



Guide pour le traitement approprié de la partie pré-analytique des analyses microbiologiques dans le domaine de la production de denrées alimentaires

Document N° 333.fw

Edition février 2013, rév. 01

Auteurs (par ordre alphabétique):

A. Baumgartner¹, T. Bischofsberger², M. Dalla Torre³, H. Emch⁴, J.-L. Gafner⁵, J. Hummerjohann⁵, R. Meyer⁶, Ch. Müller⁷, P. Scheffeldt⁴, U. Spahr¹, R. Stephan⁸, U. Wäspi⁹

¹Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern

²UFAG Laboratorien AG, 6310 Sursee

³Sälimrain 32, 4500 Solothurn

⁴SAS, 3003 Bern

⁵Agroscope Liebefeld-Posieux, 1725 Posieux

⁶NESTEC SA., 1350 Orbe

⁷Amt für Verbraucherschutz, 5000 Aarau

⁸Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, 8057 Zürich

⁹COOP Zentrallabor, 4133 Pratteln

TABLE DES MATIÈRES

1.	Introduction	4
2.	Prise d'échantillon	4
2.1.	Plans d'échantillonnage	4
2.2.	Appareils et accessoires	7
2.3.	Technique d'échantillonnage	7
3.	Transport, expédition, réception et entreposage des échantillons	9
3.1.	Aspects juridiques	9
3.2.	Lignes directrices techniques existantes	9
3.3.	Transport d'échantillons	10
3.4.	Expédition des échantillons	11
3.5.	Réception des échantillons et première évaluation	11
3.6.	Entreposage des échantillons	11
4.	Préparation pour l'analyse	12
4.1.	Fractionnement des échantillons	12
4.2.	Prélèvement de la prise d'essai	12
4.3.	Confection de la suspension de base	12
5.	Bibliographie	13
6.	Adaptations de la version actuelle	14

Préface

Le texte de cette directive a été rédigé par un groupe d'experts de la Confédération, des laboratoires cantonaux et du secteur privé qui a travaillé sous la direction du SAS et il est déjà publié dans le journal « Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène » (Mitt. Lebensm. Hyg. 97, 2006).

Le domaine d'application couvre la partie pré-analytique des échantillons suivants : denrées alimentaires, aliments pour animaux, échantillons de l'environnement dans le secteur de la production et de l'utilisation de denrées alimentaires, échantillons de l'environnement dans le secteur de la production primaire et des fèces d'animaux.

Le fait que les personnes engagées pour l'échantillonnage soient formées dans leur domaine, qu'elles connaissent les déroulements et les points critiques de leur activité, est une exigence préliminaire et ne fait pas partie de ce guide.

Certaines indications concernant les questions pré-analytiques sont fournies dans l'UE dans un «Guidance document» (1). Le présent guide donne toutefois un aperçu plus vaste à cette thématique et prend aussi en considération les caractéristiques nationales.

Le document s'adresse surtout à des auditeurs et experts principaux comme aide lors de la surveillance des laboratoires d'essai, ainsi qu'aux laboratoires concernés.

1. Introduction

Ces dernières années, des études intensives se sont consacrées à la validation et l'estimation de l'incertitude de mesure dans le domaine des méthodes d'analyses microbiologiques. Dans ce contexte, un guide correspondant à ces chapitres a été publié en 2005 pour le domaine de la microbiologie alimentaire et de l'environnement, sans toutefois considérer la partie pré-analytique. Avec une offre croissante de tests d'aptitude (études comparatives de laboratoires) et de matériaux de référence, la réalisation d'une analytique fiable et de bonne traçabilité devrait être réalisable.

Malgré cela, on trouve toujours et encore de grandes divergences entre les résultats de différents laboratoires ou des écarts significatifs par rapport aux valeurs cibles des matériaux de référence. La partie pré-analytique demeure un point faible à cet égard. La plus grande source d'erreur, qui est dans la plupart des cas sous-estimée, réside dans le processus d'échantillonnage. Les étapes parfois très complexes entre la prise de l'échantillon sur place et la pesée de la prise d'essai au laboratoire, ne sont pas communiquées suffisamment en détail au laboratoire. Les facteurs et leur influence sur l'échantillon et les paramètres à analyser ne sont pas assez connus. Une normalisation fait aussi largement défaut. Il est indispensable que les échantillons à analyser soient prélevés, transportés et préparés à l'analyse de telle manière qu'ils soient constamment représentatifs de l'ensemble du matériel à tester (lot de marchandise).

Le type d'échantillonnage, en particulier la quantité d'échantillon, est essentiellement déterminé par les objectifs de l'analyse. Des procédés différents peuvent s'imposer selon qu'il s'agit d'analyses officielles exécutées selon un plan d'échantillonnage élémentaire, d'exams épidémiologiques ou d'un monitoring.

