



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES, DES COLIFORMES FÉCAUX ET DES *E. COLI*
DANS L'EAU EN CONTENANTS SCÉLLÉS ET DANS LA GLACE PRÉEMBALLÉE
AU MOYEN DE LA MÉTHODE DU NPP

1. APPLICATION

La méthode du nombre le plus probable (NPP) est applicable au dénombrement des coliformes, des coliformes fécaux et des *Escherichia coli* aérogènes dans l'eau en contenants scellés (y compris l'eau minérale et l'eau de source) et dans la glace préemballée conformément aux articles B.12.001, B.12.004 et B.12.005 du *Règlement d'application de la Loi sur les aliments et drogues*. Cette méthode remplace les méthodes MFO-9 et MFO-15 datées du 30 novembre 1981.

Note : La présente méthode ne doit **pas** servir à isoler et à dénombrer les sérotypes d'*E. coli* qui sont associées à la maladie humaine, en particulier le sérotype entérohémorragique O157:H7. Plusieurs des sérotypes pathogènes ne donnent pas une réaction positive à l'épreuve des coliformes fécaux, si bien que cette méthode ne permettra pas de les détecter et de les récupérer.

2. DESCRIPTION

La technique du NPP fait appel à la méthode de fermentation en tubes multiples, au cours de laquelle au moins trois dilutions décimales de l'échantillon sont ensemencées dans des éprouvettes de bouillon et incubées à une température précise, pendant une période donnée. La méthode est progressive : il faut d'abord déterminer si les éprouvettes contiennent des coliformes, déterminer ensuite si les éprouvettes contiennent également des coliformes fécaux, et enfin confirmer s'il y a présence d'*E. coli*. Il est possible d'estimer le nombre le plus probable de micro-organismes présents à l'aide d'un tableau statistique standard de NPP, selon le nombre d'éprouvettes indiquant la présence ou l'absence des trois groupes de micro-organismes.

Il a été démontré que cette méthode produit des résultats satisfaisants avec l'eau en contenants scellés (y compris l'eau minérale et l'eau de source) et la glace préemballée naturellement contaminées et artificiellement contaminées lors d'études de la DGPSA (données non publiées).

2.1 Méthodes équivalentes

Les méthodes MFHPB-17, MFHPB-19 et MFHPB-26, considérées équivalentes à la méthode présentée ici, peuvent être utilisées pour déterminer la présence ou énumérer les coliformes et les *E. Coli* et déterminer la conformité aux articles de la *Loi des aliments et drogues*, énumérées ci-

dessus, ainsi qu'au Tableau III de la présente méthode. On retrouve ces méthodes dans le Volume 2 du *Compendium des méthodes d'analyse*.

3. PRINCIPE

La méthode du NPP permet de déterminer la présence de coliformes, de coliformes fécaux et d'*E. coli* aérogènes dans l'eau. En bref, cette méthode fait appel à la dilution en série des micro-organismes cibles dans l'échantillon, en cinq parties aliquotes, jusqu'à extinction (8.6). La concentration probable des micro-organismes cibles est ensuite estimée statistiquement à l'aide d'un tableau de NPP.

La production de gaz sert d'indication de la capacité de fermenter le lactose dans le bouillon LST (épreuve de la détermination des coliformes présomptifs). La production de gaz dans le bouillon BGLB est tenue pour une confirmation de la présence de coliformes. La production de gaz à 45 °C dans le bouillon EC sert de confirmation de la présence de coliformes fécaux. Enfin, lorsque les bouillons EC positifs sont ensemencés sur gélose L-EMB, l'apparition de colonies nucléées caractéristiques dont le centre est sombre, avec ou sans reflets métalliques, indique la présence d'*E. coli*. Les colonies caractéristiques sur gélose L-EMB doivent faire l'objet d'une confirmation faisant appel à d'autres épreuves biochimiques visant à démontrer la présence d'*E. coli*.

4. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'Annexe A du volume 1.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

5.1 Voir l'Annexe B du volume 1.

5.2 Chaque unité d'échantillonnage doit contenir au moins 500 ml.

5.3 Ne pas laisser décongeler les unités d'échantillonnage de glace préemballée pendant le transport.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

| |
|--|
| NOTE: Le superviseur de laboratoire doit s'assurer que l'exécution des analyses, décrites dans cette méthode, doit être faite en accord avec la Norme internationale appelée "ISO/IEC 17025: 1999 Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais". |
|--|

Les milieux listés ci-bas (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 8.7 pour la composition de chaque milieu.

| |
|---|
| Note : Si l'analyste utilise des variantes des milieux indiqués ici (qu'il s'agisse d'un produit disponible dans le commerce ou fabriqué à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au superviseur du laboratoire d'en assurer l'équivalence. |
|---|

- 1) Eau peptonée (0,1%)
- 2) Bouillon tryptosé au lauryl-sulfate (LST)
- 3) Bouillon lactosé au vert brillant et aux sels biliaires à 2 % (BGLB)
- 4) Bouillon d'*Escherichia coli* (EC) ou Bouillon d'EC avec MUG (4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide).

