

7. Techniques de prélèvement

Il est important que le laboratoire d'analyse microbiologique reçoive un échantillon réellement représentatif du lot de produit, non endommagé ou modifié lors du transport et du stockage.

Les modalités des prélèvements ont fait l'objet d'un arrêté publié au J.O. du 19 janvier 1980. Très schématiquement, la taille de l'échantillon d'un produit de même nature réparti en portions unitaires doit être au moins de 5 unités, de 5 unités pour les conserves.

Le laboratoire doit disposer d'environ 500g de produits, soit 5 fois 100g, ces 100g 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'**aseptie** 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 TIA il faut rechercher les germes dangereux et leurs toxines aussi bien dans les prélèvements de surface que dans la masse.

Le prélèvement peut être effectué soit sur des éléments indivisibles (boites de conserves, bouteilles, produits de petite taille...), ou bien sur des produits en vrac ou bien par prise d'une partie aliquote d'un élément en grande taille.

Le premier cas est le plus simple, surtout lorsque les produits sont emballés et prélevés en fin de chaîne : on les recueille en l'état sans d'autres précautions que de bien les identifier.

Dans le deuxième cas et parfois dans le premier lorsque l'aliment n'est pas protégé des contaminations microbiennes, des précautions s'imposent.

7.1. Conditions générales de prélèvement

Les conditions essentielles à respecter pour le prélèvement sont d'abord le respect des règles d'**asepsie** 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 (180°C - 10min) ou par autoclavage à 121°C pendant 30min 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) ; dans ce dernier cas il s'agit de récipients à usage unique dont la stérilisation est obtenue à froid (radiations α ou β). Dans tous les cas 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 bocal ou d'un système équivalent.

7.1.1. Quantité

Dépend de la nature de l'analyse et de plan de l'échantillonnage, en particulier la valeur **n** qui est généralement égale à 5.

- on préleva 5 échantillons qui pourront être 5 unités ou 5 fois 25 à 100g pour des produits **en vrac**.
- dans le cas de pièce unitaire de petite taille, un échantillon peut être issu de plusieurs pièces.
- dans le cas de production de faible quantité le prélèvement des 5 échantillons peut être étalé dans le temps.

7.1.2. Homogénéité

La répartition des micro-organismes dans le produit à analyser peut ne pas être homogène et ceci est d'autant plus vrai que l'élément à analyser est volumineux (grande cuve de produit liquide) ou de structure hétérogène.

Il pourra être dans certains cas d'effectuer plusieurs prélèvements en différents endroits de l'aliment ou de la matière alimentaire. Ceci peut être intéressant du point de vue industriel pour bien connaître la position et l'action de différentes flores, mais aussi du point de vue analyse de qualité pour mettre en évidence des zones à fort risque de contamination.

Dans d'autres cas, et généralement pour définir la qualité microbiologique d'un aliment, il sera nécessaire d'homogénéiser les produits en vrac et avant de prélever ou d'effectuer un prélèvement composite. Un brassage du produit sera réalisé si cela est possible avant le prélèvement.

7.1.3. Précautions d'asepsie (stérilisation)

Il est indispensable qu'aucune contamination extérieure ne vienne fausser la composition de la flore microbiologique à étudier.

Tous les récipients destinés à recevoir l'échantillon, ainsi que les instruments de prélèvement doivent être stérilisés à l'avance (ou four pasteur, autoclave) et protégés dans un emballage stérile, soit stérilisés sur place. Les récipients en matière plastique se stérilisent à froid avec les radiations.

La stérilisation ex tempore des instruments peut s'effectuer par la flamme du bocal Bunsen, par immersion dans l'alcool éthylique à 60-70° avec éventuellement un flambage ou par immersion dans de l'eau javellisée.

Le prélèvement doit s'effectuer dans des conditions de travail aseptique en utilisant une lampe à gaz (lampe à souder portative) ou à défaut à alcool. Il faut éviter les courants d'air, les déplacements et discussions inutiles.

