



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES, DES COLIFORMES FÉCAUX ET DES E. COLI

1. APPLICATION

La présente méthode est applicable au dénombrement des coliformes dans le lait, la crème et autres produits laitiers pasteurisés non fermentés, le fromage sans affinage, y compris le fromage frais et le caillé lactique avec au moins 50% d'humidité (fromage cottage) fabriqué à partir de lait pasteurisé, les produits laitiers congelés (crème glacée et lait glacé), les produits laitiers fermentés, le beurre, la poudre de lait et autres produits laitiers en poudre ainsi qu'au dénombrement des *Escherichia coli* dans le fromage fabriqué à partir d'une source pasteurisée ou non pasteurisée afin de déterminer s'il y a conformité avec les exigences de l'article B.08.011 du Règlement de la Loi sur les aliments et drogues. Cette méthode révisée remplace les méthodes MFO-2 et -4 datées du 30 novembre 1981 et la méthode MFO-14 datée du 30 novembre 1983.

2. DESCRIPTION

2.1 Il a été démontré que cette méthode NPP produit des résultats satisfaisants pour la détection des coliformes, des coliformes fécaux et des *E. coli* (8.1-8.7) dans des aliments naturellement contaminés.

2.2 Méthodes équivalentes

Les méthodes MFHPB-17, MFHPB-19, MFHPB-26, MFHPB-27, MFHPB-31, MFHPB-34 et MFHPB-35, considérées équivalentes à la méthode NPP présentée ici, peuvent être utilisées pour confirmer la présence de coliformes ou d'*E. coli* et déterminer la conformité avec le Règlement de la Loi sur les aliments et drogues cité ci-dessus ainsi qu'au Tableau 1 de la présente méthode. Toutes ces méthodes se retrouvent dans le Volume 2 du Compendium de méthodes

3. PRINCIPE

La présence de coliformes dans un aliment indique habituellement que le produit a été fabriqué dans des conditions non hygiéniques. La présence de coliformes fécaux, et spécialement d'*E. coli*, indique habituellement que le produit a pu être potentiellement contaminé par des matières fécales après transformation. L'épreuve consiste en une technique de fermentation dans des éprouvettes multiples qui permet d'estimer le « nombre le plus probable » (NPP) de coliformes totaux, de coliformes fécaux et d'*E. coli*.

4. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 1.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 1.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux suivants (1 à 7) sont disponibles dans le commerce et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'Annexe G du Volume 1 ainsi que la référence citée en 8.3 pour la composition de chaque milieu.

- 1) Eau peptonée (0,1 %)
- 2) Citrate de sodium aqueux (2,0 %), tempéré à 40-45 °C
- 3) Bouillon tryptosé au lauryl-sulfate (LST)
- 4) Bouillon lactosé au vert brillant et aux sels biliaires à 2 % (BGLB)
- 5) Bouillon d'*Escherichia coli* (EC) ou
Bouillon d'EC avec MUG (4-méthylumbelliferyl-β-D-glucuronide)
- 6) Gélose à l'éosine et au bleu de méthylène de Levine (L-EMB) ou gélose Endo
- 7) Gélose nutritive (NA)
- 8) Bain-marie recouvert doté d'un système de circulation afin de maintenir la température à 45,0 °C. Le niveau d'eau doit être au-dessus du milieu contenu dans les éprouvettes immergées.
- 9) Thermomètre étalonné et homologué
- 10) Incubateur, 35 °C.

NOTE : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être réglé à 35 +/-1,0 °C. De même, des températures plus basses à 30 ou 25 °C peuvent être à +/-1,0 °C près. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à +/- 0,5 °C près. Des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

- 11) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 12) Cultures témoins (utiliser des cultures ATCC ou l'équivalent) :
témoin positif : *E. coli*
témoin négatif : *Enterobacter aerogenes* (EMB, GIMViC)
Salmonella berta (bouillons NPP)

Note : Certaines souches d'*E. aerogenes* donnent des réactions faussement positives dans des bouillons NPP (LST, BGLB et EC) en produisant une petite bulle de gaz. C'est pourquoi il faut utiliser *S. berta* pour ces bouillons et *E. aerogenes* pour la gélose EMB et les épreuves GIMViC.