La partie pré-analytique des analyses peut se diviser selon les 3 étapes suivantes :

- Prise d'échantillon
- Transport et entreposage
- Préparation pour l'analyse

2. Prise d'échantillon

En principe il faut procéder de manière à ce que l'échantillon conserve son statut micro-biologique autant que possible inchangé. Les échantillons destinés aux analyses micro-biologiques ne devraient être prélevés que par des personnes formées de manière appropriée.

2.1. Plans d'échantillonnage

2.1.1. Aspects légaux

Les exigences liées au prélèvement des échantillons par les autorités cantonales (Laboratoires cantonaux) du contrôle des denrées alimentaires sont réglées dans l'Ordonnance du DFI pour l'exécution de la Loi sur les denrées alimentaires (2). De nombreuses marches à suivre mentionnées dans cette ordonnance décrivent une "bonne pratique d'échantillonnage", indiquant des manières scientifiquement admissibles, valables également pour des institutions qui ne sont pas soumises à l'ordonnance. L'article 78 "Prélèvement des échantillons" mentionne qu'en règle générale, on prélève un échantillon élémentaire par marchandise. L'article 79 "Plans d'échantillonnage" mentionne que les organes de contrôle peuvent prélever plusieurs échantillons sur un lot de marchandises se-

lon un plan d'échantillonnage. Cette démarche peut être suivie en particulier s'il y a lieu de supposer que le produit n'est pas conforme, en tout ou en partie, à la législation sur les denrées alimentaires, ou si le but de l'analyse ne peut pas être atteint par des prélèvements isolés. Dans le contexte des plans d'échantillonnage, la notion très importante de "lot de marchandise" est définie dans l'Ordonnance du DFI sur l'étiquetage et la publicité des denrées alimentaires (OEDA) (3). Selon ce texte, par lot de marchandise on entend un ensemble d'unités de production ou de vente d'une denrée alimentaire produite, fabriquée ou conditionnée dans des circonstances pratiquement identiques. D'une bonne utilité pratique, la description de la notion "lot de marchandise" dans l'ordonnance sur le prélèvement d'échantillons de denrées alimentaires et d'objets usuels (OPE), entre-temps abrogée, est également mentionné dans le présent guide (4). Selon cette ordonnance passée, les lots de marchandise sont des ensembles déterminés et définissables de produits (p. ex. lots d'importation, charges de fabrication, stocks) qui vont ensemble sur la base de leur marquage (numéro de charge, date de fabrication etc.), de leur origine, de leurs matières premières ou du moment et de leur type de mise en circulation.

Par le passé, les laboratoires cantonaux ont effectué les analyses microbiologiques presque exclusivement dans des échantillons élémentaires uniques. Cette manière reposait sur la réflexion de pouvoir effectuer, avec les moyens disponibles, des analyses dans un maximum de lots de marchandises. C'était aussi logique, car les activités de contrôle s'effectuent en grande partie dans les domaines de la gastronomie et du commerce de détail. Si des plans d'échantillonnage étaient utilisés, les laboratoires cantonaux les avaient fixés sans l'aide des autorités fédérales. Dans les grandes entreprises alimentaires, en particulier celles qui sont actives dans le commerce international, on fait appel plus fréquemment aux plans d'échantillonnage dans le cadre de l'autocontrôle.

L'effort des autorités fédérales suisses vers une équivalence des lois, dans le commerce des denrées alimentaires d'origine animale avec l'Union européenne (UE), a entraîné que la législation nationale devait être adaptée. Parmi d'autres, les critères microbiologiques de l'UE ont été incorporés dans une plus large mesure dans l'ordonnance sur l'hygiène et ainsi nos propres valeurs de tolérance ou limite ont été éliminées, remplacées ou modifiées. Une partie de ces critères est maintenant couplée impérativement à des plans d'échantillonnage (5).

2.1.2. Aspects techniques

2.1.2.1. Généralités

Afin d'arriver à une qualité hygiénique suffisante des denrées alimentaires, il ne suffit pas de suivre les bonnes pratiques de fabrication (BPF), ni de mettre en oeuvre des analyses microbiologiques sporadiques. Il s'agit davantage d'identifier les dangers spécifiques aux produits, d'estimer les risques qui en découlent et de fixer les mesures pour les maîtriser. En règle générale, on se base sur un système appelé Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). L'analytique microbiologique occupe une place importante dans le contexte général de ce système de sécurité, que ce soit pour l'examen de la qualité des matières premières ou lors des contrôles de produits finis (vérifications). Pour une charge de marchandise, la valeur d'une analytique et des conclusions que l'on peut en tirer dépend clairement du nombre d'échantillons examinés. Plus il y a d'échantillons analysés par unité, plus la probabilité est grande de découvrir un possible micro-organisme indésirable. Le nombre d'échantillons devant être analysés dépend entre autres de la taille d'un lot de marchandise à tester, de son homogénéité et de la fréquence du paramètre à déterminer. Les schémas d'analyses proposés dans ce but sont appelés plans d'échantillonnage. Dans ce domaine, les travaux et recommandations de l' "International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)" donnent la direction à prendre (6).