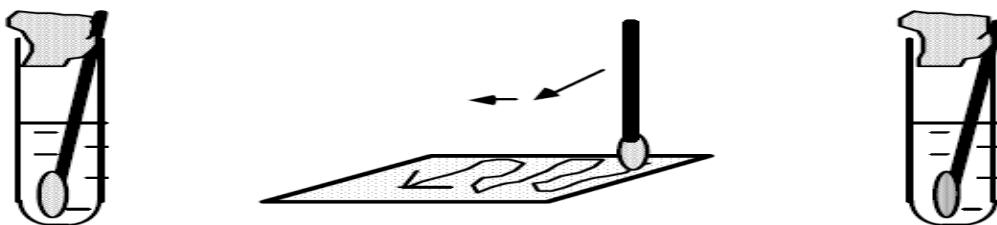
7.2. Méthodes générale

Les techniques utilisées sont très variées **selon le produit à analyser** : elles dérivent des techniques générales de la microbiologie. Des méthodes particulières sont parfois employées.

7.2.1. Prélèvements pour le contrôle microbiologique des surfaces : ils permettent l'étude de la flore présente sur la surface d'un aliment, le matériel de fabrication ou de stockage, les récipients et emballages, les plans de travail, les murs et sols des locaux et éventuellement les mains du personnel.

Il existe plusieurs techniques qui doivent être bien standardisées si on désire les répéter de façon reproductive.

7.2.1.1. Écouvillonnage



Cette méthode à l'avantage de permettre des prélèvements dans des endroits peu accessibles aussi bien que sur les surfaces planes.

Un écouvillon de coton hydrophile est placé dans un tube à essai et stérilisé.

Au moment du prélèvement l'extrémité de l'écouillon est immergée dans une solution stérile de Ringer au 1/4 ou dans un bouillon tryptone-sel additionnée de 0,05% Tween 80. Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface du produit ; l'écouillon est alors immergé dans 10ml de Ringer au 1/4, 10ml de bouillon tryptone-sel ou d'eau physiologique à 1% d'hexamétaphosphate de sodium (Calgon). Toutes ces opérations doivent s'effectuer dans les conditions d'aseptie les meilleures. L'analyse est réalisée à partir de la suspension ainsi obtenue.

7.2.1.2. Rinçage : Cette méthode est applicable aux récipients ou de tuyauteries. Le rinçage s'effectue à l'aide d'un volume connu d'eau physiologique stérile additionnée de 0.05% de Tween. Plusieurs rinçages sont effectués selon l'importance de la contamination, avec agitation lorsque cela est possible. Les liquides de rinçage sont ensuite recueillis aseptiquement. Lorsque les récipients et tuyauteries sont traités à l'eau chlorée il est nécessaire de neutraliser les résidus éventuels d'antiseptiques en rajoutant quelques cristaux de thiosulfate de sodium au diluant.

7.2.1.3. Impression sur gélose (Méthode des empreintes)

Le prélèvement peut être réalisé par impression directe sur milieu gélosé ou par impression indirecte à l'aide de ruban adhésif ;

✓ **Impression directe sur milieu gélosé :** Cette méthode nécessite l'emploi de boites de Pétri dont le couvercle est plus haut que la partie destinée à contenir la gélose. Cette partie est collée sur un disque ou un anneau de matière plastique d'un diamètre supérieur à celui de la boite de façon à ce que le couvercle repose sur lui.

Les boites sont stérilisées puis garnies à ras bord de gélose nutritive ordinaire de façon à présenter une surface convexe débordant légèrement de la boite.

Au moment de l'emploi la boite est ouverte et appliquées avec précaution sur la surface à étudier.

✓ **Emploi de ruban adhésif :** Un ruban adhésif est stérilisé par rayonnement UV (en générale 10mn d'exposition à 20cm d'une lampe UV germicide sont suffisantes) dans une boite de Pétrie ouverte.