- 5) Gélose à l'éosine et au bleu de méthylène de Levine (L-EMB) ou gélose Endo
- 6) Gélose MacConkey
- 7) Gélose nutritive (NA) ou autres géloses non sélectives
- 8) Bains-marie recouverts dotés d'un système de circulation afin de maintenir la température à 45°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 à 35 ± 1,0 °C. De même, des températures plus basses à 30 °C ou à 25 °C peuvent être à ± 1,0 °C près. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 °C ou 44,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs à ± 0,5 °C près, et celle des bains-marie, à ± 0,2 °C près. Des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

- 11) Cultures témoins (utiliser des cultures ATCC ou l'équivalent) :

témoin(s) positif(s) : *E. coli* qui peut produire du gaz à 45 °C et peut fermenter le lactose et produire des réactions caractéristiques sur gélose L-EMB; si l'on utilise du bouillon EC-MUG, une souche qui peut produire de la β-glucuronidase

témoin négatif pour EMB/IMViC : *Enterobacter aerogenes* ou un bâtonnet Gram négatif équivalent qui ne donne pas de réactions « positives » sur gélose EMB et ne produit pas d'indole, donne une réaction négative à l'épreuve au rouge de méthyle, une réaction positive à l'épreuve de Voges-Proskauer et une réaction positive à l'épreuve ou citrate.

témoin négatif pour bouillons NPP : *Salmonella berta* ou un bâtonnet Gram négatif équivalent qui est négatif pour la production de gaz dans les bouillons NPP et dans le deuxième bouillon EC.

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

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

On peut avoir besoin des produits suivants pour la confirmation : utiliser A ou B (voir 7.7). Le choix d'autres méthodes d'identification (7.7.5) peut demander d'autres milieux.

- A. Milieux IMViC et réactifs :
- a. Bouillon de tryptone (ou de tryptophane)
 - Réactifs pour l'épreuve de l'indole (disponibles dans le commerce)

- b. Bouillon de glucose tamponné
Réactifs pour l'épreuve de Voges-Proskauer (disponibles dans le commerce)
Solution de rouge de méthyle
 - c. Gélose au citrate de Simmon (SC)
- B. Trousses ou systèmes d'identification rapide (tels que API, Vitek ou l'équivalent)

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 Eau en contenants scellés

- (a) Ne pas entreposer les unités d'échantillonnage pendant plus de 24 h avant de procéder à l'analyse. Conserver sous réfrigération (0°C à 5°C).

7.1.2 Glace préemballée

- (a) Si les unités d'échantillonnage sont préemballées dans des contenants étanches, les décongeler dans les contenants d'origine dans un réfrigérateur (0°C-5°C) avant l'analyse.
- (b) Si les unités d'échantillonnage ne sont pas dans des contenants étanches, transférer la glace aseptiquement dans des sacs de plastique stériles ou autres contenants stériles appropriés. Sceller les contenants pour prévenir la contamination et décongeler les unités d'échantillonnage dans un réfrigérateur (0°C-5°C). Ne pas entreposer les unités d'échantillonnage pendant plus de 6 h avant l'analyse.

7.2 Préparation pour l'analyse

7.2.1 Avoir à sa disposition de l'eau peptonée stérile.

7.2.2 Nettoyer la surface de travail au moyen d'un désinfectant approprié.

7.2.3 Placer les éprouvettes de bouillon LST en rangées de cinq et les marquer de façon à identifier l'échantillon et la dilution à ensemercer.

7.3 Préparation de l'échantillon et mise en place initiale

7.3.1 Ensemercer chacune des séries de cinq éprouvettes de bouillon LST avec chacune des dilutions à analyser selon le schéma suivant :

Ensemencer chacune des 5 éprouvettes de 10 ml de bouillon LST à concentration double (première rangée) avec 10 ml de l'échantillon d'eau non dilué. Ensemencer chacune des 5 éprouvettes de 10 ml de bouillon LST à concentration simple (deuxième rangée) avec 1 ml de l'échantillon d'eau non dilué. Ensemencer chacune des 5 éprouvettes de 10 ml de bouillon LST à concentration simple (troisième rangée) avec 0,1 ml de l'échantillon d'eau non dilué.

