

Techniques de contrôle microbiologiques

Chapitre 2 Prélèvement, transport et préparations des échantillons

Les résultats des essais et leur interprétation sont valables et significatifs si l'échantillon soumis est représentatif du lot et que l'intégrité du produit est assurée depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse. Deux objectifs principaux doivent être visés lors du prélèvement des échantillons :

- Obtenir un échantillon représentatif, c'est-à-dire qui est une image fidèle de l'ensemble d'un lot homogène ou hétérogène, afin de conclure sur ce lot ;

- Obtenir un échantillon intègre afin d'assurer le maintien de l'état du produit tel qu'il existe au moment de l'échantillonnage jusqu'à l'analyse. Toutes les mesures nécessaires doivent donc être prises pour prévenir toute contamination, prolifération ou destruction microbienne durant la manutention et l'entreposage des échantillons.

Comme pour tout échantillon soumis à des essais microbiologiques, lorsque des produits peuvent faire l'objet d'une action légale (saisie, poursuite, confiscation ou élimination), la chaîne de froid et la chaîne de possession doivent être respectées. Il doit être possible de démontrer que l'échantillon a été conservé chambré, réfrigéré ou congelé, selon le cas, et qu'il n'y a pas eu d'interruption de la possession à partir du prélèvement jusqu'à l'analyse.

1. Prélèvement des échantillons

La taille de l'échantillon d'un produit de même nature réparti en portions unitaires doit être au moins de 5 unités (lieu de fabrication ou de distribution), de 5 unités pour les conserves. Le laboratoire doit disposer d'environ 500 g de produits, soit 5 fois 100 g, ces 100 g pouvant être fournis par une ou plusieurs pièces. Si le prélèvement de 5 échantillons s'avère trop élevé par rapport à la production il est procédé à un étalement dans le temps des prélèvements. Ces prélèvements doivent avant tout respecter des règles d'**asepsie** et de **représentativité**. La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et de ses dilutions doit correspondre aux parties superficielles et profondes notamment pour les produits en tranche, hachés, divisés et les plats cuisinés par exemple. Pour les produits liquides elle est effectuée sur le produit «homogénéisé» ou sur les parties superficielles et profondes. Dans le cas d'examens microbiologiques faisant suite à une maladie de type toxi-infections alimentaires (TIA) il faut rechercher les germes dangereux (pathogènes, toxigènes) et leurs toxines aussi bien dans les prélèvements de surface que dans la masse.

1.1. Echantillonnage

Un échantillonnage représentatif est essentiel quand l'analyse a pour but de détecter la présence de germes pathogènes ou de toxines qui peuvent être distribués de façon hétérogène dans l'aliment ou quand la commercialisation d'un produit dépend de la qualité microbiologique en relation avec les normes imposées par la législation.

L'objectif de l'échantillonnage influencera le type de plan d'échantillonnage, la nature des paramètres demandés et l'interprétation du résultat des essais.

Il est nécessaire, en tout premier lieu, de tenir compte du contexte et d'établir le but poursuivi lors du prélèvement des échantillons :

- complément à une visite d'inspection ;
- programme de surveillance ou étude de profil ;
- contrôle de la qualité ;
- recherche de pathogènes dans l'environnement ;
- poursuites, saisies ;
- vérification de l'efficacité des procédés de nettoyage ;
- suivi d'un résultat non conforme.

- **Echantillon**, une quantité de produit prélevé d'un lot et soumis à des essais en laboratoire. Un échantillon peut consister en une ou plusieurs unités d'échantillonnage.

- **Unité d'échantillonnage**, portion ou contenant individuel de produit prélevé au hasard dans un lot. Une unité d'échantillonnage peut correspondre à un échantillon.

- **Cadre d'échantillonnage**, le regroupement de toutes les unités qui nous intéressent, dans un espace-temps bien défini. L'échantillon décrit la population dont il est issu pour une période de temps et un espace précis.

Exemples :

- La vérification de la qualité de la glace comparée à la vérification de la potabilité de l'eau utilisée pour produire la glace.

- La vérification de la qualité d'un sandwich au poulet comparée à la qualité du poulet cuit avant manipulations.

