

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 18 Ramadhan 1438 correspondant au 13 juin 2017 rendant obligatoire la méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés par la technique du nombre le plus probable (NPP).

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 17-180 du 28 Chaâbane 1438 correspondant au 25 mai 2017 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes, notamment son article 19 ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaâda 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 13-328 du 20 Dhou EL Kaâda 1434 correspondant au 26 septembre 2013 fixant les conditions et les modalités d'agrément des laboratoires au titre de la protection du consommateur et de la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 15-172 du 8 Ramadhan 1436 correspondant au 25 juin 2015 fixant les conditions et les modalités applicables en matière de spécifications microbiologiques des denrées alimentaires ;

Vu le décret exécutif n° 17-140 du 14 Rajab 1438 correspondant au 11 avril 2017 fixant les conditions d'hygiène et de salubrité lors du processus de la mise à la consommation humaine des denrées alimentaires ;

Vu l'arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour essai et dilutions en vue de l'examen microbiologique ;

Vu l'arrêté du 28 Rajab 1435 correspondant au 28 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés par la technique du nombre le plus probable (NPP).

Art. 2. — Pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés par la technique du nombre le plus probable (NPP), les laboratoires de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet, doivent employer la méthode jointe en annexe.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 18 Ramadhan 1438 correspondant au 13 juin 2017.

Ahmed-Abdelhafid SACI.

ANNEXE

**METHODE HORIZONTALE
POUR LA RECHERCHE ET LE DENOMBREMENT
D'*ESCHERICHIA COLI* PRESUMES
PAR LA TECHNIQUE DU NOMBRE
LE PLUS PROBABLE (NPP)**

1. DOMAINE D'APPLICATION :

La présente méthode donne des directives générales pour la détection et le dénombrement d'*Escherichia coli* (*E.coli*) présumés, au moyen de la technique de culture en milieu liquide avec calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 37 °C, puis à 44 °C.

La présente méthode s'applique :

— aux produits pour l'alimentation humaine et animale ;

— aux échantillons d'environnement dans les domaines de la production et de la distribution des denrées alimentaires.

NOTE - Certaines souches d'*Escherichia coli* pathogènes ne sont pas cultivables à 44 °C.

2. TERMES ET DEFINITIONS :

Pour les besoins de la présente méthode, les termes et définitions suivants s'appliquent :

2.1 *Escherichia coli* présumés, bactéries qui, à 44 °C, fermentent le lactose avec production de gaz et qui, à cette température, produisent de l'indole à partir du tryptophane, lorsque l'essai est effectué selon la technique spécifiée dans la présente méthode.

2.2 Dénombrement d'*Escherichia coli* présumés, nombre le plus probable d'*E. coli* par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai, lorsque l'essai est effectué selon la technique spécifiée dans la présente méthode.

3. PRINCIPE :

3.1 Méthode de détection :

3.1.1 Inoculer un milieu d'enrichissement sélectif liquide avec une quantité déterminée de la suspension initiale de l'échantillon pour essai.

3.1.2 Incuber le tube à 37 °C pendant 48 h. Examiner la formation de gaz dans le tube après 24 h et 48 h.

3.1.3 Si le tube montre une opacité, un aspect trouble ou un dégagement gazeux, faire une subculture dans un tube contenant un milieu sélectif liquide (bouillon EC).

3.1.4 Le tube obtenu en (3.1.3) est incubé à 44 °C pendant 48 h. Examiner la formation de gaz après 24 h et 48 h.

3.1.5 Si un dégagement gazeux est noté dans le tube en (3.1.4), réaliser une subculture dans un tube contenant de l'eau peptonée exempte d'indole.

3.1.6 Le tube obtenu en (3.1.5) est incubé durant 48 h à 44 °C. Le tube est examiné pour la production d'indole résultant de la dégradation du tryptophane dans les constituants peptonés.

3.1.7 Les tubes, présentant une opacité, un aspect trouble ou un dégagement gazeux dans le milieu d'enrichissement sélectif liquide (3.1.1) et dont les sous-cultures ont produit du gaz dans le bouillon EC et de l'indole dans l'eau peptonée à 44 °C, sont considérés comme contenant d'*Escherichia coli* présumés. On donne les résultats « présence » ou « absence » d'*Escherichia coli* présumés dans x g ou x ml de produit.

3.2 Méthode de dénombrement :

3.2.1 Trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif double concentration sont inoculés avec une quantité déterminée de la suspension initiale.

3.2.2 Trois tubes de milieu d'enrichissement simple concentration sont inoculés avec une quantité déterminée de la suspension initiale.