7.3.2 Suivre l'incubation du bouillon LST et les étapes de confirmation pour les coliformes, les coliforme fécaux et *E. coli*, selon les besoins, et consigner les résultats sous forme de NPP par 100 ml d'eau, en suivant les instructions de l'Annexe D.

7.4 Incubation du bouillon LST

- 7.4.1 Afin de vérifier les conditions de croissance dans les bains-marie à haute température, ensemercer le témoin positif des bouillons NPP dans une éprouvette de bouillon LST et le témoin négatif des bouillons NPP dans une éprouvette de bouillon LST 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 le témoin de milieu.
- 7.4.2 Mélanger doucement l'inoculum et le milieu par agitation ou par rotation, mais éviter d'emprisonner de l'air dans les ampoules de Durham.
- 7.4.3 Incuber les éprouvettes ensemençées de bouillon LST à 35 °C pendant 24 ± 2 h. Vérifier s'il y a eu production de gaz (la production de gaz peut être une bulle de gaz ou de l'effervescence), consigner les résultats et commencer les épreuves requises de confirmation de coliformes, de coliformes fécaux et d'*E. coli* pour les éprouvettes positives qui contiennent du gaz.
- 7.4.4 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 7.4.3 et soumettre les éprouvettes supplémentaires qui contiennent du gaz aux épreuves requises de confirmation de coliformes, de coliformes fécaux et d'*E. coli*.
- 7.4.5 S'il n'y a pas eu formation de gaz dans toutes les éprouvettes après 48 ± 4 h d'incubation, l'épreuve de présomption est négative.

7.5 Étapes de confirmation pour la détermination des coliformes

- 7.5.1 Utiliser du bouillon BGLB réparti en volumes de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules de Durham.
- 7.5.2 Mélanger le contenu des éprouvettes de bouillon LST positives, par agitation ou par rotation, et transférer une anse de chaque éprouvette dans une éprouvette de bouillon BGLB (éviter d'entraîner la pellicule). On peut utiliser des bâtonnets en bois stériles ou d'autres dispositifs appropriés pour effectuer les transferts.
- 7.5.3 Mélanger doucement l'inoculum et le milieu par agitation ou par rotation, mais éviter d'emprisonner de l'air dans les ampoules de Durham.
- 7.5.4 Incuber les éprouvettes de bouillon BGLB ensemençé 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.
- 7.5.5 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 7.5.4.
- 7.5.6 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.
- 7.5.7 Calculer le NPP de coliformes confirmés par 100 ml d'eau en suivant les instructions de l'Annexe D du volume 1 pour convertir en NPP le nombre d'éprouvettes positives. Consigner les résultats.

7.6 Étapes de confirmation pour la détermination des coliformes fécaux

- 7.6.1 Utiliser du bouillon EC (avec ou sans MUG) réparti en volumes de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules de Durham.

- 7.6.2 Mélanger le contenu des éprouvettes positives de bouillon LST (obtenues en 7.4) par agitation ou par rotation et transférer une anse du contenu de chaque éprouvette dans une éprouvette de bouillon EC (éviter d'entraîner la pellicule). On peut utiliser des bâtonnets en bois stériles ou d'autres dispositifs appropriés pour effectuer les transferts. Ce transfert doit se faire en même temps que l'étape 7.5 ci-dessus.
- 7.6.3 Mélanger doucement l'inoculum et le milieu par agitation ou par rotation, mais éviter d'emprisonner de l'air dans les ampoules de Durham.
- 7.6.4 Incuber les éprouvettes de bouillon ECensemencées 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.
- 7.6.5 Examiner pour déterminer s'il y a eu production de gaz (bulle de gaz ou effervescence), consigner les résultats et soumettre toutes les éprouvettes positives à l'épreuve d'identification d'*E. coli* le jour même (7.7).
- 7.6.6 Incuber les éprouvettes négatives pendant 24 ± 2 h de plus. Examiner, consigner le nombre d'éprouvettes positives supplémentaires, ajouter aux résultats obtenus à l'étape 7.6.5 et entreprendre l'épreuve d'identification d'*E. coli* pour les éprouvettes positives supplémentaires.
- 7.6.7 S'il n'y a pas eu formation de gaz dans toutes les éprouvettes après 48 ± 4 h d'incubation, l'épreuve de présomption est négative.
- 7.6.8 La production de gaz pendant les 48 ± 4 h d'incubation constitue un résultat positif à l'épreuve de détermination des coliformes fécaux.
- 7.6.9 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 une épreuve présomptive positive d'*E. coli*. Ces éprouvettes peuvent servir aux épreuves décrites en 7.7, qui visent à confirmer la présence d'*E. coli*.