2.1.2.2. Plans d'organisation par classes

2.1.2.2.1 Plan à 2 classes

Dans un plan à 2 classes, l'application concerne la plupart du temps les analyses de présence/absence. On les utilise dans la détection de pathogènes comme par exemple les salmonelles.

2.1.2.2.2 Plan à 3 classes

Dans les plans à 3 classes, on comprend aussi l'application de méthodes quantitatives, dans lesquelles on se base sur des nombres de micro-organismes acceptables ou un nombre limite exprimé par gramme ou par millilitre. Dans ces cas, seul un nombre donné d'échantillons peut atteindre la valeur limite sans la dépasser.

2.1.2.3. Paramètres des plans de classes (7)

- k: classe
n: nombre d'échantillons à prélever et à analyser par lot de marchandise [ou conformément à l'ordonnance sur l'hygiène du DFI (5)] nombre d'unités d'échantillons élémentaires de l'échantillon
m: Nombre de micro-organismes acceptables par gramme ou par millilitre
M: Nombre limite de micro-organismes permis par gramme ou par millilitre
c: (plan à 2 classes): nombre le plus élevé d'échantillons, dans lesquels le "m" peut être dépassé
(plan à 3 classes): nombre le plus élevé d'échantillons, dans lesquels "m" peut être dépassé, mais dans lesquels le "M" ne peut pas être dépassé.

Des plans d'échantillonnage peuvent aussi se baser sur d'autres quantités d'échantillon que 1 g ou 1 ml (p. ex. 25 g). En comparaison avec l'ordonnance sur l'hygiène légale (5) en Suisse, le "m" se rapporte à la valeur de tolérance et le "M" à la valeur limite. Les valeurs limite sont des critères de sécurité alimentaire, les valeurs de tolérance pouvant être des critères microbiologiques d'hygiène pour les produits finis prêts à la consommation ou pour des processus de fabrication.

2.1.2.4. Élaboration d'un plan d'échantillonnage

Des réflexions microbiologiques, épidémiologiques, médicales et statistiques précèdent l'élaboration d'un plan d'échantillonnage. De cette manière, on prend en considération quelle menace provient des produits alimentaires à contrôler et quelle est la composition du groupe cible des consommateurs. Un facteur à considérer est aussi le degré du danger que représente un micro-organisme à exclure. Selon le degré de risque, 5, 10, 15, 20, 30 ou 60 analyses en parallèle doivent être effectuées. De plus amples explications ne sont pas fournies dans ce document, mais on se réfère à la vaste littérature spécialisée, en particulier au travail de normalisation correspondant de l'ICMSF (6).

2.1.2.5. Exemples de plans d'échantillonnage

Les plans suivants ont été prescrits par l'UE et incorporés au droit suisse (4). Dans le cadre du contrôle officiel des denrées alimentaires, les 3 exemples suivants peuvent aussi être appliqués comme échantillonnage élémentaire unique. Toutefois, le résultat négatif d'une analyse particulière ne permet de tirer aucune conclusion sur le lot entier de marchandise. Dans l'exemple cité sous 2.1.2.5.3, on ne peut pas contester un dépassement de "m", mais le résultat donne néanmoins une indication que des problèmes pourraient exister.

2.1.2.5.1 Denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de *Listeria monocytogenes*

$k = 2 / n = 5 / c = 0 / m = M = 100 \text{ UFC/g}$

Pour les analyses correspondantes, 5 échantillons doivent être pris en considération par

lot de marchandise. Parce que seulement "m" a été déterminé et que "c" est zéro, aucun de ces échantillons ne doit contenir plus de 100 UFC/g de *L. monocytogenes*. Dans cet exemple, il s'agit d'un plan à 2 classes avec une méthode quantitative.

2.1.2.5.2 Enterobacter sakazakii dans des aliments pour nourrissons

$k = 2 / n = 30 / c = 0 / m = M =$ non détectable dans 10 grammes

Pour les analyses correspondantes, 30 échantillons doivent être examinés par lot de marchandise. Parce que seulement "M" a été déterminé et que "c" est zéro, *E. sakazakii* ne doit être détectable dans aucun des 30 échantillons. Dans ce cas, il s'agit d'un plan à 2 classes combiné avec un test d'absence ou de présence. Le nombre élevé d'échantillons de 30 ("c") est en rapport avec les personnes très sensibles (nourrissons) qui doivent être protégées.