- 13) pH mètre ou papier pH capable de distinguer de 0,3 à 0,5 unité de pH, dans l'échelle de pH 5,0 à 8,0.
- 14) Mélangeur vortex ou l'équivalent

15) Produits nécessaires à la confirmation (disponibles dans le commerce) :

Les produits suivants peuvent être nécessaires pour la confirmation : utiliser A ou B (voir 7.6). Le choix d'autres méthodes d'identification (7.6.2) peut demander d'autres milieux :

- A. Milieu IMViC et réactifs :
 - a. Bouillon de tryptone (ou de tryptophane)
Réactifs pour l'indole
 - b. Bouillon de glucose tamponné
Réactifs pour l'épreuve de Voges-Proskauer
Solution de rouge de méthyle
 - c. Gélose au citrate de Simmon (SC)
- B. Trousses d'identification rapide

16) Réactifs pour la coloration de Gram

7. MARCHE À SUIVRE

Chaque unité d'échantillonnage doit être analysée individuellement. Effectuer l'analyse en suivant les instructions ci-dessous :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Avant l'analyse au laboratoire, sauf dans le cas des aliments stables à température de la pièce, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5 °C) ou au congélateur selon la nature du produit. Faire décongeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Préparer de l'eau peptonée stérile pour l'analyse de la crème glacée et du lait glacé, et du citrate de sodium stérile (2 %) tempéré à 40-45 °C pour l'analyse du fromage.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail au moyen d'un désinfectant approprié.

7.3 Préparation de l'échantillon

- 7.3.1 Pour que l'unité d'analyse soit vraiment représentative, agiter les liquides ou les matières fluides jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas d'un solide, prélever des portions à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.
- 7.3.2 Préparer une dilution 1:10 de l'aliment en mélangeant de façon aseptique 11 (10) g ou ml (l'unité d'analyse) à 99 (90) ml du diluant requis, de la façon indiquée au tableau II.
- 7.3.3 Mélanger les dilutions en les agitant 25 fois en suivant un arc d'un pied (30 cm) pendant 7 secondes environ. Dans le cas des produits qu'il faut homogénéiser, utiliser un mélangeur ou un stomacher pendant le temps minimum nécessaire pour produire une suspension homogène; pour éviter de surchauffer, ne pas mélanger pendant plus de 2,5 min.
- 7.3.4 Dans le cas des aliments qui ont tendance à mousser, régler le mélangeur à basse vitesse et prélever une portion aliquote sous l'interface liquide/mousse.

- 7.3.5 Vérifier le pH de la suspension d'aliment. Si le pH ne se situe pas entre 5,5 et 7,6, ajuster le pH à 7,0 en y ajoutant du NaOH 1N ou du HCl 1N stérile. Laisser l'homogénat d'aliments secs (dilution 1:10) reposer à la température de la pièce pendant 15 minutes. Dans tous les autres cas, poursuivre l'analyse sans tarder.
- 7.3.6 Au besoin, préparer des dilutions décimales successives en utilisant une pipette stérile distincte pour effectuer chaque transfert.
- 7.3.7 Agiter toutes les dilutions (7.3.3) immédiatement avant d'effectuer les transferts afin d'assurer l'uniformité de la distribution des micro-organismes présents.