Précautions : Suivre les mesures de sécurité décrites dans les instructions du fabricant pour utiliser la lumière UV. Il faut aussi examiner 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.

- 7.6.10 Calculer le NPP de coliformes fécaux par 100 ml d'eau en suivant les instructions de l'Annexe D pour convertir en NPP le nombre d'éprouvettes positives. Consigner les résultats.

7.7 Étapes de confirmation pour l'identification d'*E. coli*

- 7.7.1 Agiter doucement chacune des éprouvettes positives de bouillon EC contenant du gaz ou chacune des éprouvettes de bouillon EC-MUG fluorescent (7.6.5 et 7.6.6) et ensemer en stries une anse de la culture sur une boîte de gélose L-EMB ou Endo.
- 7.7.2 Incuber les boîtes de gélose à 35 °C pendant 18 à 24 h et les examiner afin de déceler la présence de colonies non mucoïdes, nucléées, dont le centre est sombre, avec ou sans reflets métalliques, lesquelles indiquent la présence d'*E. coli*.

Note : Il incombe au superviseur du laboratoire de déterminer les dilutions et les séries d'éprouvettes NPP présumées (éprouvettes positives pour production de gaz) qui doivent faire l'objet de la confirmation (et, subséquemment, le nombre de colonies prélevé par boîte) afin d'établir convenablement le NPP confirmé final.

- 7.7.3 Si les colonies sont bien isolées sur les géloses L-EMB ou Endo, prélever une colonie typique et l'ensemencer sur une gélose non sélective telle que la gélose NA (les géloses

EMB ou MacConkey peuvent aussi être utilisées). Avant d'entreposer les boîtes à 4 °C, encercler sur la gélose EMB une autre colonie typique à être placée sur milieu non sélectif si la première colonie n'est pas confirmée comme *E. coli*. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 h. Utiliser ces cultures pour procéder à l'épreuve de confirmation.

Si les colonies ne sont pas bien isolées sur les boîtes de gélose L-EMB ou Endo, prélever deux colonies typiques et réensemencer sur une gélose EMB afin d'obtenir des colonies isolées. Choisir une colonie typique bien isolée de l'une des géloses EMB et ensemencer sur une gélose non sélective telle que la gélose NA (les géloses EMB ou MacConkey peuvent aussi être utilisées). Réfrigérer la deuxième gélose EMB au cas où il faudrait l'utiliser ultérieurement. Incuber comme indiqué ci-dessus et utiliser ces cultures pour procéder à l'épreuve de confirmation.

Note : La confirmation peut être faite soit en effectuant les épreuves GIMViC (7.7.4) ou en utilisant une trousse d'identification rapide (7.7.5).

7.7.4 GIMViC

À partir des géloses ensemencées (NA, EMB ou MacConkey), inoculer une éprouvette de bouillon EC (milieu G) et 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, les milieux « M » et « V » qui sont du bouillon glucosé tamponné, et le milieu « C », qui est la gélose au citrate de Simmon. Si les épreuves GIMViC ne sont pas effectuées dans les 96 h suivant l'ensemencement des géloses non sélectives, préparer des pentes ou géloses fraîches avant d'ensemencer les milieux GIMViC.

Pour chacun des isolats à identifier, inoculer une éprouvette de chacun des milieux GIMViC. Ensemencer les témoins positif et négatif d'IMViC dans chacun des milieux IMViC et les témoins positif et négatif de NPP dans le deuxième bouillon EC. On peut aussi effectuer les épreuves GIMViC au moyen de systèmes d'analyse disponibles dans le commerce.

Production de gaz à 45 °C (G)

Incuber les éprouvettes ensemencées 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 de plus et examiner de nouveau. Consigner les résultats.

Indole (I)

Incuber les éprouvettes ensemencées de bouillon de tryptone ou de tryptophane à 35 °C pendant 24 ± 2 h. Ajouter à chaque éprouvette du réactif pour l'indole (disponible dans le commerce) en suivant 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 consignée comme ±. On considère que la couleur jaune indique une réaction négative.

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

Ensemencer deux éprouvettes de bouillon glucosé tamponné et incuber à 35 °C pendant 48 ± 2 h. Utiliser les réactifs RM et VP (disponibles dans le commerce) en suivant les instructions du fabricant. La réaction de VP est positive si une couleur rose éosine apparaît après 5 à 10 minutes. L'épreuve au RM est positive s'il y a formation d'une couleur rouge et négative si la couleur est jaune.