- Le cadre d'échantillonnage des fromages fabriqués à Sétif durant l'année en cours ne représente pas nécessairement la population de fromages fabriqués l'année précédente, de même qu'il ne représente pas la population des fromages fabriqués en Algérie. Dans ce cas, il faut préciser que le cadre d'échantillonnage est l'ensemble des fromages fabriqués pendant une année sur un territoire particulier, à Sétif.

○ **La Commission Internationale des Normes Microbiologiques relatives aux denrées alimentaires ou ICMSF** (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) a défini des méthodes d'échantillonnage pour l'analyse systématique des produits alimentaires. Le principe de base est : **un échantillon analysé donne des résultats non satisfaisants s'il renferme des microorganismes dangereux ou s'il contient des germes en nombre supérieur à une limite au-delà de laquelle il devient potentiellement dangereux.**

Les réglementations fixant des exigences obligent à prendre en considération une combinaison de critères. Le but est de se faire une meilleure idée de la répartition de la contamination, et en même temps d'intégrer une notion d'avertissement. Dans ce cas, les critères sont représentés par les lettres **n, M, m et c** :

n étant le nombre d'échantillons individuels devant être prélevés (généralement 5, parfois 10) ;

M une valeur maximum absolue qui ne peut être dépassée par aucun des **n** échantillons analysés ;

m une valeur maximum relative qui est toujours inférieure à **M**. Le symbole **m** représente la limite permettant de répartir les échantillons en 2 groupes : les acceptables (valeur $\leq m$) et les inacceptables (valeur $\geq m$). Pour certains microorganismes dangereux **m** peut être égal à 0.

c le nombre d'échantillons parmi ces **n** qui peuvent dépasser la valeur **m** (mais qui doivent évidemment toujours être inférieurs à **M**).

Exemple :

Il y a pour le nombre de staphylocoques dans le fromage au lait cru une exigence dont les valeurs sont **n** = 5, **M** = 10000/g, **m** = 1000/g et **c** = 2. Cela signifie que 5 échantillons doivent être prélevés, qu'aucun d'entre eux ne peut contenir plus de 10000 staphylocoques par gramme et que 2 échantillons au maximum peuvent avoir une valeur comprise entre 1000/g et 10000/g. Pour les pathogènes, souvent on ne mentionne que **n** et **c**=0, ce qui suppose implicitement que **M** = **m** = 0 (pathogène absent dans tous les **n** échantillons).

Quand un microorganisme donné est toléré dans un aliment 3 catégories d'échantillons sont définies :

- catégorie 1 (acceptables sans réserve)
- catégorie 2 (acceptables mais avec une limite)
- catégorie 3 (inacceptables).

m sépare la 1^{ère} et la 2^{ème} catégories et **M** la 2^{ème} et la 3^{ème} (figure 1).