2.1.2.5.3 Staphylocoques à coagulase positive dans des fromages au lait cru

$k = 3 / n = 5 / c = 2 / m = 10\ 000\ \text{UFC/g} / M = 100\ 000\ \text{UFC/g}$

Dans ces analyses, 5 échantillons sont à examiner par lot de marchandise. 2 d'entre eux peuvent dépasser 10 000 UFC/g ("m"), mais aucun ne doit dépasser 100 000 UFC/g ("M"). Il s'agit ici d'un plan à 3 classes avec une méthode quantitative.

2.1.2.6. Déviation de plans d'échantillonnage

Les analyses qui dépendent d'un plan d'échantillonnage peuvent s'avérer très laborieuses, en particulier si le nombre "n" d'échantillons à analyser est élevé. L'article 60 de l'ordonnance sur l'hygiène prévoit que dans des conditions données, il est permis de dévier des exigences légales (5). Ainsi le nombre d'analyses à effectuer peut être réduit, lorsque par une documentation établie, il est possible d'assurer la sécurité du produit au moyen du système HACCP. Des concepts analytiques alternatifs peuvent en outre être appliqués lorsqu'ils aboutissent à un effet démontrable comparable à ceux décrits dans les plans d'échantillonnage de l'ordonnance.

2.2. Appareils et accessoires

On utilise des appareils et des accessoires pour réaliser une prise d'échantillon correcte ou pour la faciliter. Les outils de prélèvement comme les cuillers, les louches, les sondes, les cylindres, les forets, les pipettes, les mesureurs, les cisailles, les brucelles, les grattoirs, les agitateurs, etc. doivent être propres, stériles et secs. Ils doivent être transportés dans des emballages stériles et étanches aux contaminations (8). Pour des examens quantitatifs, les écouvillons, les tiges de coton et analogues peuvent si nécessaire être humectés avec un volume restreint et défini de liquide stérile.

Les récipients d'échantillons en verre, en matière synthétique ou en métal doivent être stériles et libres de substances ayant un effet inhibiteur sur les analytes, ou pouvant provoquer une dilution indésirable. Ils doivent pouvoir se fermer de telle manière qu'aucune contamination ne puisse s'y produire et qu'aucune perte d'échantillon ne soit possible.

2.3. Technique d'échantillonnage

Le statut microbiologique d'un aliment change lors de la fabrication, de l'entreposage, de l'emballage, du transport et de la distribution au consommateur. Les échantillons doivent être prélevés et conservés de telle manière que l'état microbiologique ne puisse pas être faussé (9).

De ce principe important découlent les recommandations particulières de technique de prélèvement décrits dans ce chapitre.

2.3.1. Objectifs de la prise d'échantillons

Le choix du matériel même de l'échantillon et le moment de l'échantillonnage dépend donc fortement de l'objectif de l'analyse: s'agit-il du contrôle officiel des denrées alimentaires, de la surveillance d'exploitations privées dans le cadre d'un auto-contrôle, d'un monitoring ou d'une clarification lors de cas de maladie?

Selon les cas, des plans d'échantillonnage différents sont mis en œuvre (voir Chap. 2.1).

2.3.2. Techniques d'échantillonnage isolées

Dans la règle, il faut prévoir un échantillonnage aseptique, mais dans le cas de vente directe de certaines marchandises, il peut s'avérer nécessaire d'utiliser les ustensiles de l'exploitation (par exemple : louches à glaces), lorsque l'on veut savoir "comment le consommateur reçoit la denrée alimentaire".

Il n'est pas possible ici de mentionner toutes les techniques d'échantillonnage. Outre le paragraphe 4 du Chapitre 56 de l' "ancien" MSDA (8) et de la littérature spécialisée (p. ex. 10), la consultation des normes internationales est recommandée [p. ex. ISO 17604:2003 (11), ISO 18593:2004 (12) et ISO/DIS 707 I IDF 50 (13)]. Dans ces normes, on décrit exactement les instruments de prélèvement et leur application (p. ex. emporte-pièce pour fromages), les méthodes de prélèvements destructives et non-destructives, le choix de l'endroit de prélèvement (p. ex. sur carcasses à l'abattoir).

Les principes de base importants sont :

- la prise d'échantillon pour la microbiologie a lieu toujours avant celle destinée aux examens chimiques ou autres.
- prise d'échantillon aseptique : il faut éviter les contaminations de l'échantillon causées par un emballage défectueux, par une ouverture non-conforme et par des appareils de prélèvement et des récipients, ces derniers pouvant être souillés par les mains; de même, les contaminations aérogènes doivent être évitées.
- lors du prélèvement, le nombre de micro-organismes présents ne doit pas être diminué, p. ex. par l'évaporation incomplète d'éthanol, ou par la chaleur de l'outil de prélèvement insuffisamment refroidi après son passage à la flamme.
- lors de méthodes invasives, selon le problème posé, il peut s'avérer nécessaire d'écartier la couche superficielle aseptiquement avant le prélèvement effectif de l'échantillon.