Par ailleurs, dans les mêmes conditions, trois autres tubes de milieu simple concentration sont inoculés avec une quantité déterminée des dilutions décimales de la suspension initiale.

3.2.3 Les tubes de milieu simple et double concentration sont incubés à 37 °C pendant 48 h. Les tubes sont examinés pour vérifier la production de gaz après 24 h et 48 h.

3.2.4 Pour chaque tube simple et double concentration présentant une opacité, un aspect trouble ou un dégagement gazeux, réaliser une subculture dans un milieu sélectif liquide (bouillon EC).

3.2.5 Les tubes obtenus en (3.2.4) sont incubés à 44 °C pendant 48 h. Les tubes sont examinés pour vérifier la production de gaz après 24 h et 48 h.

3.2.6 A partir de chaque tube de milieu obtenu en (3.2.5) présentant un dégagement gazeux, faire une subculture dans un tube contenant de l'eau peptonée exempte d'indole.

3.2.7 Les tubes obtenus en (3.2.6) sont incubés 48 h à 44 °C. Les tubes sont examinés pour vérifier la production d'indole résultant de la dégradation du tryptophane dans les constituants peptonés.

3.2.8 Le nombre le plus probable d'*Escherichia coli* présumé est déterminé au moyen de la table NPP d'après le nombre de tubes de milieu simple et double concentration dont les subcultures ont donné une production de gaz dans le bouillon EC et une production d'indole dans l'eau peptonée à 44 °C.

4. DILUANT, MILIEUX DE CULTURE ET REACTIF :

4.1 Diluant :

Il convient de préparer les diluants conformément aux recommandations spécifiées dans la méthode relative à la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

4.2 Bouillon au lauryl sulfate (milieu d'enrichissement sélectif).

4.2.1 Composition :

	(a) Milieu double concentration	(b) Milieu simple concentration
Digestat enzymatique de tissus végétaux et animaux	40 g	20 g
Lactose	10 g	5 g
Monohydrogénophosphate de dipotassium (K_2HPO_4)	5,5 g	2,75 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	5,5 g	2,75 g
Chlorure de sodium	10 g	5 g
Lauryl sulfate de sodium [$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$]	0,2 g	0,1 g
Eau	1000 ml	1000 ml

4.2.2. Préparation :

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant, si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $6,8 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir les milieux par quantités de 9 ml dans des tubes de 16 mm x 160 mm (5.4) contenant des cloches de Durham (5.6) dans le cas du milieu simple concentration, et par quantités de 10 ml dans des tubes de 18 mm x 80 mm ou 20 mm x 200 mm (5.4) contenant des cloches de Durham (5.6) dans le cas du milieu double concentration.

Stériliser ces tubes à l'autoclave (5.1) réglé à 121°C pendant 15 min.

Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

4.3 Bouillon EC (milieu sélectif) :**4.3.1 Composition :**

Digestat enzymatique de caséine	20 g
Lactose	5 g
Sels biliaires n° 3	1,5 g
Monohydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4)	4 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	1,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau	1000 ml

4.3.2 Préparation :

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant, si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $6,8 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu, par quantités de 10 ml, dans des tubes de 16 mm x 160 mm (5.4) contenant des cloches de Durham (5.6).

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121°C pendant 15 min.

Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

4.4 Eau peptonée exempte d'indole :**4.4.1 Composition :**

Digestat enzymatique de caséine	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau	1000 ml

4.4.2 Préparation :

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant, si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,3 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu, par quantités de 5 ml à 10 ml, dans des tubes de 16 mm x 160 mm (5.4).

Stériliser à l'autoclave (5.1) réglé à 121°C pendant 15 min.

4.5 Réactif pour la recherche de l'indole (réactif de Kovacs) :**4.5.1 Composition :**

Diméthylamino-4 benzaldéhyde	5g
Méthyl-2 butanol-1 ou pentanol-1	75 ml
Acide chlorhydrique (ρ_{20} 1,18 à 1,19 g/ml)	25 ml

4.5.2 Préparation :

Dissoudre le diméthylamino-4 benzaldéhyde dans l'alcool en chauffant dans un bain d'eau maintenu entre 50°C et 55°C . Refroidir et ajouter l'acide.

Mettre à l'abri de la lumière et conserver à 4°C .

Le réactif doit être de couleur jaune clair à brun clair.

NOTE- Une préparation commerciale, prête à l'emploi, peut également être utilisée.

5. APPAREILLAGE ET VERRERIE :

NOTE - Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et en particulier, ce qui suit :

5.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave) :

5.2 Etuve, réglable à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et à $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.3 Bain d'eau, pouvant être maintenu à $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.4 Tubes à essais, de dimension 16 mm x 160 mm et 18 mm x 180 mm ou 20 mm x 200 mm environ.

