



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES *SALMONELLA* DANS LES ALIMENTS

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable à la détection des *Salmonella* viables dans le cacao, le chocolat, la poudre de lait et autres produits laitiers en poudre, les cuisses de grenouille, les oeufs liquides et autres ovoproduits afin de déterminer s'il y a conformité aux articles B.04.012, B.08.011, B.21.031 et B.22.033 du Règlement de la *Loi sur les aliments et drogues*. Cette méthode révisée remplace les méthodes MFO-6, -10, -11 et -12, toutes datées du 30 novembre 1981.

2. DESCRIPTION

2.1 La présente version révisée comprend les modifications importantes suivantes apportées à la méthode analytique de détection des *Salmonella* spp. d'origine alimentaire:

- 1) Utilisation de la méthode de trempage pour le pré-enrichissement du lait écrémé et autres produits laitiers en poudre (8.1, 8.2).
- 2) Utilisation facultative de cultures réfrigérées de pré-enrichissement et d'enrichissement d'aliments déshydratés spécifiques (cacao, chocolat, poudre de lait et ovoproduits déshydratés) afin d'améliorer la productivité et la flexibilité au laboratoire (8.8, 8.9, 8.11, 8.12).
- 3) Inclusion de l'eau peptonée tamponnée (EPT) comme équivalent du bouillon nutritif pour l'enrichissement d'aliments en milieu non sélectif (8.10).

2.2 Méthodes équivalentes

Les méthodes MFHPB-20 et MFHPB-24, considérées équivalentes à la méthode décrite ici, peuvent être utilisées pour déterminer la présence de *Salmonella* afin d'établir s'il y a conformité avec les articles du Règlement de la Loi sur les aliments et drogues énumérés ci-dessus, ainsi qu'au tableau 1 de la présente méthode. Ces méthodes se retrouvent dans le Volume 2 du Compendium de méthodes.

3. PRINCIPE

La méthode comporte cinq à six étapes distinctes. La manipulation initiale de l'aliment et l'enrichissement en milieu non sélectif (pré-enrichissement) varient selon le type d'aliment examiné (8.6).

3.1 Enrichissement en milieu non sélectif (pré-enrichissement)

L'échantillon est d'abord ensemencé dans un milieu liquide non inhibiteur afin de favoriser la récupération et la croissance des salmonelles soumises à un stress ou endommagées de façon sublétales par des facteurs comme l'exposition à la chaleur, la congélation, la déshydratation, les agents de conservation, une forte pression osmotique ou d'importantes fluctuations de température (8.1; 8.7).

3.2 Enrichissement en milieu sélectif

Des portions de chaque culture de pré-enrichissement sont ensemencées dans deux milieux d'enrichissement afin de favoriser le développement des salmonelles tout en retardant ou inhibant la croissance des micro-organismes compétiteurs (8.5).

3.3 Culture sur gélose sélective

Chaque culture d'enrichissement est ensemencée en stries sur un minimum de 2 géloses sélectives différentielles pour l'isolement des salmonelles (8.6).

3.4 Purification

Si les colonies présumées de *Salmonella* ne sont pas bien isolées, elles sont purifiées sur des géloses de MacConkey ou des géloses sélectives.

3.5 Sélection biochimique

Les isolats sont analysés en fonction de réactions biochimiques déterminantes.

3.6 Identification sérologique

Des antisérums somatiques polyvalents ou de groupage sont utilisés pour confirmer l'identification provisoire des isolats comme membres de la famille des *Salmonella* spp. Pour la confirmation, et si l'identification sérologique n'est pas possible, les cultures devraient être envoyées à un centre de référence pour le sérotypage complet.