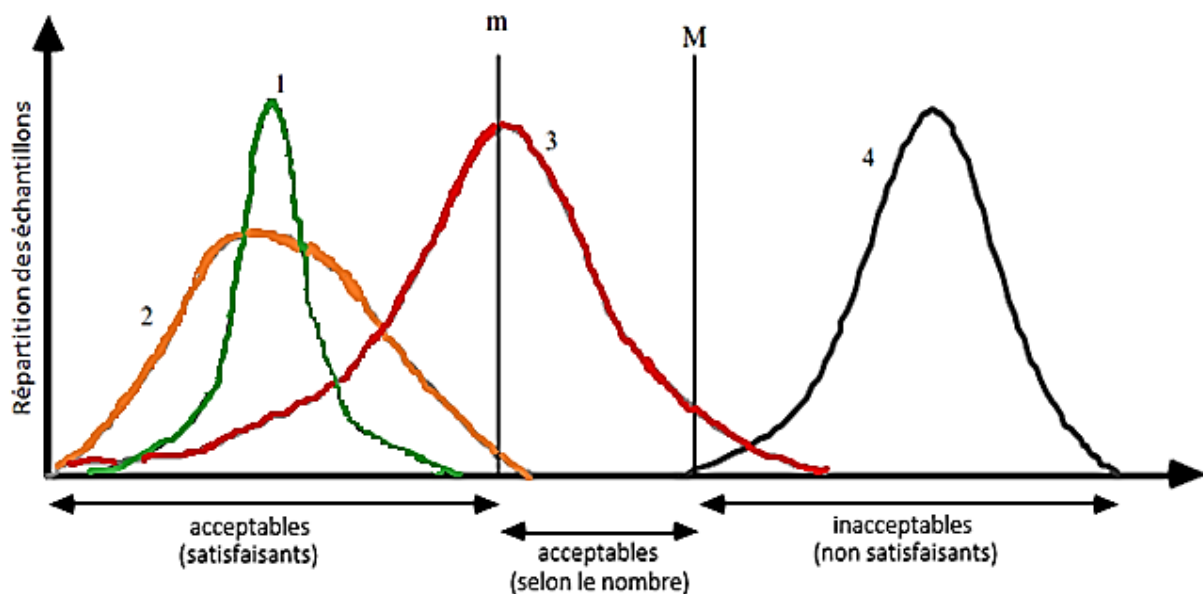


Figure 1. Distribution des échantillons d'après l'ICMSF

1.1.1. Plan d'échantillonnage

Le nombre d'échantillons à prélever est déterminé en fonction de la situation. Le plan d'échantillonnage est grandement influencé par le risque à la santé et l'hétérogénéité du lot. Il existe deux types de plan d'échantillonnage qui sont applicables à des systèmes «aliments-germes-consommateurs» bien identifiés.

- Plan d'échantillonnage à 2 classes

Ce plan donne des résultats permettant de déterminer 2 classes de contaminations. Ce type de plan n'accepte aucune tolérance et correspond le plus souvent aux conclusions : **absence dans** (le résultat est bon et le produit jugé satisfaisant) ou encore **présence dans** (le résultat est mauvais et le produit est déclaré impropre à la consommation). Avec un plan d'échantillonnage à 2 classes (catégories 1, 3), **n** représente le nombre d'échantillons examinés. Il existe deux possibilités pour ce type de plan :

- utiliser la notion de présence ou absence
- déterminer la tolérance ou non des numérations supérieures à la valeur critique **m**

Le symbole **c** représente le nombre d'échantillons tolérés au-delà de la valeur seuil, nombre qui permet de juger le lot comme satisfaisant.

Exemple : Pour les viandes de volailles contaminées en surface par *Salmonella* : $m = 0$ $n = 5$ $c = 1$

Pour la plupart des autres produits on a avec cette bactérie et d'autres microorganismes très dangereux (*Listeria*, *Brucella*, etc) : $m = 0$, $n = 5$ et $c = 0$.

Pour les viandes de boucherie conditionnées sous vide ou non, réfrigérées ou congelées on a pour la Flore Aérobie Mésophile $m = 5.10^4$, $n = 5$ et $c = 0$.

La rigueur du plan dépend des valeurs de **n** et de **c**. Plus grand est **n** pour une valeur donnée de **c**, meilleure sera la qualité des lots acceptés. A l'inverse, si pour une valeur donnée de **n**, **c** augmente, la rigueur du plan diminue.

- Plan d'échantillonnage à 3 classes

Ce plan est basé sur la reconnaissance de 3 catégories d'échantillons en fonction de leur niveau et nature de contamination : celle inférieure ou égale à **m**, celle comprise entre **m** et le seuil **M**, celle supérieure à **M**. La valeur **S** constitue le seuil de toxicité.

Avec un plan d'échantillonnage à 3 classes (catégories 1, 2, 3), il existe pour **c** un facteur de précision supplémentaire qui est le nombre d'échantillons tolérés dont les charges microbiennes sont comprises entre **m** et **M**. La présence d'échantillons entre **m** et **M** n'est pas souhaitable mais tolérée. Pour les valeurs supérieures à **M** les lots ne peuvent pas être acceptés pour la commercialisation. Ce plan à 3 classes permet de déterminer par des calculs appropriés la probabilité selon laquelle un lot sera accepté ou refusé en fonction du nombre d'échantillons défectueux qu'il contient. S'il n'y a pas d'échantillon avec une valeur supérieure à **M** on est ramené au plan à 2 classes.

Le plan est choisi en fonction de l'estimation du risque pour la santé et du mode d'utilisation de l'aliment. Les germes sont classés en fonction du risque qu'ils font courir au consommateur en :

- Germes entraînant un risque sévère (*Clostridium botulinum*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio comma*, *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* type C, virus de l'hépatite A).
- Germes entraînant un risque moyen avec possibilité de large diffusion (Staphylocoques entérotoxigènes, *Salmonella typhimurium* et les autres sérotypes, autres *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* entérotoxigènes, Streptocoques b hémolytiques).