7.4 Dénombrement des coliformes

7.4.1 Épreuves de présomption

- 7.4.1.1 Utiliser du bouillon tryptosé au lauryl-sulfate (LST). Distribuer des volumes de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules à gaz (tubes de Durham inversés).
- 7.4.1.2 Placer les éprouvettes de bouillon LST en rangées de cinq et les marquer de façon à identifier l'échantillon et la dilution à ensemercer (tableau III).
- 7.4.1.3 Ensemercer chacune des séries de cinq éprouvettes de bouillon LST avec chacune des dilutions d'homogénat alimentaire, en suivant les indications du tableau III.
- 7.4.1.4 Afin de vérifier les conditions de croissance dans les bains-marie à température élevée, ensemercer une culture d'*E. coli* qui peut fermenter le lactose et produire du gaz à 45 °C et une culture de *Salmonella berta* dans des éprouvettes de bouillon LST comme témoins positif et négatif respectivement pour chaque bain utilisé. Transférer dans tous les milieux utilisés aux différentes étapes de l'analyse. Préparer une éprouvette de milieu non ensemençé correspondant à chaque étape de l'analyse comme témoin négatif de milieu.
- 7.4.1.5 Mélanger doucement l'inoculum et le milieu par agitation ou par rotation, mais éviter d'emprisonner de l'air dans les ampoules à gaz.
- 7.4.1.6 Incuber les éprouvettes de bouillon LST ensemençées à 35 °C pendant 24 ± 2 h. Vérifier s'il y a eu production de gaz (formation d'une bulle de gaz ou d'effervescence), consigner les résultats et, au besoin, soumettre le même jour toutes les éprouvettes positives qui contiennent du gaz à l'épreuve de confirmation et à l'épreuve de la présence présumée d'*E. coli* (coliformes fécaux)(7.4.2 et 7.4.3).
- 7.4.1.7 Incuber les éprouvettes qui ne contiennent pas de gaz pendant 24 ± 2 h de plus, examiner, consigner le nombre d'éprouvettes supplémentaires qui contiennent du gaz, ajouter au résultat obtenu à l'étape 7.4.1.6 et soumettre les éprouvettes supplémentaires qui contiennent du gaz à l'épreuve de confirmation et à l'épreuve de la présence présumée d'*E. coli* (coliformes fécaux).
- 7.4.1.8 S'il n'y a pas de formation de gaz dans toutes les éprouvettes après 48 ± 4 h d'incubation, l'épreuve de présomption est négative.
- 7.4.1.9 Calculer le NPP de coliformes présumés par g(ml) d'aliment en suivant les instructions de l'annexe D pour convertir en NPP le nombre d'éprouvettes contenant du gaz. Consigner les résultats.

7.4.2 Épreuve de confirmation

- 7.4.2.1 Utiliser du bouillon BGLB réparti en volumes de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules à gaz.

- 7.4.2.2 Mélanger par agitation ou par rotation les éprouvettes de bouillon LST positif, et transférer une anse de chaque éprouvette dans une éprouvette de bouillon BGLB (éviter d'entraîner la pellicule). On peut utiliser des bâtonnets stériles en bois pour effectuer les transferts. Ne pas jeter les éprouvettes de bouillon LST pour le moment.
 - 7.4.2.3 Mélanger doucement l'inoculum et le milieu par agitation ou rotation, mais éviter d'emprisonner de l'air dans les ampoules à gaz.
 - 7.4.2.4 Incuber les éprouvettes de bouillon BGLB ensemencé à 35 °C pendant 24 ± 2 h. Vérifier s'il y a eu production de gaz (bulle de gaz ou effervescence) et consigner les résultats.
 - 7.4.2.5 Incuber les éprouvettes négatives pendant 24 ± 2 h de plus, examiner de nouveau, consigner le nombre d'éprouvettes positives supplémentaires et ajouter au résultat obtenu en 7.4.2.4.
 - 7.4.2.6 S'il y a eu formation de gaz au cours de la période d'incubation de 48 ± 4 h, l'épreuve de confirmation est positive.
 - 7.4.2.7 Calculer le « NPP » de coliformes confirmés par g (ml) d'aliment en suivant les instructions de l'annexe D pour convertir en NPP le nombre d'éprouvettes positives. Consigner les résultats.
- 7.4.3 Détermination du nombre présumé d'*E. coli* (coliformes fécaux) dans le fromage**
- 7.4.3.1 Utiliser du bouillon EC (avec ou sans MUG) réparti en volumes de 10 ml dans des éprouvettes contenant des tubes à gaz.
 - 7.4.3.2 Mélanger par agitation ou par rotation les éprouvettes de bouillon LST positif (obtenues en 7.4.1) et transférer une anse de chaque éprouvette dans une éprouvette de bouillon EC (éviter d'entraîner la pellicule). On peut utiliser des bâtonnets stériles en bois pour effectuer les transferts. Le transfert doit se faire en même temps que l'étape 7.4.2.2 ci-dessus.
 - 7.4.3.3 Mélanger délicatement l'inoculum et le milieu par agitation ou rotation, mais éviter d'emprisonner de l'air dans les ampoules à gaz.
 - 7.4.3.4 Incuber les éprouvettes de bouillon EC ensemencées dans un bain-marie à 45 °C pendant 24 ± 2 h. Maintenir le niveau de l'eau dans le bain-marie à au moins 1 cm au-dessus du niveau du milieu contenu dans les éprouvettes.
 - 7.4.3.5 Examiner pour déterminer s'il y a eu production de gaz (bulle de gaz ou effervescence), consigner les résultats et soumettre le jour même toutes les éprouvettes positives à l'épreuve d'identification d'*E. coli* (7.5 ci-dessous).
 - 7.4.3.6 Incuber les éprouvettes négatives pendant 24 ± 2 h supplémentaires, examiner, consigner le nombre d'éprouvettes positives supplémentaires, ajouter au résultat obtenu à l'étape 7.4.3.5 et commencer l'identification d'*E. coli* pour les éprouvettes positives supplémentaires.
 - 7.4.3.7 S'il y a eu production de gaz au cours de la période d'incubation de 48 ± 4 h, l'épreuve de présomption de la présence d'*E. coli* (coliformes fécaux) est positive.
 - 7.4.3.8 Il faut aussi examiner les éprouvettes contenant le bouillon EC-MUG à la lumière UV (366 nm) pour y déceler l'activité de la glucuronidase. Une fluorescence bleu-vert indique la présence présumée d'*E. coli* (coliformes fécaux).