5.5 Anses bouclées, en platine iridié ou en nickel/chrome, d'environ 3 mm de diamètre, ou anses bouclées stériles à usage unique de 10 μl approximativement.

5.6 Cloches de Durham, de dimensions appropriées pour leur utilisation dans les tubes à essais (5.4).

5.7 Pipettes à écoulement total, de 1 ml et 10 ml de capacité nominale.

5.8 pH-mètre, ayant une résolution de 0,01 unité de pH et une exactitude de mesurage de $\pm 0,1$ unité de pH à 25°C .

6. ECHANTILLONNAGE :

Il est recommandé que le laboratoire reçoit un échantillon représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

7. PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR ESSAI :

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode spécifique du produit concerné.

8. PROCEDURE :

8.1 Méthode de détection :

8.1.1 Prise d'essai et suspension mère :

Ajouter 1 ml de la suspension mère à 9 ml de bouillon lauryl sulfate simple concentration (4.2.1 b) (c'est-à-dire 0,1 g ou 0,1 ml de l'échantillon) ou 10 ml de la suspension mère à 10 ml de bouillon lauryl sulfate double concentration (4.2.1 a) (c'est-à-dire 1 g ou 1 ml de l'échantillon).

Pour des volumes plus importants de prise d'essai, préparer la suspension mère en ajoutant x ml ou x g à $9 \times$ ml de diluant. Puis ajouter la totalité de la suspension mère à $90 \times$ ml de bouillon lauryl sulfate simple concentration (4.2.1.b). Par exemple, ajouter 5 ml ou 5 g de l'échantillon à 45 ml de diluant et ajouter la totalité de la suspension mère à 450 ml de bouillon lauryl sulfate simple concentration (4.2.1. b), ou ajouter la prise d'essai à un volume égal de bouillon lauryl sulfate double concentration (4.2.1.a).

8.1.2 Incubation du milieu sélectif d'enrichissement (bouillon lauryl sulfate) :

Incuber le bouillon lauryl sulfate (4.2) simple ou double concentration dans l'étuve (5.2) réglé à 37°C pendant $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Si, à ce stade, on n'observe pas de production de gaz, ni de trouble empêchant l'observation du dégagement gazeux, prolonger l'incubation jusqu'à $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

NOTE - Pour les coquillages marins vivants, la durée d'incubation peut être limitée à $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

Pour certains produits laitiers (caséine par exemple), la cloche de Durham peut être collée au fond des tubes de milieu d'enrichissement sélectif.

Si après 48 h d'incubation, une opacité sans formation de gaz est observée, ensemercer un bouillon *EC* à partir du bouillon précédent puis continuer la méthode tel que décrit en (8.1.3).

8.1.3 Ensemencement et incubation du milieu sélectif (bouillon *EC*) :

Après l'incubation du milieu double concentration (4.2.1 a) en (8.1.2), si une opacité, un trouble ou un dégagement gazeux sont observés, ou après l'incubation du milieu simple concentration (4.2.1 b) selon (8.1.2), si un dégagement gazeux est observé, inoculer un tube de bouillon *EC* (4.3) avec une anse (5.5) et incuber en bain d'eau (5.3) ou dans une étuve (5.2) réglée à 44°C pendant $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Si, à ce stade, il n'y a aucun gaz visible dans le bouillon *EC* (4.3), poursuivre l'incubation jusqu'à $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

NOTE - Pour les coquillages marins vivants, la durée d'incubation peut être limitée à $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

8.1.4 Ensemencement et incubation de l'eau peptonée :

Après incubation en (8.1.3), si un dégagement gazeux est observé, inoculer avec une anse (5.5) un tube d'eau peptonée (4.4), préchauffé à 44°C . Incuber pendant $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ à 44°C .

8.1.5 Examen pour la production d'indole :

Ajouter 0,5 ml de réactif indole (4.5) aux tubes d'eau peptonée (4.4) et incuber selon (8.1.4).

Bien mélanger et examiner après 1 min. Une couleur rouge dans la phase alcoolique indique la présence d'indole.

8.1.6 Interprétation :

Est considéré comme positif, le milieu d'enrichissement sélectif incubé en (8.1.2), montrant, après la subculture et l'incubation en (8.1.3) et (8.1.4), un dégagement gazeux visible dans le tube de bouillon *EC* (4.3) et une production d'indole dans le tube d'eau peptonée (4.4).

8.2 Méthode de dénombrement :

8.2.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions :

Préparer un nombre suffisant de dilutions pour assurer que tous les tubes de la dilution finale donneront un résultat négatif.