Au moment du prélèvement le ruban est extrait stérilement au moyen d'une pince flambée et appliqué avec soin sur la surface à étudier de façon à assurer une adhérence parfaite. Il est ensuite retiré et appliqué à la surface d'un milieu gélosé.

Cette méthode est pratique pour les surfaces planes ou rugueuses ainsi que pour les contrôles de contamination des mains.

7.2.1.4. Coulage de milieu gélosé : Cette méthode permet l'examen de bouteilles vides. Du milieu gélosé en surfusion (45°C) est introduit dans le récipient et réparti uniformément par rotation de ce dernier selon un axe horizontal sous un courant d'eau froide. Après solidification, le flacon est mis à incuber. Cette méthode est intéressante du point de vue quantitatif.

7.2.1.5. Méthode du cylindre : un cylindre creux de section connue est appliqué sur la surface à analyser ; on y introduit alors quelques ml de diluant stérile et après quelques secondes de contact, le diluant est retiré et analysé (Figure 01).

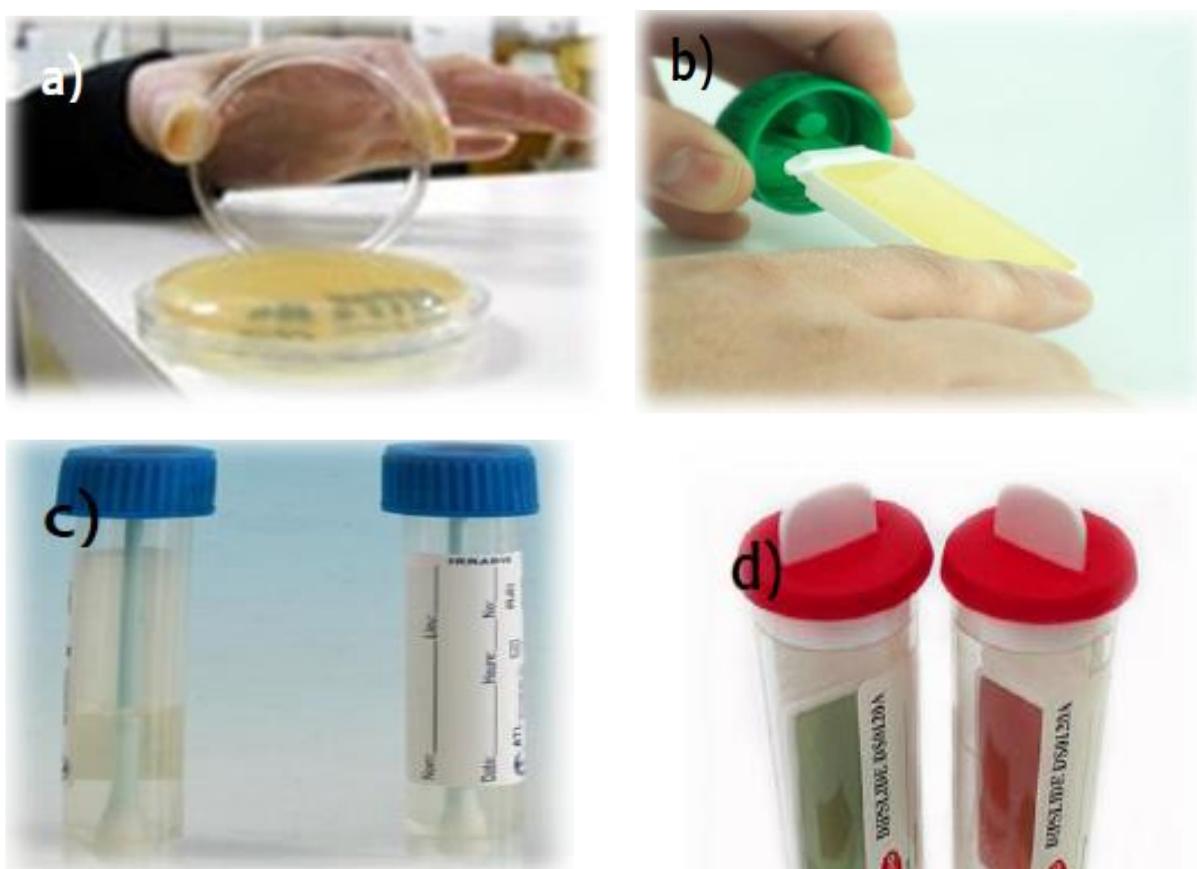


Figure 01. (a) boites de contact, (b) et (d) lames d'immersion (c) écouvillons.