Précautions : Suivre les mesures de sécurité décrites dans les instructions du fabricant pour utiliser la lumière UV. Il faudrait examiner aussi les témoins négatifs du bouillon EC-MUG à la lumière UV pour s'assurer qu'il n'y a pas de fluorescence dans les éprouvettes.

7.4.3.9 Calculer le NPP d'« *E. coli* présumés » par g(ml) d'aliment en suivant les instructions de l'annexe D pour convertir le nombre d'éprouvettes positives en valeurs NPP. Consigner les résultats.

7.5 Identification d'*E. coli*

- 7.5.1 Agiter doucement chacune des éprouvettes de bouillon EC positives contenant du gaz (7.4.3.5 et 7.4.3.6) et ensemercer une anse de la culture sur une boîte de gélose L-EMB ou Endo séparée.
- 7.5.2 Incuber les boîtes à 35 °C pendant 18 à 24 h et examiner afin de déceler la présence de colonies non mucoïdes, nucléées, avec ou sans reflets métalliques.
- 7.5.3 Si les colonies sont bien isolées sur les boîtes de géloses L-EMB ou Endo, prélever deux colonies typiques et les ensemercer sur des pentes de gélose nutritive (NA). Incuber à 35 °C pendant 18-24 h. Utiliser ces cultures pour procéder à l'épreuve de confirmation (7.6). Si les colonies ne sont pas bien isolées sur les boîtes de gélose L-EMB ou Endo, poursuivre avec 7.5.4.
- 7.5.4 Choisir deux colonies typiques de chaque boîte et les ensemercer en stries sur des boîtes de gélose nutritive distinctes afin d'obtenir des colonies isolées.
- 7.5.5 Incuber les boîtes de gélose nutritive à 35 °C pendant 18-24 h et prélever de chacune une colonie isolée et l'ensemencer sur une pente de gélose nutritive distincte.
- 7.5.6 Incuber les pentes de gélose à 35 °C pendant 18-24 h. Utiliser ces cultures pour procéder à l'épreuve de confirmation.