- Germes entraînant un risque moyen sans grande diffusion (*Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella arizonae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, etc...).

Le plan à 3 classes est le plus souvent adopté ; la valeur de m est déterminée par les résultats de l'analyse de nombreux échantillons sur des lots jugés satisfaisants. La valeur de M est plus difficile à fixer et est fonction du produit, de la bactérie recherchée et de la méthode employée.

Les valeurs de n et c sont choisies en fonction du niveau souhaité d'acceptabilité ou de rejet des lots. Il est évident que plus n sera grand et plus c sera petit et meilleur sera le contrôle réalisé.

Valeurs numériques des critères d'un plan a trois classes

m : fixé par décret (surtout fonction du germe, du consommateur type et de l'aliment) tous les résultats égaux ou inférieurs à m sont considérés comme **satisfaisants**

M : seuil limite au-delà duquel les résultats sont considérés comme **non satisfaisants** sans que le produit soit dangereux. Les valeurs de M sont fixées à : M = 10 m quand les dénombrements sont réalisés en milieux solides et M = 30 m pour des numérations en milieu liquide

n : nombre d'unités composant l'échantillon

c : nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs entre m et M

Qualité du lot

Satisfaisante ou acceptable : aucun résultat ne dépasse M

Satisfaisante : les valeurs déterminées sont inférieures à : 3 m lors de numérations en milieu solide et 10 m en milieu liquide.

Acceptable : les valeurs déterminées sont comprises entre : 3 m et 10 m en milieu solide et 10 m et 30 m en milieu liquide avec le plan n = 5 et c = 2.

Non satisfaisant : des valeurs supérieures à M.

○ Cas particulier des conserves

Les conserves doivent satisfaire à des épreuves permettant de vérifier leur stabilité / stérilité. Ces épreuves consistent en deux étuvages de 5 échantillons à 37°C pendant 7 jours (ou à 30°C pendant 10 jours) et à 55°C pendant 7 jours. A l'issue de ces épreuves on observe l'éventuel bombage (il faut aussi que le pH entre les unités étuvées et les unités témoins ne dépasse pas 0,5).

Par microscopie (après étalement d'un volume donné voisin de 10 µl de produit puis fixation et coloration au bleu de méthylène par exemple) on compte sur 20 champs le nombre de germes respectivement observés à partir de la boîte incubée (n) et de la boîte témoin (n'). n / n' doit être inférieur à 100.

1.2. Fréquence des prélèvements

L'échantillonnage doit être réparti dans le temps en fonction du niveau de production et des risques de contamination.

1.3. Conditions du prélèvement

Les conditions essentielles à respecter pour le prélèvement sont d'abord le respect des règles d'asepsie (travail correct du microbiologiste) et la non modification des flores présentes dans le

produit. Dans la mesure du possible, les échantillons du produit à analyser doivent être amenés au laboratoire dans leur conditionnement d'origine, ce qui évite certaines contaminations.

Si le produit se présente sous forme de grands volumes (réservoirs à lait etc...) s'assurer de la bonne homogénéité de la répartition des micro-organismes ; une partie représentative du produit sera prélevée stérilement. Il est parfois nécessaire de réaliser des prélèvements à divers niveaux de l'aliment (surface, profondeur d'un aliment solide) ou après broyage et homogénéisation.

Les manipulations effectuées au cours du prélèvement ne doivent en aucun cas être à l'origine d'une contamination : nécessité d'utiliser des instruments stériles et de travailler stérilement.

Certains instruments doivent être stérilisés sur les lieux du prélèvement. Le trempage dans l'alcool et le flambage sont parfois insuffisants car la température atteinte n'est pas assez élevée. Il est nécessaire d'utiliser des flacons propres, secs, étanches, à col large stérilisés au four Pasteur (30 minutes à 1 heure à 170° - 180°C ou 2 heures à 160°C ce qui a pour but d'éviter le brunissement du coton) ou par autoclavage à 121°C pendant 30 min ou encore à usage unique et stériles ; leur taille doit être adaptée au volume de l'échantillon. Les récipients peuvent être en verre, en métal ou en matière plastique (polyéthylène, polycarbonate, polypropylène). Les récipients de prélèvement doivent posséder un système de fermeture hermétique. Le prélèvement d'un produit non emballé doit être réalisé dans la zone de stérilité d'un bec bunsen ou d'un système équivalent.