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 listés ci-bas (1 à 15) sont disponibles dans le commerce et doivent être préparés et utilisés 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) Bouillon nutritif (BN) ou eau peptonée tamponnée (EPT)
- 2) Bouillon de trypticase soja (peptone tryptique, tryptone)
- 3) Solution aqueuse au vert brillant
- 4) Milieu au lait écrémé
- 5) Bouillon au tétrathionate additionné de vert brillant (TBG)

- 6) Bouillon de sélénite cystine (SC)
- 7) Gélose au sulfite de bismuth (BS)
- 8) Gélose à la sulfapyridine additionnée de vert brillant (BGS)
- 9) Gélose de MacConkey
- 10) Boîtes ou pentes de gélose nutritive (NA) ou l'équivalent
- 11) Gélose aux trois sucres et au fer (TSI)
- 12) Gélose lysine-fer (LIA)
- 13) Gélose à l'urée (de Christensen)
- 14) Saline physiologique stérile
- 15) NaOH 1N et HCl 1N stériles
- 16) Cultures témoins positives: *Salmonella* (utiliser des cultures ATCC ou l'équivalent)
- 17) Trousses commerciales d'analyse biochimique (facultatif)
- 18) Antisérums somatiques polyvalents (O);
Facultatifs : antisérums somatiques de groupe (O); antisérums flagellaires (H)
- 19) Mélangeur, stomacher ou l'équivalent
- 20) pH mètre ou papier pH capable de distinguer de 0,3 à 0,5 unité pH dans l'échelle de pH 5,0 à 8,0
- 21) Incubateurs ou bains-marie capables de maintenir des températures de 35 °C et 42,5 °C.

Note : Il incombe à chaque laboratoire d'assurer que la température des incubateurs ou bains-marie est maintenue au niveau recommandé. 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 de 30 ou 25 °C peuvent être à +/- 1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à la température indiquée +/- 0,5 °C parce que des températures plus élevées peuvent être létales pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

7. MARCHE À SUIVRE

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

7.1.1 Analyser les échantillons le plus tôt possible. Au besoin, conserver les échantillons pendant une période et à une température qui empêcheront la croissance ou la destruction de la microflore endogène. Si des unités d'échantillonnage ont été maltraitées en transit, il faut prélever de nouveaux échantillons dans le lot.

- a) Aliments surgelés: On peut garder au congélateur, à une température de -10 à -20 °C, les unités d'échantillonnage qui ne présentent aucun signe de décongélation à la réception.
- b) Les aliments séchés et les aliments de longue conservation peuvent être gardés à la température ambiante.

- c) Réfrigérer tous les autres aliments, y compris ceux qui arrivent partiellement décongelés; analyser les échantillons le plus rapidement possible, mais de préférence dans les 24 heures suivant leur réception.
- 7.1.2 Faire dégeler les échantillons congelés en 60 minutes à la température ambiante. Si c'est impossible, il faut les laisser décongeler au réfrigérateur (4 à 10 °C). Procéder à l'enrichissement des échantillons décongelés le plus rapidement possible après la décongélation afin d'éviter la sur croissance potentielle d'organismes psychrophiles qui pourraient masquer la croissance des *Salmonella* présentes en faible nombre.
- 7.1.3 Si le poids de l'unité d'échantillonnage reçue pour analyse est inférieur à l'unité analytique recommandée, analyser la quantité totale disponible et ajuster le volume requis de bouillon d'enrichissement non sélectif de façon à maintenir une dilution 1:10. Consigner les deux valeurs.
- 7.1.4 Dans le cas des échantillons qu'il faut mélanger ou passer au stomacher, limiter le temps de traitement au minimum nécessaire pour obtenir une suspension homogène. Une homogénéisation excessive pourrait causer des dommages physiques à la microflore endogène et avoir un effet défavorable sur sa viabilité.
- Dans le cas des produits qui n'ont pas besoin d'être mélangés avec un appareil, disperser l'unité d'analyse dans le bouillon de pré-enrichissement approprié.
- 7.1.5 Utiliser des techniques aseptiques et du matériel stérile à toutes les étapes de l'analyse. Le confinement pendant la manipulation des produits en poudre est primordial si l'on veut éviter la contamination croisée du milieu de travail.

7.2 **Enrichissement en milieu non sélectif (pré-enrichissement)**

7.2.1 Groupement des unités d'analyse

Afin de réduire la charge de travail, on peut regrouper jusqu'à 15 unités d'analyse de 25 g (ml) en un seul échantillon d'analyse (p. ex. , de 375 g ou ml).

Si une unité d'échantillonnage comporte plus d'un contenant, mélanger aseptiquement le contenu des contenants avant de prélever l'unité d'analyse. Si ce n'est pas possible ou pratique, l'unité d'analyse doit alors être constituée de portions égales de chaque contenant.