7.6 Confirmation de la présence d'*E. coli*

Préparer un frottis à partir de la pente, faire la coloration de Gram et examiner au microscope. Consigner les résultats. Si les micro-organismes ne sont pas des bâtonnets Gram-négatifs non sporulés, ils ne sont pas considérés comme *E. coli*. On peut pousser la confirmation plus loin en effectuant les épreuves GIMViC (7.6.1) ou en utilisant une trousse d'identification rapide (7.6.2).

7.6.1 GIMViC

À partir d'une des deux colonies ensemençées sur une pente de gélose nutritive (étape 7.5.5) inoculer une éprouvette de bouillon EC (milieu G) ainsi que les milieux IMViC. L'ensemble des milieux GIMViC comprend le milieu « G » qui est le deuxième bouillon EC, le milieu « I », qui est le bouillon de tryptone, le milieu « M » et « V », qui est le bouillon glucosé tamponné et le milieu « C », qui est la gélose au citrate de Simmon. Si les tests GIMViC ne sont pas effectués dans les 96 h suivant l'ensemencement des pentes de gélose à partir des boîtes de gélose nutritive, préparer de nouvelles pentes de gélose nutritive afin d'effectuer les épreuves GIMViC. Inoculer une éprouvette de chacun des milieux GIMViC pour chacun des isolats à identifier. Inoculer *E. coli* et *E. aerogenes* dans chacun des milieux GIMViC comme témoins positif et négatif.

7.6.1.1 Production de gaz à 45 °C (G)

Incuber les éprouvettes ensemençées de milieu G (bouillon EC) dans un bain-marie à 45,0 °C pendant 24 ± 2 h. Vérifier s'il y a production de gaz. S'il n'y a pas de gaz,

incuber pendant 24 ± 2 h supplémentaires et examiner de nouveau. Consigner les résultats.

7.6.1.2 Indole (I)

Incuber les éprouvettes ensemencées de bouillon de tryptone ou de tryptophane à $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 ± 2 h. Ajouter à chaque éprouvette du réactif pour l'indole (disponible dans le commerce). Suivre les instructions du fabricant. L'apparition d'une couleur rouge foncé dans la couche d'alcool indique une réaction positive. Une couleur orange indique probablement la présence de skatole et la réaction peut être considérée comme \pm . Une couleur jaune est considérée comme une réaction négative.

7.6.1.3 Épreuve au rouge de méthyle et réaction de Voges-Proskauer (RM et VP)

Ensemencer deux éprouvettes de bouillon glucosé tamponné et incuber à $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 48 ± 2 h. Utiliser les réactifs RM et VP (disponibles dans le commerce). Suivre les instructions du fabricant. La réaction de VP est positive si une couleur rose éosine se développe après 5-10 minutes. L'épreuve au RM est positive si une couleur rouge se développe et négative si la couleur est jaune.

7.6.1.4 Épreuve au citrate de Simmon (C)

Pour ensemencer les pentes de gélose SC, utiliser une aiguille droite et appliquer une petit inoculum. Éviter de transférer des nutriments avec l'inoculum, car ces nutriments (carbone) pourraient provoquer la formation d'une couleur bleue et une interprétation erronée. Incuber les pentes de gélose à $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 48 ± 2 h et observer pour y déceler toute croissance. Toute croissance visible (réaction positive) est généralement accompagnée d'un changement de couleur, qui vire du vert au bleu foncé.

7.6.1.5 Le tableau IV contient la réaction GIMViC caractéristique d'*E. coli*. On peut au besoin différencier les coliformes communs en utilisant les données du tableau V.

7.6.1.6 Si l'on obtient, dans les milieux IMViC, des réactions caractéristiques d'*E. coli*, qu'il y ait eu ou non production de gaz dans le milieu G, il n'est pas nécessaire d'analyser le deuxième isolat. Cependant, si le premier isolat présente des résultats non caractéristiques des milieux IMViC, il faut soumettre l'autre isolat aux réactions GIMViC. Répéter les étapes de confirmation. Si les deux isolats ne produisent pas des résultats IMViC typiques d'*E. coli*, on considère alors qu'il n'y a pas d'*E. coli* dans l'éprouvette de bouillon EC primaire d'où proviennent les isolats.