1.4. Prélèvement de produits liquides

La technique varie avec le produit, le volume et la forme du contenant. Il faut néanmoins toujours s'assurer de la parfaite homogénéisation du liquide (agitateurs) avant de prélever à la pipette (ou avec un flacon lesté stérile ou autre) le volume nécessaire à l'analyse.

1.5. Prélèvement de produits solides

Selon le produit, le prélèvement sera effectué au scalpel, à la sonde (fromages et produits mous) ou à la pipette harpon. La surface est souvent éliminée avant de procéder au prélèvement. Si le produit est hétérogène (plats cuisinés, conserves etc.) il faut s'assurer de la bonne représentativité du prélèvement.

2. Emballage et transport des échantillons

Quand le prélèvement aseptique a été réalisé, chaque échantillon doit être identifié ; toutes les informations doivent figurer sur l'étiquette de prélèvement et être inscrites à l'aide d'un crayon à encre indélébile. Identifier, si nécessaire, un code ou un numéro qui relie l'échantillon au lot d'origine.

Noter la température initiale, l'heure du prélèvement, la date et la température de transport.

Les échantillons doivent être **immédiatement** réfrigérés (dans une glacière propre) s'ils ne sont pas stables à température ambiante. Les échantillons dont la conservation est assurée à température ambiante, tels les boîtes de conserve et les produits secs, peuvent être expédiés sans réfrigération.

Les échantillons sont alors transportés le plus rapidement possible au laboratoire en maintenant les conditions initiales dans lesquelles se trouvait le produit. L'analyse devrait être réalisée dans l'heure qui suit le prélèvement.

Pour un **produit congelé** s'assurer qu'il n'y ait pas de décongélation pendant le transport (ce produit peut être gardé pendant 1 mois avant d'être analysé). La congélation d'un produit provoque une diminution plus ou moins importante du nombre de germes qu'il contient. Il faut veiller à ce que la température du produit prélevé soit au moins égale à -18°C , transporter le produit à cette température et décongeler à l'air ambiant à température voisine de 20°C pendant un temps inférieur à 3 heures, temps suffisant pour atteindre une texture qui permette le prélèvement.

3. Préparation de l'échantillon

Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une **suspension**. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera «homogénéisé» (liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile (solide) ce qui constitue en fait la première dilution.



Figure 2. Broyeurs pour échantillons solides

Pour les **produits liquides** (ou semi-liquides) une agitation manuelle vigoureuse en présence de billes de verre permet d'obtenir une homogénéité satisfaisante.

Pour les **produits solides** diverses techniques de «broyage» sont utilisables :

Broyage manuel au Potter ou en présence de sable stérile ou de billes de verre (mortier) ; ou broyage avec un broyeur électrique à couteaux (figure 3). Au cours du broyage les germes doivent être dispersés mais non détruits ; la température ne doit pas trop s'élever (le récipient peut être placé dans de la glace). Le broyage s'effectue en général avec 10 volumes (ou 9) de diluant pour 1 "volume" de produit (par exemple 10 g de produit et 100 ml (ou 90) de diluant stérile). Le diluant peut être de l'eau distillée, de l'eau physiologique, du Ringer au 1/4 ou une solution tryptone-sel, etc.

4. Techniques de dilutions

Au cours de la préparation des échantillons (et des dilutions) les microorganismes peuvent être inhibés ou même altérés par le changement du milieu lié à l'addition de diluant (changement de pH mais surtout de force ionique). L'effet bactéricide de certains diluants est connu : ainsi *Staphylococcus aureus* est «tué» en quelques heures dans de l'eau distillée de même que la plupart des entérobactéries (*E. coli*) ; il en est de même pour *Streptococcus pyogenes* dans du sérum physiologique ou dans du Ringer au 1/4 et pour *Escherichia coli* dans de l'eau salée à 8,5%. Actuellement il paraît souhaitable, sauf indication complémentaire à un type donné de produit à analyser, de réaliser les préparations et les dilutions des échantillons à analyser dans une solution de tryptone sel. Tous ces diluants (tableau 1) sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes.

