle nous avons retenu 44 °C comme un des paramètres standards de l'analyse.

Le tableau 1 représente la fréquence des échantillons positifs lors de la détermination de *E. coli.* Pour les laits crus, la faible contamination (1 à 3 colonies par boîte) des échantillons par *E. coli* explique les écarts d'une gélose à l'autre dans la détection de ce germe. D'autre part, EC-Chromocult a été testé sur un plus petit nombre

d'échantillons ce qui peut de prime abord, fausser l'interprétation de ces informations. Toutefois, les résultats obtenus avec les eaux de surface démontrent une remarquable concordance entre les résultats de chaque gélose.

Les colonies typiques prélevées sur les géloses en vue des essais de confirmation ont donné les identifications suivantes:

- Les colonies isolées (29 ECD-MUG, 56 EC-Rapid, 42 EC-Chromagar et 29 EC-Chromocult) et identifiées au moyen des galeries Api 20 E appartiennent toutes à l'espèce *E. coli.*

Observations faites sur les géloses chromogènes:

- Certaines souches présentent une coloration bleue seulement au centre de la colonie, c'est le cas pour la gélose EC-Rapid. Dans quelques cas, la coloration peut s'atténuer si les colonies sont nombreuses et se touchent. Cette observation a été faite avec EC-Rapid et EC-Chromagar.
- EC-Chromocult a présenté quelques cas de colonies *E. coli* de couleur bleu turquoise (présomption de salmonelles) au lieu de la couleur typique violette.

Interprétation statistique

L'interprétation des résultats avec le test de t a donné, les résultats suivants:

ECD-MUG – EC-Rapid : $t = 0{,}757$ (57 échantillons *E. coli* positifs)
ECD-MUG – EC-Chromagar : $t = 0{,}387$ (57 échantillons *E. coli* positifs)
ECD-MUG – EC-Chromocult : $t = 0{,}073$ (46 échantillons *E. coli* positifs)

Le quantile de la distribution de t à $P = 0{,}95$ est de 1,671 pour respectivement 60 échantillons exploités et de 1,684 pour 40 échantillons exploités. Cette valeur est bien au-dessus de celles obtenues dans l'essai. On peut donc dire avec une probabilité de 95% qu'il n'existe aucune différence significative entre les résultats obtenus avec ECD-MUG et chaque milieu chromogène.

Comme le montre le tableau 2, les régressions linéaires obtenues démontrent des coefficients de corrélation élevés. Les ordonnées à l'origine (a) ne sont pas significativement différentes de 0, ni les pentes (b) significativement différentes de 1. Il n'existe donc pas de différence entre les résultats obtenus avec les nouveaux milieux de culture et celui utilisé dans la méthode de référence. Les trois milieux chromogènes peuvent être utilisés avantageusement comme méthode alternative à la méthode de référence en raison de l'article 4 de l'ordonnance sur l'hygiène. Cet article prévoit notamment que «...D'autres méthodes sont admises à condition que les résultats qu'elles fournissent correspondent à ceux des méthodes de référence.»

Remerciements

Les auteurs remercient vivement le Dr *J.O. Bosset* de la FAM pour la lecture critique du manuscrit; Monsieur *U. Bütikofer* de la FAM également et Monsieur *M. Haldimann* de l'OFSP pour l'aide apportée à l'interprétation statistique des résultats.

Résumé

Le dénombrement de *Escherichia coli* dans les denrées alimentaires a été réalisé au moyen de nouvelles géloses contenant un substrat chromogène qui colore les colonies présumées *E. coli.* Les trois milieux testés, «Rapid' *E. coli*», «CHROMagar *E. coli*» et «Chromocult Coliformen Agar», ont été comparés avec le milieu «ECD Agar MUG» proposé dans le chapitre 56 du Manuel suisse des denrées alimentaires. Les essais de croissance à 37 et à 44 °C ont montré que les souches *E. coli* formaient à ces températures des colonies typiques et aisément distinctes des autres espèces. L'analyse quantitative de 177 denrées alimentaires et 35 eaux de surface a permis une comparaison statistique (régression et test de *t* de Student) des résultats. Aucune différence n'est apparue (seuil de confiance à $P = 0{,}95$) entre la méthode de référence et les trois milieux examinés. Les 149 colonies typiques isolées ont été confirmées avec API 20 E; celles-ci appartiennent toutes à l'espèce *E. coli.* Certaines souches peuvent présenter une coloration bleue seulement au centre de la colonie (EC-Rapid) et pour le EC-Chromocult, des colonies de couleur bleu turquoise (présomption de salmonelles) appartenaient également à l'espèce *E. coli.* Une confirmation biochimique est nécessaire dans ces cas. Les données livrées par cet essai permettent de conclure que les 3 géloses chromogènes peuvent être utilisées au même titre que la méthode officielle de référence.