7.2.2 Analyse des échantillons

- 7.2.2.1 Ajouter l'unité d'analyse (25 g) au bouillon d'enrichissement non sélectif approprié (Tableau II). Le bouillon nutritif (BN) et l'eau peptonée tamponnée (EPT) sont aussi fiables l'un que l'autre et peuvent servir, de façon interchangeable, de milieu général de pré-enrichissement (8.10).
- 7.2.2.2 Si le pH du mélange de pré-enrichissement ne se situe pas entre 6,0 et 7,0, il faut le rajuster avec du NaOH 1N ou du HCl 1N stérile.
- 7.2.2.3 Préparer un témoin positif de *Salmonella* et un témoin négatif de milieu en même temps que les échantillons d'analyse.
- 7.2.2.4 Incuber le milieu de pré-enrichissement et les témoins positif et négatif à 35 °C pendant 18 à 24 h.

NOTE : Tout signe de croissance dans le témoin négatif ou l'absence de croissance dans le témoin positif après incubation rend non valables les résultats de l'épreuve.
--

7.2.3 **Facultatif:**

Réfrigération des cultures de pré-enrichissement (aliments secs: cacao, chocolat, poudre de lait, ovoproduits déshydratés)

- 7.2.3.1 Cette méthode novatrice consiste à réfrigérer pendant 72 h les cultures de pré-enrichissement d'aliments à faible teneur en humidité, ce qui améliore la productivité et la souplesse d'analyse au laboratoire (8,8; 8.9; 8,11; 8,12). Plus précisément, la réfrigération pendant la fin de semaine (72 h) des cultures de pré-enrichissement et d'enrichissement (7.3.3) permet de commencer l'analyse des échantillons du lundi au jeudi inclusivement, ce qui élimine le travail de fin de semaine lorsque pratique.
- 7.2.3.2 Les cultures de pré-enrichissement obtenues le vendredi à partir des échantillons analysés le jour précédent sont réfrigérées (4 à 10 °C) pendant la fin de semaine.
- 7.2.3.3 Le lundi suivant, le contenu de chaque culture de pré-enrichissement réfrigérée est remis en suspension et des portions (1 ml) sontensemencées dans des bouillons TBG_{42,5} et SC₃₅.
- 7.2.3.4 Procéder de la façon décrite aux points 7.3 à 7.7.

7.3 **Enrichissement en milieu sélectif**

- 7.3.1 Avec une pipette stérile, transférer 1,0 ml de la culture de pré-enrichissement dans 9 ml de chacun des bouillons de sélénite cystine (SC) et de tétrathionate vert brillant (TBG).
- 7.3.2 Incuber les bouillons SC et TBG pendant 24 ± 2 h à 35 °C et 42,5 °C respectivement.
- 7.3.3 **Facultatif:**

Réfrigération des cultures d'enrichissement sélectif (aliments secs: cacao, chocolat, poudre de lait, ovoproduits déshydratés)

- 7.3.3.1 Cette méthode novatrice complète celle qui est décrite en 7.2.3 et améliore la productivité et la souplesse d'analyse au laboratoire.
- 7.3.3.2 Les cultures dans les bouillons TBG_{42,5} et SC₃₅ obtenues le vendredi à partir d'échantillons analysés le mercredi précédent sont réfrigérées (4 à 10 °C) pendant la fin de semaine.
- 7.3.3.3 Le lundi suivant, le contenu des cultures dans les bouillons TBG_{42,5} et SC₃₅ réfrigérés est remis en suspension et on ensemence une anse de chaque culture sur des géloses au sulfite de bismuth (BS) et à la sulfapyridine additionnée de vert brillant(BGS).
- 7.3.3.4 Procéder de la façon décrite aux points 7.4 à 7.7.

7.4 **Culture sur gélose sélective**

- 7.4.1 Ensemencer en stries une anse de 10µl de chaque culture d'enrichissement sélectif sur une gélose BS et sur une gélose BGS de façon à obtenir des colonies bien isolées. Les cultures d'enrichissement peuvent également être ensemencées en stries sur d'autres géloses pour l'isolement de *Salmonella*.
- 7.4.2 Incuber les géloses à 35 °C pendant 24 ± 2 h. S'il n'y a pas de colonies suspectes de *Salmonella* sur les géloses BS, incuber les boîtes pendant 24 ± 2 h de plus.