2.3.3. Quantité de matériel à prélever

La quantité d'échantillon à prélever dépend du but de l'analyse, mais devrait être en règle générale au minimum de 100 g. La quantité d'échantillon de surface (p. ex. croûte de fromage) peut être inférieure à 100 g (13). Dans tous les cas, il faut considérer particulièrement l'homogénéité de l'échantillon et effectuer le prélèvement en conséquence. Des produits emballés devraient si possible être prélevés dans l'emballage original; à partir d'une marchandise en vrac, il faut réaliser un échantillon mélangé de plusieurs portions de 10-50 g.

Dans le cas d'échantillonnages non-destructifs, il faut couvrir une surface d'échantillon de 100 cm² au minimum.

Dans la mesure du possible, il faut prélever des échantillons inhomogènes en entier (p. ex. millefeuilles).

2.3.4. Stabilisation de l'échantillon

Les échantillons doivent être prélevés et conservés d'une telle manière que l'état micro-biologique ne puisse pas être faussé.

En règle générale, il n'est pas permis d'ajouter des agents conservateurs dans les échantillons destinés à l'analyse microbiologique. Si l'adjonction de ces substances est malgré tout exigée (p. ex. par le laboratoire), il faut alors s'assurer que leurs propriétés ne dé-

rangent pas l'analyse à laquelle l'échantillon est destiné. L'utilisation et la quantité de l'agent conservateur ajouté doivent figurer dans le rapport d'échantillonnage.

Dans le cas de l'eau potable, les excès de chlore possiblement inhibiteurs doivent être inactivés par l'adjonction de thiosulfate de sodium. Dans ce but, on ajoute avant la stérilisation 0.1 ml de solution de thiosulfate de sodium par 100 ml de volume d'échantillon dans les flacons d'échantillons (9).

La congélation de l'échantillon jusqu'au moment de l'analyse n'est permise que si des analyses ont montré au préalable et de manière représentative que le paramètre à déterminer n'était pas modifié de manière significative.

2.3.5. Désignation et rapport d'échantillonnage

Immédiatement après son prélèvement, chaque échantillon doit être identifié clairement et sans ambiguïté.

Le rapport d'échantillonnage doit comporter les points spécifiques suivants :

- lieu, date, et si nécessaire heure du prélèvement
- propriétaire
- motif de l'échantillonnage
- échantillonneur et éventuellement témoins présents
- description exacte de l'échantillon (p. ex. propriétés, emballage, code d'identification du lot de marchandise, producteur, date de fabrication, durée et conditions de conservation, température intérieure d'un produit comparable, quantité prélevée, nombre d'unités)
- quantité totale disponible
- tous les matériaux et ustensiles nécessaires à l'échantillonnage, tels les agents conservateurs, les tampons, les milieux de culture
- toute remarque importante concernant les conditions d'échantillonnage (température, humidité, état sensoriel de la marchandise à analyser, indications précises de la technique d'échantillonnage, problèmes survenus)
- adresse à laquelle les échantillons doivent être apportés ou envoyés

3. Transport, expédition, réception et entreposage des échantillons

L'objectif fixé est de transporter et d'entreposer les échantillons de telle manière que les résultats d'analyses ne soient si possible pas faussés. Ils doivent être analysés aussi rapidement que possible. Il y a une exception à ce principe lorsque les échantillons doivent être stockés dans des conditions définies durant une période fixe avant leur analyse.

3.1. Aspects juridiques

L'ordonnance du DFI sur l'exécution de la loi sur les denrées alimentaires mentionne dans son article 85 "Transport" que l'échantillon accompagné de son rapport d'échantillonnage doit être conservé et transporté de telle manière que le résultat d'analyse ne soit pas faussé (2).

3.2. Lignes directrices techniques existantes

L'ordonnance d'exécution fixe seulement les exigences de base concernant le transport des échantillons. Le chapitre 56 du MSDA dans sa version de 1985 va plus loin en donnant en plus les instructions suivantes (8):

"les denrées alimentaires facilement périssables et les produits réfrigérés ne doivent pas être transportés à plus de +5 °C, ils ne doivent pas être congelés".

Dans son édition de 2000, le chapitre 56 "Microbiologie" ne mentionne plus le transport

directement mais affirme seulement que :

"Les échantillons doivent être prélevés et conservés de telle manière que l'état microbiologique ne puisse pas être faussé" (9).

Dans la norme ISO 7218:1996 les exigences concernant le transport, la réception et l'entreposage des échantillons sont également prescrites (14).