Épreuve au citrate de Simmon (C)

Pour ensemer les pentes de gélose SC, utiliser une aiguille droite et appliquer un 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 °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.

Interprétation

Le tableau I présente les réactions GIMViC caractéristique d'*E. coli*. On peut au besoin différencier les coliformes courants en utilisant les données du tableau II.

Si l'on obtient, dans les milieux GIMViC, des réactions caractéristiques d'*E. coli*, il n'est pas nécessaire d'analyser le deuxième isolat. Cependant, si le premier isolat présente des résultats non caractéristiques dans les milieux GIMViC, il faut soumettre le deuxième 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.

7.7.5 Trousses d'identification rapide

On peut également utiliser des trousse d'identification rapide pour identifier *E. coli*. Suivre les instructions du fabricant.

7.7.6 Calcul du NPP

Calculer le NPP d'*E. coli* par 100 ml d'eau en suivant les instructions de l'Annexe D du volume 1, en fonction du nombre d'éprouvettes contenant des isolats qui ont produit des réactions GIMViC caractéristiques d'*E. coli* indiquées ci-dessus ou confirmées comme *E. coli* au moyen de trousse d'identification rapide.

Tableau I
 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 II**
 Différenciation des coliformes communs

| | Formation de gaz dans bouillon EC à 45 °C | Test à 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 8.3

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 American Public Health Association. 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods; Fourth Edition*. Frances P. Downes and Keith Ito (eds.). American Public Health Association, Washington, D.C.
- 8.2 American Public Health Association. 1992. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products; 16th Edition*. R.T. Marshall (ed.). American Public Health Association Inc., Washington, D.C.
- 8.3 International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1978. *Microorganisms in Foods; Their Significance and Method of Enumeration; Second Edition*; University of Toronto Press.
- 8.4 McGuire, O.E. 1964. Wood Applicators for the Confirmatory Test in Bacteriological Analysis of Water. *Public Health Reports*. **79**: 812-814.
- 8.5 Powers, E.M. and T.G. Latt. 1977. Simplified 48-Hour IMViC Test: an Agar Plate Method. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 274-279.
- 8.6 American Public Health Association. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water; Twentieth Edition*. Lenore.S. Clesceri, A.E. Greenberg and A.D. Eaton, (eds.). American Public Health Association, Inc., Washington, D.C.
- 8.7 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.

9. INTERPRÉTATION

Les limites tolérées spécifiées ci-dessous, représentant le taux maximal probable de l'incidence de bactéries coliformes (Coliformes) et de *E. coli* dans l'eau en contenant scellés et dans la glace préemballée, doivent être appliquées afin de déterminer si le lot de produit examiné est conforme aux articles B.12.001, B.12.004 et B.12.005 du *règlement d'application de la Loi sur les aliments et drogues*.

Les bactéries coliformes (Coliformes) seront considérées comme absentes d'un lot lorsque au plus une unité sur les 5 unités d'échantillonnage prélevées dans un lot est positive à l'égard des coliformes et que le NPP pour cette même unité d'échantillonnage n'excède pas 10 coliformes par 100 ml d'eau en contenants scellés et de glace préemballée.

On considérera que *E. coli* est absent d'un lot lorsque aucune des 5 unités d'échantillonnage prélevées sur un lot n'est positive.

Les limites tolérées sont résumées dans le tableau qui suit:

TABLEAU III.

Tolérances et plan d'échantillonnage pour les coliformes et *E.coli*

| Détermination | Aliment | Articles de la Loi des Aliments et Drogues | Tolérances | | | |
|----------------|--|--|------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|---|
| | | | No. d'unités d'échantillonnage (n) | Nombre acceptable (c) | Concentration de microorganismes (m) | Concentration maximale de microorganismes (M) |
| Coliformes | Eau en contenants scellés et glace préemballée | B.12.001, B.12.004 et B.12.005 | 5 | 1 | 0* | 10 |
| <i>E. coli</i> | Eau en contenants scellés et glace préemballée | B. XXXX | 5 | 0 | 0* | - |

* signifie moins que la plus faible Limite de Détection de la méthode et, en réalité, signifie <1.8 pour les méthodes NPP et <1 pour les méthodes avec membranes filtrantes.

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, « 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.

La méthode décrite ci-dessus, comportant 12 pages et identifiée comme MFO-18, en date de juillet 2002, Révisé août 2003, est désignée, par la présente, "Méthode officielle" aux fins des articles B.12.001, B.12.004 et B.12.005 du Règlement d'application de la Loi des aliments et drogues pour l'examen microbiologique de l'eau en contenants scellés et de la glace préemballée.

Sous-ministre adjoint