- 7.4.3 Après incubation, inspecter les boîtes pour déceler la présence de colonies présumées de *Salmonella*. Sur la gélose BGS, la couleur des colonies caractéristiques de *Salmonella* varie habituellement du rose au fuchsia, et le milieu qui les entoure est rouge. Sur la gélose BS, les colonies sont noires avec ou sans un reflet métallique et si la période d'incubation se prolonge, le milieu qui les entoure noircit progressivement à cause de la production de H₂S.

NOTE :

- a) Les souches de *Salmonella* qui fermentent le lactose ou le sucrose ou les deux prennent une apparence de coliformes (verdâtre) sur la gélose BGS. Une forte croissance d'autres microorganismes non salmonelles peut également masquer la présence de colonies de *Salmonella*.
- b) La gélose BS peut retarder la croissance de sérotypes de *Salmonella* autres que *S. typhi*, sauf si l'on fait réfrigérer les boîtes de gélose à 4 °C pendant 24 h avant l'ensemencement (8.4).

- 7.4.4 S'il n'y a pas de colonies suspectes sur les géloses, on considère que l'unité analytique est négative pour la présence de *Salmonella* spp.

7.5 Purification

Si les colonies suspectes ne sont pas bien isolées, procéder aux étapes 7.5.1 à 7.5.4. Si les colonies semblent bien isolées sur les géloses sélectives, procéder à la section 7.6

- 7.5.1 Ensemencer en stries, sur des boîtes de gélose MacConkey ou autre gélose sélective, un minimum de 2 colonies suspectes provenant de chaque gélose présumément positive pour purification.
- 7.5.2 Incuber les géloses à 35 °C pendant 24 ± 2 h.
- 7.5.3 Les colonies typiques de *Salmonella* sont incolores (lactose-négatives) sur la gélose MacConkey. Toutefois, certains biotypes lactose-positifs produisent des colonies roses.
- 7.5.4 Procéder à la section 7.6.

7.6 Sélection biochimique

- 7.6.1 Avec un fil d'ensemencement stérile, prélever des colonies isolées sur les géloses MacConkey (7.5) ou un minimum de 2 colonies typiques bien isolées à partir des géloses sélectives. Avec le même inoculum, inoculer les colonies suspectes dans des géloses aux trois sucres et au fer (TSI) et des géloses lysine-fer (LIA) en ensemençant le culot par piqure et la pente par stries et dans des géloses à l'urée de Christensen en ensemençant la surface complète de la pente. Ces milieux ainsi que les réactions biochimiques sont listés au Tableau III. Des trousse de diagnostic commerciales qui donnent des résultats équivalents peuvent également être utilisées.
- 7.6.2 Afin d'assurer la pureté des colonies qui ont été transférées dans les milieux biochimiques directement à partir des géloses sélectives, inoculer une gélose MacConkey pour obtenir des colonies isolées, préférablement en allant des milieux biochimiques directement sur la gélose.
- 7.6.3 Si des trousse commerciales sont utilisées, inoculer une portion de chaque colonie sur une pente de gélose nutritive (NA) ou l'équivalent pour utilisation lors de l'épreuve sérologique (7.7).
- 7.6.4 Incuber les milieux biochimiques et les géloses à 35 °C pendant 18 à 24 h.

NOTE : Il est possible d'obtenir des résultats biochimiques erronés si les bouchons des éprouvettes n'ont pas été desserrés légèrement pendant l'incubation.

- 7.6.5 Si aucun des isolats d'une unité analytique particulière n'indique la présence possible de *Salmonella*, il faut considérer que l'unité analytique n'en contient pas.

NOTE : Lors de l'interprétation des réactions des TSI et LIA, porter attention à la possibilité de réactions atypiques. Ces dernières incluent une réaction négative pour la lysine et la production de H₂S et une réaction positive pour le lactose et le sucrose. Si une *Salmonella* atypique est suspectée, effectuer la sérologie polyvalente et somatique ainsi qu'une analyse biochimique plus élaborée.