3.3. Transport d'échantillons

3.3.1. Exigences générales

Certains laboratoires d'essai prélèvent des échantillons de manière autonome, ainsi par exemple les laboratoires d'entreprise. Certains laboratoires de service proposent également des contrats intégraux à leurs clients, incluant tous les travaux de l'échantillonnage aux analyses, et se terminant par l'interprétation des résultats.

Lors du transport des échantillons jusqu'au lieu de l'analyse, il faut faire attention à ce que le statut microbiologique ne soit pas faussé. Les altérations peuvent se produire par disparition ou surtout par multiplication de micro-organismes.

Le laboratoire d'essai qui reçoit l'échantillon a la responsabilité de juger si des mesures telles la réfrigération ou la congélation sont nécessaires pour le transport. Il faut prendre en considération le type d'échantillons à transporter (caractère périssable), la température ambiante ainsi que la durée du transport. Il faut aussi tenir compte des températures prescrites par l'ordonnance sur l'hygiène pour certaines catégories de denrées alimentaires. Ainsi la viande hachée doit, par exemple, être entreposée à 2 °C et le lait pasteurisé à 5 °C (5). Des écarts à ces directives légales ne sont autorisés que s'il est démontré, sur la base d'une évaluation des risques, qu'une altération du statut microbiologique peut être exclue.

3.3.2. Exigences concernant l'équipement des véhicules transportant les échantillons

Dans certaines circonstances, les échantillons doivent être prélevés dans une localité éloignée, de sorte que l'utilisation d'un véhicule est nécessaire. Ce dernier doit être équipé au besoin d'installations frigorifiques, de sorte que les exigences générales retenues sous 3.3.1 soient réalisées. Si un tel véhicule est équipé d'un réfrigérateur, le refroidissement devrait être aussi garanti lorsque le véhicule s'arrête. Avant que le premier échantillon ne soit transféré dans le réfrigérateur, il faut vérifier que la température de fonctionnement nécessaire (généralement ≤ 5 °C) soit atteinte. Si des échantillons sont prélevés en plusieurs endroits, la température des installations réfrigérées doit être mesurée à chaque fois et documentée. La mesure de la température doit être effectuée à l'aide d'un instrument approprié étalonné (p. ex. thermomètre à infra-rouge ou logger de température).

Dans le véhicule, les récipients et instruments stériles appropriés à l'échantillonnage doivent être disponibles de même que les ustensiles nécessaires au marquage clair des échantillons. Au cas où un réfrigérateur installé dans le véhicule tombe en panne ou ne fournit pas le refroidissement nécessaire, la procédure à suivre doit être obligatoirement réglée. Lorsqu'il n'est pas possible de juger avec certitude qu'une multiplication du nombre de micro-organismes aura lieu dans certains produits alimentaires non refroidis, par précaution tous les échantillons destinés aux analyses bactériologiques seront refroidis à ≤ 5 °C. Si l'échantillon de marchandise est congelé, il faut garantir que celui-ci reste congelé jusqu'à l'arrivée dans le laboratoire d'essai. Ceci peut être assuré par exemple par une installation de congélation dans le véhicule ou par des quantités suffisantes disponibles de neige carbonique.

3.4. Expédition des échantillons

Fréquemment, les laboratoires reçoivent des échantillons envoyés par des clients, que ce soit par service de courrier ou par poste. Si des lacunes sont constatées, il faudrait les communiquer aux clients. Les échantillons doivent être expédiés de telle manière que le statut microbiologique ne puisse pas être modifié. Concrètement, cela signifie que des contaminations de l'environnement doivent être exclues au moyen de récipients d'échantillons et de matériel d'emballage appropriés. Si nécessaire, des mesures comme une réfrigération peuvent empêcher qu'une croissance de germes se produise dans les échantillons pendant l'expédition.

3.5. Réception des échantillons et première évaluation

Si nécessaire, il faut mesurer et enregistrer la température dans les échantillons reçus par le laboratoire d'essai. Il faut en outre s'assurer que la quantité d'échantillon est suffisante, que les récipients d'échantillons sont intacts et que des contaminations par l'environnement peuvent être exclues. Si, pour ces points, des lacunes sont remarquées, il faut consulter le donneur d'ordre, renoncer à effectuer l'analyse et exiger un nouvel échantillon (15). Si ce n'est pas possible, et que malgré tout une analyse est effectuée, le rapport d'essai ne peut être délivré que sous réserve, avec la mention des manquements constatés à la réception de l'échantillon (15).

A leur réception, les échantillons sont marqués clairement avec l'identité propre au laboratoire. Le système utilisé doit être conçu de telle sorte qu'à tout moment la traçabilité soit garantie pour le donneur d'ordre ou le client sur l'appellation originale à l'échantillon. L'identification doit aussi garantir que toute erreur soit exclue dans les étapes d'analyses suivantes. La date de réception, de même que l'heure si c'est pertinent, doivent être enregistrées dans le procès-verbal.