8.2.2 Inoculation et incubation du milieu d'enrichissement sélectif (bouillon au lauryl sulfate) :

8.2.2.1 Une série de trois tubes pour chaque dilution est prévue. Il est nécessaire d'incuber une série de cinq tubes pour les coquillages marins vivants ou pour d'autres types de produits, et/ou quand une exactitude plus grande des résultats est exigée.

8.2.2.2 Prendre trois tubes double concentration de milieu d'enrichissement sélectif (4.2.1.a), transférer dans chacun de ces tubes 10 ml de la suspension mère en utilisant une pipette stérile (5.7). Ces prises d'essai correspondent à 1 g d'échantillon par tube.

8.2.2.3 Prenez alors trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif simple concentration (4.2.1.b), transférer à chacun de ces tubes 1 ml de la suspension initiale en utilisant une nouvelle pipette stérile (5.7). Ces prises d'essai correspondent à 0,1 g d'échantillon par tube.

8.2.2.4 Pour chacune des nouvelles dilutions (égal à 0,01 g, 0,001 g, etc. d'échantillon par tube), procéder comme en (8.2.2.3), en utilisant une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution. Mélangez soigneusement l'inoculum et le milieu.

8.2.2.5 Placer dans l'incubateur (5.2) les tubes de milieu d'enrichissement sélectif double concentration préparés en (8.2.2.2) et les tubes simple concentration préparés en (8.2.2.3) et (8.2.2.4), à 37 °C pendant 24 h $\pm$ 2 h.

Si, à ce stade, ni la production de gaz, ni l'opacité empêchant l'observation de dégagement gazeux ne sont observés poursuivre l'incubation jusqu'à 48 h $\pm$ 2 h.

Pour les coquillages marins vivants, la durée d'incubation doit être de 48 h $\pm$ 2 h.

Pour certains produits laitiers (caséine par exemple), la cloche de Durham peut être collée au fond des tubes de milieu d'enrichissement sélectif. Si, après 48 h de temps d'incubation, une opacité sans formation de gaz est observée, ensemencher un bouillon *EC* (4.3) à partir du bouillon précédent puis continuer la méthode telle que décrite en (8.2.3).

8.2.3 Subculture et incubation du milieu sélectif (bouillon *EC*) :

8.2.3.1 Pour chaque tube de milieu double concentration et pour chaque tube de milieu simple concentration incubé selon (8.2.2.5), si on observe une opacité, un aspect trouble ou un dégagement gazeux, réaliser une subculture dans un tube de bouillon *EC* (4.3) à l'aide d'une anse (5.5).

8.2.3.2 Incuber les tubes en (8.2.3.1) dans un bain d'eau (5.3) ou une étuve (5.2) à 44 °C pendant 24 h $\pm$ 2 h. Si, à ce stade, il n'y a aucun dégagement gazeux visible dans le bouillon *EC* (4.3), poursuivre l'incubation jusqu'à 48 h $\pm$ 2 h.

La durée d'incubation doit être de 24 h $\pm$ 2 h pour les coquillages marins vivants.

8.2.4 Inoculation et incubation de l'eau peptonée :

Pour chaque tube incubé selon (8.2.3.2) et montrant un dégagement gazeux visible, inoculer avec une anse (5.5) un tube d'eau peptonée (4.4), préchauffé à 44 °C. Incuber pendant 48 h $\pm$ 2 h à 44 °C.

8.2.5 Examen pour la production d'indole :

Ajouter 0,5 ml de réactif indole (4.5) aux tubes d'eau peptonée (4.4) incubés en (8.2.4).

Bien mélanger et examiner après 1 min. Une couleur rouge de la phase alcoolique indique la présence d'indole.

8.2.6 Interprétation :

Est considéré comme positif, chaque tube de milieu d'enrichissement sélectif double concentration (4.2.1.a) et simple concentration (4.2.1.b) incubé selon (8.2.2) montrant, après la subculture et l'incubation en (8.2.3) et (8.2.4), un dégagement gazeux visible dans le tube de bouillon *EC* (4.3) et une production d'indole dans le tube d'eau peptonée (4.4).

Pour chaque dilution, comptez le nombre de tubes de résultat positif de milieu double concentration (4.2.1.a) et simple concentration (4.2.1.b).

9. EXPRESSION DES RESULTATS :

Conformément à l'interprétation des résultats (8.1.6), conclure la présence ou l'absence d'*Escherichia coli* présumés dans la masse en grammes ou le volume en millilitres de l'échantillon pour essai.

Calculer le nombre le plus probable (NPP) d'*Escherichia coli* présumés de chacun des tubes positifs pour chacune des dilutions, par référence aux tables statistiques fixées par les techniques reconnues.