- 7.6.6 Si la présence de *Salmonella* est suspectée, procéder à l'épreuve sérologique à partir de la croissance sur les pentes de TSI, LIA ou NA.
- 7.6.7 Si l'épreuve sérologique n'est pas exécutée dans les 72 h suivantes, ensemercer les isolats suspects sur des pentes de gélose nutritive et incubé à 35 °C pendant 24 ± 2 h.
- 7.6.8 Garder les pentes de gélose au réfrigérateur (4 à 10 °C).
- 7.6.9 Les pentes de gélose nutritive conservées plus de 72 h ne doivent pas être utilisées pour l'épreuve sérologique. Préparer à cette fin des pentes de gélose fraîches.

7.7 Identification sérologique

7.7.1 Épreuve avec les antisérums somatiques polyvalents

- 7.7.1.1 Sur la lame d'agglutination, délimiter les zones suivantes : C+ (témoin positif), C- (témoin négatif) et T (culture d'essai).
- 7.7.1.2 Préparer les antisérums somatiques polyvalents en suivant les instructions du fabricant; ajouter une goutte sur chacune des zones T et C+; ajouter une goutte de solution saline physiologique sur la zone C-.
- 7.7.1.3 Prélever sur une gélose aux trois sucres et au fer, une gélose lysine-fer ou une pente de gélose nutritive, une quantité de culture suffisante pour préparer une suspension modérément dense dans la zone de la culture d'essai (T) et dans la zone du témoin négatif (C-). Prélever l'inoculum à partir de la pente de la gélose inclinée.
- 7.7.1.4 Pour le témoin positif, préparer une suspension similaire d'une culture connue de *Salmonella* dans la zone C+.
- 7.7.1.5 Utiliser un fil ou une anse stérile pour mélanger chacune des suspensions de culture et d'antisérum dans les zones T et C+, et le mélange de solution physiologique et de culture dans la zone C-. Pour éviter la contamination croisée, utiliser une anse ou un fil stérile distinct pour chaque suspension (ou re-stériliser). Faire osciller les préparations sur la lame d'agglutination pendant 1 minute.
- 7.7.1.6 Examiner la lame sur un fond sombre bien éclairé pour déceler la formation d'une agglutination. Les cultures de *Salmonella* agglutinent habituellement en moins d'une minute.
- 7.7.1.7 Il arrive parfois que des micro-organismes étroitement apparentés aux *Salmonella* provoquent des réactions faussement positives. Il est possible de corriger la situation en effectuant des analyses supplémentaires avec des antisérums somatiques de groupage et des antisérums flagellaires. Des analyses biochimiques additionnelles peuvent aussi être requises.
- 7.7.1.8 Les résultats de l'épreuve sérologique pour une culture donnée sont invalidés s'il y a agglutination dans la zone du témoin négatif (auto agglutination).

7.7.2 Épreuve avec les antisérums somatiques de groupage

Dans la mesure du possible, il est avantageux d'analyser les cultures qui indiquent la présence présumée de *Salmonella* avec des antisérums somatiques de groupage. De nombreuses *Salmonella* d'origine alimentaire appartiennent aux groupes B, C, D ou E. Il importe néanmoins de savoir qu'à moins d'avoir un ensemble complet d'antisérums de groupage, les *Salmonella* appartenant à des sérogroupes peu communs peuvent être ratées.

NOTE : Il importe de noter que toute culture qui ne forme pas d'agglutination mais qui présente des réactions biochimiques caractéristiques des *Salmonella* doit être envoyée à un centre de référence de sérotypage pour identification.