3.6. Entreposage des échantillons

Dans les locaux où les échantillons reçus sont stockés et redistribués aux laboratoires, les places doivent être attribuées de telle sorte que la clarté nécessaire à l'exclusion des erreurs soit garantie. L'air à l'intérieur du local ne doit pas être entravé de manière à ce que des contaminations d'échantillons soient possibles ou qu'une autre influence puisse altérer le résultat d'analyse (p. ex. aération, ventilateurs, climatiseurs, autre matériel stocké). Cela vaut en particulier pour des échantillons du secteur de la production primaire. Si les circonstances s'y prêtent, une évaluation des risques incluant les dénombrements de micro-organismes dans l'air ambiant doit être entreprise.

Les échantillons doivent être stockés de façon satisfaisante jusqu'à l'analyse. Avec des marchandises facilement périssables, la chaîne frigorifique ne peut être interrompue que durant le temps nécessaire au laboratoire d'essai pour le contrôle à la réception et à l'enregistrement.

Si des échantillons sont fractionnés (par exemple pour des analyses microbiologiques et chimiques), il faut procéder de telle manière que le statut microbiologique ne soit pas modifié (voir 4.1).

Lorsqu'une augmentation des bactéries est attendue dans des échantillons, ils doivent être examinés si possible dans un délai de 24 heures après leur arrivée au laboratoire d'essai. Lors d'un stockage prolongé sous réfrigération, le danger existe que des micro-organismes psychrotrophes se multiplient et que certains types de micro-organismes meurent.

Dans l'éventualité d'une répétition d'analyse, les échantillons doivent être stockés de telle sorte qu'ils ne puissent ni être contaminés par d'autres échantillons, ni que leur statut microbien soit modifié. Il faut considérer que quelques micro-organismes, comme p. ex. des *Listeria*, peuvent aussi se multiplier aux températures du réfrigérateur.

4. Préparation pour l'analyse

Bien souvent, c'est ici que débute le travail effectif du laboratoire. Il existe de nombreux exemples dans la littérature concernant la description des étapes individuelles (fractionnement des échantillons, prélèvement de prise d'essai, confection de la suspension de base). Les normes internationales suivantes servent de références à ce sujet: ISO/DIS 7218 (15), ISO 6887-1,-2,-3 & -4 (16), ISO/DIS 8261 (17).

4.1. Fractionnement des échantillons

Si des analyses microbiologiques et chimiques sont demandés pour un même échantillon, il faut que le fractionnement nécessaire ait lieu impérativement dans des conditions aseptiques. Cela signifie que le prélèvement pour l'analyse microbiologique doit se faire en premier. Jusqu'au moment du fractionnement, l'échantillon doit être stocké de telle sorte que le statut microbien ne soit pas altéré. Ceci est aussi valable pour les échantillons de réserve.

Il faut aussi veiller à ce que les analytes chimiques ne soient pas modifiés (p. ex. analyse de composés volatiles ou de vert malachite).

4.2. Prélèvement de la prise d'essai

Seule une partie de l'échantillon [«laboratory sample», échantillon pour laboratoire, ISO 7002 (18)], envoyé au laboratoire est en règle générale utilisée dans l'analyse. Dans ce qui suit, cette fraction est appelée prise d'essai [«test portion», ISO 7002 (18)].

En principe, on applique des techniques aseptiques.

Pour autant qu'aucune autre spécification ne soit prescrite, les échantillons congelés sont dégelés à maximum 37 °C et analysés aussi rapidement que possible (9).

Avec des échantillons hétérogènes, la prise d'essai devrait être prélevée de telle manière que les différentes composantes soient présentes si possible conformément à leurs portions respectives (p. ex. fromages à pâte molle avec croûte consommable: 10% de croûte et 90% de pâte). D'autres compositions de parts sont aussi possibles, selon l'objectif de l'analyse. Pour cette raison, il faudrait définir, par convention entre le client et le laboratoire, quelles parts de l'échantillon doivent être examinées.

Il est parfois d'usage que des échantillons soient mis en commun ou « poolés ». Ainsi p. ex. les examens bactériologiques de carcasses d'animaux se déroulent sur des prélèvements effectués sur différentes parties de la carcasse, qui sont ensuite rassemblées en un seul échantillon poolé, dans lequel l'analyse est effectuée (11).

L'analyse de tels échantillons poolés peut poser problème lorsque la démarche n'est pas précisée ou qu'il n'y a pas eu d'accord avec le client. Pour l'interprétation du résultat, il est important qu'une description de la composition de l'échantillon soit disponible.

Pour des échantillons hétérogènes, il faudrait si possible prélever au moins 40 g, pour les échantillons homogènes au moins 10 g ou 10 ml (selon les indications de la norme de préparation d'échantillon spécifique).