Tableau 1. Composition de certains diluants

Tryptone sel	Ringer (solution mère)	Eau physiologique	Eau peptonée tamponnée
Tryptone (1g)	NaCl (9g)	NaCl (9g)	Bacto peptone (20g)
NaCl (8.5g)	KCl (0.42g)	Eau distillée (1000ml)	NaCl (5g)
Eau distillée (1000ml)	CaCl ₂ (0.48g)		Na ₂ HPO ₄ (9g)
pH = 7	NaHCO ₃ (0.2g)		KH ₂ PO ₄ (1.5g)
	Eau distillée (1000ml)		Eau distillée (1000ml)
			pH = 7.2

Les dilutions nécessitent la présence de nombreux tubes à essais contenant le plus souvent 9 ml de diluant stérile et de nombreuses pipettes stériles de 1 et 10 ml. Les pipettes peuvent être remplacées par des systèmes de pipetage automatique munis de cônes à usage unique (figure 4).

Toutes les manipulations sont à effectuer avec toutes les précautions d'asepsie exigées en microbiologie. L'introduction éventuelle d'un contaminant ou la contamination de l'opérateur ne doivent jamais se produire.

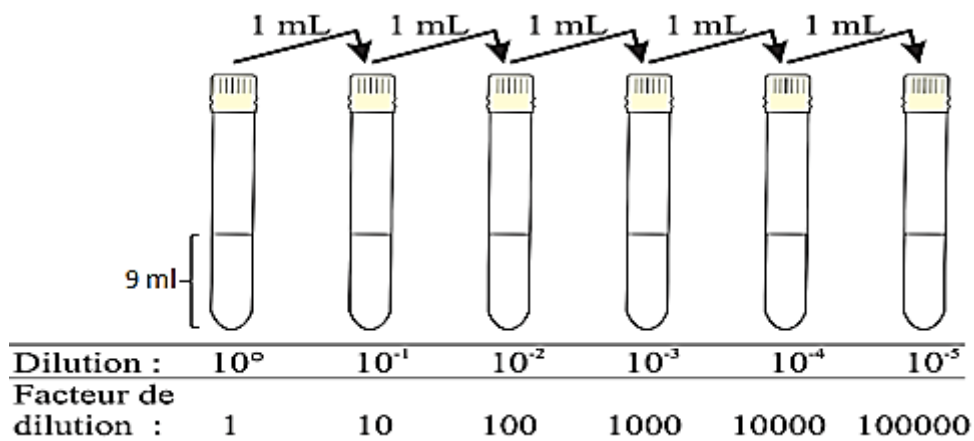


Figure 3. Préparation des dilutions

Le récipient contenant le liquide à diluer est agité manuellement avec précaution pour éviter les projections pendant une dizaine de secondes.

On prélève stérilement 1 ml de ce liquide (aspirer et refouler une fois avant le prélèvement) que l'on introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile.

Le tube est agité par des mouvements de rotation ou au moyen d'un Vortex. On obtient ainsi une dilution au 1/10.

Avec une nouvelle pipette de 1 ml on prélève 1 ml de cette dilution que l'on introduit dans un nouveau tube de diluant de 9 ml ; on obtient une dilution au 1/100 et ainsi de suite jusqu'au niveau de dilution recherché.

5. La revivification

Les micro-organismes sont souvent «endommagés» mais non tués au cours des traitements technologiques (déshydratation, chaleur, froid, etc.) appliqués aux produits alimentaires ou par suite de leur vieillissement. Ces altérations se reflètent dans certaines de leurs propriétés physiologiques en particulier au niveau de leur phase de latence qui est augmentée ou de leurs besoins nutritionnels ou encore quant à leur sensibilité aux conditions de milieu défavorables (pH, sels biliaires, colorants, sels, etc.). En général ces altérations sont réversibles et après leur disparition les bactéries récupèrent leurs propriétés initiales, en particulier au niveau de leur croissance ou de leur pouvoir pathogène.

La nécessité de faciliter le «rétablissement» des cellules ayant subi des altérations sublétales, c'est-à-dire leur «réanimation» ou encore leur revivification, s'impose avant de les soumettre à des milieux sélectifs souvent peu favorables à la croissance du fait de la présence d'inhibiteurs. En effet, la présence de cellules endommagées peut entraîner des variations dans les numérations ou porter à croire qu'il n'y a pas ou peu de germes et donc pas ou aucun risque pour le consommateur. Ceci est particulièrement important quand il s'agit de déterminer si des micro-organismes pathogènes ou indicateurs sont présents ou non.