7.6.2 Trousses d'identification rapide

Des trousses d'identification rapide peuvent être utilisées pour identifier *E. coli*. Suivre les instructions du fabricant.

7.6.3 Calcul du NPP

Calculer le NPP d'*E. coli* par g(ml) d'aliment en suivant les instructions de l'annexe D du volume 1, en fonction du nombre d'éprouvettes qui contiennent des bactéries Gram-négatives non sporulées en forme de bâtonnet, qui ont produit les réactions GIMViC caractéristiques d'*E. coli* indiquées ci-dessus, ou confirmées comme *E. coli* au moyen de trousses d'identification rapide.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 American Public Health Association. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods; Third Edition. C. Vanderzant et D.F. Splittstoesser (éds.). American Public Health Association Inc., 1015 Fifteenth Street, N.W., Washington, D.C. 20005.
- 8.2 American Public Health Association. 1992. Standard Methods for the Examination of Dairy Products; 16th Edition. R.T. Marshall (éd.). American Public Health Association Inc., 1015 Fifteenth Street, N.W., Washington, D.C. 20005.
- 8.3 American Public Health Association. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water; Nineteenth Edition. A.D. Eaton, L.S. Clescen et A.E. Greenberg (éds.). American Public Health Association Inc., 1015 Fifteenth Street, N.W., Washington, D.C. 20005.
- 8.4 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.5 International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1978. Microorganisms in Foods; Their Significance and Method of Enumeration: Second Edition; University of Toronto Press.
- 8.6 McGuire, O.E. 1964. Wood Applicators for the Confirmatory Test in Bacteriological Analysis of Water. Public Health Reports, **79**: 812-814.
- 8.7 Powers, EM. et T.G. Latt. 1977. Simplified 48-Hour IMViC Test: an Agar Plate Method. Appl. Environ. Microbiol., **34**: 274-279.

TABLEAU I

Tolérances et plans d'échantillonnage pour la détermination des coliformes et d'*E. coli* dans des aliments spécifiques

Détermination	Aliment	Règlement de la Loi sur les aliments et drogues	Tolérances			
			Nombre d'unités d'échantillonnage (n)	Nombre acceptable (c)	Concentration de microorganismes (m)	Concentration maximale de microorganismes (M)
Coliformes	lait, crème et autres produits laitiers non-fermentés pasteurisés	B.08.011	5	2	1	10
Coliformes	le fromage sans affinage, y compris le fromage frais et le caillé lactique avec au moins 50% d'humidité (fromage cottage) fabriqué à partir de lait pasteurisé, les produits laitiers congelés (crème glacée et lait glacé), les produits laitiers fermentés, le beurre, la poudre de lait et autres produits laitiers en poudre	B.08.011	5	2	10	100
E. coli	le fromage fabriqué à partir d'une source pasteurisée ou non pasteurisée	B.08.011	5	2	100	1,000

- Lot :** Quantité définie ou unité de production qu'il est possible d'identifier par le même code. Lorsqu'il n'y a pas de code d'identification, un lot peut être considéré comme a) la quantité de produit fabriquée essentiellement dans les mêmes conditions, au même établissement et représentant au plus une journée de production; ou b) la quantité de la même variété de produit provenant du même fabricant qui est disponible pour échantillonnage à un endroit fixe.
- n :** Nombre d'unités d'échantillonnage habituellement, mais pas toujours, choisies au hasard à partir d'un lot et examinées afin de répondre aux exigences d'un plan d'acceptation particulier. C'est ce qu'on appelle l'échantillon.
- m :** La valeur numérique de « m » représente des concentrations acceptables du micro-organisme, habituellement par g ou ml. Dans un plan à deux classes, « m » distingue les unités d'échantillonnage de qualité acceptable de celles qui sont de qualité inacceptable; dans un plan à trois classes, « m » sépare les unités d'échantillonnage de qualité acceptable de celles qui sont de qualité marginalement acceptable. Les valeurs « m » indiquées dans le tableau sont fondées sur des niveaux atteignables par des BPF.
- M :** (Pour un plan à trois classes seulement), la valeur numérique de « M » représente des concentrations inacceptables de micro-organismes, habituellement par g ou ml, qui indiquent un danger pour la santé ou traumatisme (potentiel), une détérioration imminente ou un manquement grossier à l'hygiène; « M » distingue les unités d'échantillonnage de qualité marginale de celles qui sont de qualité inacceptable. Une valeur établie pour une unité d'échantillonnage d'un échantillon qui est supérieure à « M » rend le lot en question inacceptable.
- c :** Nombre maximal permis d'unités d'échantillonnage de qualité marginale. « c » est le nombre d'acceptation d'un plan. Lorsque ce nombre est dépassé, le lot devient inacceptable.