Pour des méthodes qualitatives, on devrait généralement prélever au moins 25 g (5, 19).

4.3. Confection de la suspension de base

En règle générale, pour réaliser une suspension de base, une étape de dilution et d'homogénéisation entre la prise d'essai et une solution est nécessaire (exception : liquides homogènes). La suspension de base initiale résultant de cette étape est la plupart du temps une dilution de 1:10 (généralement 10 g ou ml de prise d'essai homogène + 90 g ou ml de solution de dilution).

La suspension de base est utilisée soit en tant que milieu de pré-enrichissement (analyses qualitatives), soit comme point de départ des dilutions décimales suivantes (ana-

lyses quantitatives).

En ce qui concerne l'homogénéisation et la dilution, les normes correspondantes doivent également être consultées (15, 16, 17). Il faut considérer particulièrement que selon la matrice et le micro-organisme recherché, le processus peut ou doit même être différent. Les exemples sont la fonte du beurre (17), l'utilisation de citrate de sodium lors de la dilution des fromages (17) ou l'utilisation de milieux de pré-enrichissement spéciaux pour la détection de Salmonelles dans le cacao et des produits contenant du cacao, ou dans des produits acides ou acidifiants (20). Dans l'analyse des additifs de denrées alimentaires contenant des substances inhibitrices (p. ex. poudres d'oignon, d'ail, d'origan, de poivre et certaines variétés de thé ou de café), il faut réaliser des dilutions plus élevées (p. ex. 1/100 pour la cannelle et l'origan, 1/100 pour les clous de girofle), alternativement une adjonction de K_2SO_4 à l'eau peptonée tamponnée à une concentration finale de 0.5% est admise (16, part 4).

Key words

Microbiology; pre-analytic; sampling; food-control; guideline

5. Bibliographie

- 1: Union Européenne: Guidance Document on official controls, under Regulation (EC) No 882/2004, concerning microbiological sampling and testing of foodstuffs, 2006.
- 2: Département fédéral de l'intérieur: Ordonnance du DFI du 23 novembre 2005 sur l'exécution de la législation sur les denrées alimentaires, état au 27 décembre 2005, (SR 817.025.21) Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne.
- 3: Département fédéral de l'intérieur: Ordonnance du DFI du 23 novembre 2005 sur l'étiquetage et la publicité des denrées alimentaires (OEDAI), état au 27 décembre 2005, (SR 817.022.21). Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne.
- 4: Conseil fédéral suisse : Ordonnance sur le prélèvement d'échantillons de denrées alimentaires et d'objets usuels (OPE), du 4 juin 1984, état au 1^{er} juillet 1995 (Ordonnance sur l'échantillonnage; SR 817.94; abrogé). Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne.
- 5: Département fédéral de l'intérieur: Ordonnance du DFI sur l'hygiène du 23 novembre 2005 (OHyg), état au 15 novembre 2006, (SR 817.024.1). Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne.
- 6: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): Microorganisms in Foods 2 - Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. Second edition, 1986. University of Toronto Press, Toronto, Canada (<http://www.foodscience.afisc.csiro.au/icmsf/icmsf2.pdf>).
- 7: Pichhardt, K: Lebensmittelmikrobiologische Grundlagen für die Praxis. Kapitel 4, Stichprobenpläne - Produktklassifizierung, Seiten 235 bis 256. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998 (ISBN: 3-540-63380-4).
- 8: Office fédéral de la santé publique: Manuel suisse des denrées alimentaires, chapitre 56 "Microbiologie", Edition 1985. Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne.

- 9: Office fédéral de la santé publique: Chapitre 56 "Microbiologie" Nouvelle édition 2000, révisée en 2004 dans Manuel suisse des denrées alimentaires 2005. Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne.
(http://www.bag-anw.admin.ch/SLMB_Online_PDF/Start.pdf).
- 10: Baumgart, J. & B. Becker: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland, Loseblatt-Ausgabe (1994, laufende Aktualisierungen).
- 11: ISO 17604:2003: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Carcass sampling for microbiological analysis.
- 12: ISO 18593:2004: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
- 13: ISO 707 | IDF 50:2008: Milk and milk products - Guidance on sampling.
- 14: ISO 7218:1996: Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations.
- 15: ISO 7218:2007: Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.
- 16: ISO 6887-1,-2,-3 -4 : Microbiology of food and animal feeding stuffs: Preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.
Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution (1999).
Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products (2003).
Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products (2003).
Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products (2003).
- 17: ISO 8261:2001: Milk and milk products: General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.
- 18: ISO 7002:1986: Agricultural food products - layout for a standard method of sampling from a lot.
- 19: Union Européenne: Règlement (CE) Nr. 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.
- 20: ISO 6579:2002: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

6. Adaptations de la version actuelle

La désignation du département DFE a été remplacée par DEFR.