- 7.7.2.1 Délimiter les zones suivantes sur une lame d'agglutination : C- (témoin négatif) et T (culture d'essai).
- 7.7.2.2 S'il est possible d'obtenir une culture témoin de *Salmonella* pour chaque groupe somatique analysé, préparer le témoin positif (C+) de la manière décrite en 7.7.1.
- 7.7.2.3 Préparer les antisérums somatiques de groupage en suivant les instructions du fabricant; déposer une goutte sur chacune des zones T et C+ ; ajouter une goutte de solution physiologique sur la zone C-.
- 7.7.2.4 Prélever sur une gélose aux trois sucres et au fer, une gélose lysine-fer ou une pente de gélose nutritive une quantité de culture suffisante pour préparer une suspension modérément dense dans la zone de la culture d'essai et dans celle du témoin négatif. Prélever l'inoculum à partir de la pente de la gélose inclinée.
- 7.7.2.5 Utiliser un fil ou une anse stérile pour mélanger chacune des suspensions de culture et d'antisérum dans les zones T et C+, et le mélange de solution physiologique et de culture dans la zone C-. Pour éviter la contamination croisée, utiliser une anse ou un fil stérile distinct pour chaque suspension (ou re-stériliser). Faire osciller les préparations sur la lame d'agglutination pendant 1 minute.
- 7.7.2.6 Examiner la lame sur un fond sombre bien éclairé pour déceler la formation d'une agglutination. Les cultures de *Salmonella* agglutinent habituellement en moins d'une minute.
- 7.7.2.7 S'il ne se forme pas d'agglutination dans le mélange de culture et d'antisérum de la zone T, répéter la procédure avec un autre antisérum de groupage.
- 7.7.2.8 Si l'épreuve sérologique donne un résultat positif, il faut soumettre la culture à un centre de référence de typage des *Salmonella* pour identification complète.
- 7.7.2.9 Les résultats de l'épreuve sérologique pour une culture donnée sont invalidés s'il y a agglutination dans la zone du témoin négatif (auto agglutination).
- 7.7.2.10 Il faut soumettre à un centre de référence de typage, pour identification, tout isolat ayant donné des résultats négatifs à l'épreuve sérologique mais dont les réactions biochimiques suggèrent la présence de *Salmonella* (Tableau III).

7.7.3 Épreuve avec les antisérums flagellaires (H)

Lorsqu'il est impossible de recourir aux services d'un centre de référence de typage, les isolats de *Salmonella* qui agglutinent avec les antisérums somatiques devraient être soumis à l'épreuve avec les antisérums flagellaires H pour identification complémentaire.

Suivre les instructions du fabricant pour la préparation et l'utilisation des antisérums.
Consulter également la référence *Microorganisms in Food*, Vol. 1 (8.13.).

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Andrews, W.H. 1989. Methods for recovering injured "classical" enteric pathogenic bacteria (*Salmonella*, *Shigella*, and enteropathogenic *Escherichia coli*) from foods. Chapter 3. **Dans** B. Ray (ed.) *Injured Index and Pathogenic Bacteria*, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 55-113.
- 8.2 Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. 1998. *FDA Bacteriological Analytical Manual*, Eighth Edition, Revision A. AOAC International, Arlington, VA.
- 8.3 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.4 D'Aoust, J.-Y. 1977. Effect of storage conditions on the performance of bismuth sulfite agar. *J. Clin. Microbiol.* **5**: 122-124.
- 8.5 D'Aoust, J.-Y. 1981. Update on preenrichment and selective enrichment conditions for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.* **44**:369-374.
- 8.6 D'Aoust, J.-Y. 1984. Effective enrichment-plating conditions for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.* **47**:588-590.
- 8.7 D'Aoust, J.-Y. 1989. *Salmonella*. Chapter 9. **Dans** M.P. Doyle (ed.). *Foodborne Bacterial Pathogens*, Marcel Dekker Inc., New York, NY. pp. 327-445.
- 8.8 D'Aoust, J.-Y., C. Maishment, D.M. Burgener, D.R. Conley, A. Loit, M. Milling et U. Purvis. 1980. Detection of *Salmonella* in refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures. *J. Food Prot.* **43**:343-345.
- 8.9 D'Aoust, J.-Y., H.J. Beckers, M. Boothroyd, A. Mates, C.R. McKee, A.B. Moran, P. Sado, G.E. Spain, W.H. Sperber, P. Vassiliadis, D.E. Wagner et C. Wiberg. 1983. ICMSF Methods Studies. XIV. Comparative study on recovery of *Salmonella* from refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures. *J. Food Prot.* **46**:391-399.
- 8.10 D'Aoust, J.-Y., A.M. Sewell et D.W. Warburton, 1992. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* **16**:41-50.
- 8.11 D'Aoust, J.-Y., A.M. Sewell et P. Greco. 1993. Detection of *Salmonella* in dry foods using refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures: interlaboratory study. *J. of AOAC Int.* **76**:814-821.
- 8.12 D'Aoust, J.-Y., A.M. Sewell et C. McDonald. 1995. Recovery of *Salmonella* spp. from refrigerated preenrichment cultures of dry food composites. *J. AOAC Int.* **78**:1322-1324.
- 8.13 International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1978. *Microorganisms in Foods 1. Their significance and methods of enumeration*. Second edition. University of Toronto Press, Toronto, ON. pp. 169-170.
- 8.14 International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1986. *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. Second edition. University of Toronto Press, Toronto, ON.