Zusammenfassung

Drei im Handel zum quantitativen Nachweis von *E. coli* neu erhältliche Agarmedien («Rapid' *E. coli*», «CHROMagar *E. coli*» und «Chromocult Coliformen Agar»), deren Prinzip auf der Färbung typischer Kolonien durch Chromogene beruht, wurden bezüglich Spezifität und quantitativer Ausbeute im Vergleich zur amtlich schweizerischen Referenzmethode («ECD Agar MUG») geprüft. Versuche mit Reinkulturen verschiedener Bakterienarten zeigten, dass *E. coli* sowohl bei 37 als auch 44 °C typische Kolonien ausbildet und sicher erkannt werden kann. Quantitative Ergebnisse, resultierend aus der Analyse von 177 Lebensmittel- und 35 Oberflächenwasserproben erlaubten es, die neuen Agarmedien mit der amtlichen Methode statistisch zu vergleichen (Regressionsanalyse und *t*-Test). Dabei zeigte es sich, dass mit allen drei geprüften Nährböden keine signifikant von der Referenzmethode abweichenden Resultate zu erwarten sind (Vertrauensgrenze $P = 0{,}95$). 149 mittels API 20 E geprüfte typische Kolonien erwiesen sich weiter durchwegs als *E. coli.* In wenigen Fällen deckte sich die beobachtete Koloniefärbung nicht ganz mit den Angaben der Hersteller. So zeigten einige *E. coli*-Stämme auf EC-Rapid nur im Zentrum der Kolonie eine Blaufärbung. Auf EC-Chromocult fanden sich gewisse *E. coli*-Stämme mit türkisblauen Kolonien, was auf Salmonellen hindeutet. Bei Auftreten des genannten Koloniebildes ist deshalb eine weitergehende Bestätigung angezeigt. Die erarbeiteten Daten erlaubten zusammenfassend den Schluss, dass die drei geprüften Agarmedien gleichwertig zur Referenzmethode sind und als Alternativverfahren eingesetzt werden können.

Summary

Three new, commercially available chromogenic agar media («Rapid' *E. coli*», «CHROMagar *E. coli*» and «Chromocult Coliformen Agar») were compared with the official method («ECD Agar MUG») with regard to specifity and potential of quantitative detection.

Experiments with strain cultures of eight different bacterial species showed that *E. coli* forms typical colonies on the chromogenic agar media at either 37 or 44 °C and that it can be unambiguously identified. The potential of quantitative detection was investigated by the analysis of 177 samples of different foodstuffs and 35 samples of surface water. Statistical testing (Regression analysis and *t*-test) showed that with the three chromogenic agar media, no results which significantly derive from the results of the reference method have to be expected (Confidence limit $P = 0.95$). Furthermore, 149 typical colonies isolated from chromogenic agar plates could entirely be shown to be *E. coli* with the API 20 E test system. In some cases, the appearence of *E. coli* colonies was not completely in accordance with the manufacturers indications. On EC-Rapid, several strains showed a blue staining only in the centre of the colonies and on EC-Chromocult, there were a few strains detected which form turquoise-blue colonies as it is done by Salmonella. In that case, confirmation tests are indicated.

In conclusion, the worked out data show that the three evaluated chromogenic agar media are equivalent to the ECD-MUG reference procedure and that they can therefore be used as alternative methods.

Bibliographie

1. Département fédéral de l'intérieur: Ordonnance sur l'hygiène du 26 juin 1995 (RS 817.051).
2. Manuel suisse des denrées alimentaires, chapitre 56 «Microbiologie». Office central fédéral des imprimés et du matériel, Berne 1985.
3. *Frampton, E.W.* and *Restaino, L.:* Methods for *Escherichia coli* identification on food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. J. Appl. Bacteriology **74,** 223–233 (1993).
4. *Brenner, K.P., Rankin, C.C., Roybal, Y.R., Stelma, G.N., Scarpina, P.V.* and *Dufour, A.P.:* New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. Appl. Environ. Microbiol. **59,** 3534–3544 (1993).

Marius Grand
Office fédéral de la Santé publique
Division Science des aliments
Section Microbiologie
CH-3003 Berne