TABLEAU II. Préparation de la dilution initiale

Type de produit alimentaire	Préparation	Traitement
produits laitiers congelés (crème glacée, lait glacé)	pipetter directement dans le bouillon LST ou dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
tous les fromages	peser dans du citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) aqueux à 2 % porté au préalable à 45 °C	passer au mélangeur ou au « stomacher »

TABLEAU III. Méthode d'inscription et d'ensemencement

Inscription sur les éprouvettes*	Dilution		Volume de dilution ensemencé dans les éprouvettes de bouillon de LST	Quantité du produit que renferme chaque éprouvette
0	non dilué	10^0	1 ml de liquide non dilué dans 10 ml de LST à concentration simple	1 ml
0	non dilué	10^0	10 ml d'une dilution à 10^{-1} de solides dans 10 ml de LST à concentration double	1 g
1	1:10	10^{-1}	1 ml d'une dilution à 10^{-1} dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,1 g ou ml
2	1:100	10^{-2}	1 ml d'une dilution à 10^{-2} dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,01 g ou ml
3	1:1000	10^{-3}	1 ml d'une dilution à 10^{-3} dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,001 g ou ml
4	1:10000	10^{-4}	1 ml d'une dilution à 10^{-4} dans 10 ml de milieu à concentration simple	0,0001 g ou ml

On peut ensemer d'autres dilutions de l'aliment de la même façon, dans le milieu à concentration simple, selon le niveau prévu de contamination de l'aliment.

* On peut utiliser d'autres systèmes d'inscription.

TABLEAU IV

Résultats GIMViC typiques des biotypes *E. coli*

	Gaz à 45 °C	Indole	Rouge de méthyle	Voges-Proskauer	Citrate
	G	I	M	V	C
Type I	+	+	+	-	-
Type II (anaérogène)	-	-	+	-	-

Tableau V**

Différenciation de coliformes communs

	Formation de gaz dans bouillon EC à 45 °C ± 0,2 °C	Test de l'indole	Test au rouge de méthyle	Réaction Voges-Proskauer	Croissance sur citrate
<i>Escherichia coli</i>					
Type I (typique)	+	+	+	-	-
Type II (anaérogène)	-	-	+	-	-
Intermédiaires					
Type I	-	-	+	-*	+
Type II	-	+	+	-*	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>					
Type I	-	-	-	+	+
Type II	-	+	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>					
Irrégulier					
Type I	-	+	+	-	-
Type II	+	-	+	-	-
Type VI	+	-	-	+	+
Irrégulier					
autres types			Réactions variables		

* On constate à l'occasion des réactions positives faibles.

** Référence 8.5.

La méthode décrite ci-dessus qui comporte 14 pages et porte l'identification MFO-23 et la date de Juillet 2002 est par la présente désignée « méthode officielle » mentionnée à l'article B.08.011 du Règlement sur les aliments et drogues pour l'analyse microbiologique du lait, la crème et autres produits laitiers pasteurisés non fermentés, le fromage sans affinage, y compris le fromage frais et le caillé lactique contenant au moins 50% d'humidité (fromage cottage) fabriqué à partir de lait pasteurisé, les produits laitiers congelé (crème glacée et lait glacé), les produits laitiers fermentés, le beurre, la poudre de lait et autres produits laitiers en poudre et le fromage fabriqué à partir d'une source pasteurisée ou non pasteurisée.

Le sous-ministre adjoint