TABLEAU I. Tolérances et plans d'échantillonnage pour le dépistage des *Salmonella* 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)
<i>Salmonella</i>	cacao et chocolat	B.04.012	10	0	0	-
	poudre de lait et autres produits laitiers en poudre	B.08.011	20	0	0	-
	cuisse de grenouille	B.21.031	5	0	0	-
	Ovoproduits et oeufs liquides	B.22.033	10	0	0	-

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 lors de l'échantillonnage à un endroit donné.

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 (comme dans le cas de *Salmonella*), « 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. Protocole d'enrichissement en milieu non sélectif (pré-enrichissement)

Type de produit	Nombre d'unités d'échantillonnage	Unité d'échantillonnage	Analyse de l'unité analytique individuelle
Chocolat et cacao	10	100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de milieu au lait écrémé et mélanger.
Poudre de lait et autres produits laitiers en poudre	20	100 g	Ajouter lentement 25 g à 225 ml de solution aqueuse de vert brillant stérile et laisser la poudre s'imbiber. Ne pas mélanger. Il faut s'assurer que la poudre se réhydrate complètement pendant le trempage. Il est contre-indiqué d'utiliser la méthode de trempage pour les composés constitués de poudre de lait de faible solubilité parce que la poudre a tendance à ne pas s'imbiber complètement.
Ovoproduits et oeufs liquides	10	100 g	Mettre 25 g en suspension dans 225 ml de bouillon nutritif ou d'EPT et mélanger.
Cuisses de grenouille	5	≥25 g	Déposer 25 g dans 225 ml de bouillon nutritif ou d'EPT.

TABLEAU III. Épreuves biochimiques déterminantes

Milieu	Réaction	Observation	Réaction typique de <i>Salmonella</i>
Gélose aux trois sucres et au fer (TSI)	Utilisation du lactose ou du sucrose	Réaction positive : Pente jaune Réaction négative : La couleur de la pente ne change pas.	Négative (certaines souches peuvent utiliser un substrat ou les deux).
	Utilisation du dextrose	Réaction positive : Culot jaune avec ou sans poches de gaz Réaction négative : La couleur du culot ne change pas.	Positive
	Production de H ₂ S	Réaction positive : Noircissement du culot ou de la pente ou les deux Réaction négative : Aucun noircissement	Positive (possibilité de dégagement lent de H ₂ S. La réaction peut être inhibée en présence de souches lactose-positives ou sucrose-positives.)
	Formation de gaz	Réaction positive : Poches de gaz dans le milieu Réaction négative : Absence de poches de gaz	Positive
Gélose lysine-fer (LIA)	Production de H ₂ S	Réaction positive : Noircissement du culot ou de la pente ou les deux Réaction négative : Aucun noircissement	Positive
	Lysine décarboxylase	Réaction positive : Le culot demeure pourpre. Réaction négative : Le culot vire au jaune.	Positive
	Lysine-désaminase	Réaction positive : La pente vire au rouge vin. Réaction négative : La couleur de la pente ne change pas.	Négative

Milieu	Réaction	Observation	Réaction typique de <i>Salmonella</i>
Gélose à l'urée de Christensen	Production d'uréase	Réaction positive : La pente vire au rose/rouge Réaction négative : La couleur de la pente ne change pas.	Négative

La méthode décrite ci-dessus qui comporte 15 pages, porte l'identification MFO-21 et est datée de Juillet 2002, est par la présente désignée «méthode officielle» mentionnée dans les articles B.04.012, B.08.011, B.21.031 et B.22.033 du Règlement de la Loi sur les aliments et drogues pour l'analyse microbiologique du cacao, du chocolat, de la poudre de lait et autres produits laitiers en poudre, des cuisses de grenouille, des ovoproduits et oeufs liquides.

Le sous-ministre adjoint