7.2.2. Prélèvement pour le contrôle de l'air

Ces prélèvements qui peuvent avoir un grand intérêt en milieu industriel s'effectuent de plusieurs façons :

- par exposition dans les salles de boites de Pétri contenant du milieu gélosé et que l'on ouvre, en particulier aux endroits permettant l'entrée de l'air ou à ceux exposés aux courants d'air.
- par utilisation d'une fiole à vide contenant un milieu de culture liquide et fermée par un bouchon portant un tube de communication avec l'extérieur, tube qui plonge dans le milieu.
Un certain volume d'air est aspiré au moyen d'une trompe à vide et barbotte dans le milieu.
- par filtration sur membrane que l'on dépose ensuite sur un milieu gélosé en boite de Pétri.

7.2.3. Prélèvement des produits liquides

La technique est variable selon la nature du produit mais aussi selon le volume à prélevé et la forme du récipient.

Les précautions et méthodes générales sont les suivantes :

L'homogénéisation du liquide est réalisée, soit manuellement à l'aide d'une tige de verre ou d'un agitateur métallique stérile, soit mécaniquement dans les systèmes qui en sont équipés, avant de prélever à la pipette le volume nécessaire à l'analyse.

Selon le volume du produit à prélever, on utilise une pipette ou seringue, une louche ou un flacon lesté. Le prélèvement est réalisé dans les conditions d'aseptie les meilleures : en particulier les instruments et flacons de prélèvement doivent être stériles et ne jamais remplir le contenant à plein capacité, mais aux trois quarts du volume.

Il est pratique de prévoir des billes de verre à l'intérieur des flacons destinés aux prélèvements, ces billes facilitant l'homogénéisation du prélèvement au laboratoire.

Lorsque le liquide est prélevé à partir d'un réseau le prélèvement doit s'effectuer en ayant soin de purger le circuit pour éliminer le liquide des zones de stagnation. Cette précaution n'est pas prise si l'on désire au contraire mettre en évidence les conséquences de ces phénomènes.

Des prélèvements automatiques sont possibles et peuvent être couplés à une analyse sur membrane.

La procédure d'échantillonnage des produits en vrac liquides se fait à l'aide d'un échantilleur de fond ou à soupape.

Citerne (fixes, wagons, camions, navire) : se fait sur un produit homogène et à différents niveaux, et à partir de l'échantillon global on obtient l'échantillon de laboratoire. Si, le produit n'est pas homogène, on doit réaliser des prélèvements, séparés par intervalle de temps, de haut en bas. Dans le cas des citerne navires, l'échantillonnage s'effectue en cours de transvasement, par de prises fréquentes à intervalle régulier.

Remarque : L'échantillonnage doit être effectué, aseptiquement, avec les mains propres, ou avec des gants propres en latex, en se servant des récipients propres et stériles ou des sachets stériles ;

- ✓ Les échantillons doivent être identifiés clairement et intégralement ;
- ✓ Les échantillons doivent avoir un transport rapide et un stockage bref.

7.2.4. Prélèvement de produits solides

Selon la nature du produit ces prélèvements sont effectués au scalpel, à la sonde (fromages et produits mous), à la pipette harpon ou au myectome, la surface est souvent éliminée avant de procéder au prélèvement. Ces deux derniers appareils sont constitués d'un cylindre de verre ou de métal de pénétration aisée parfois muni d'un piston servant à refouler le prélèvement. Ces instruments sont soigneusement stériles avant usage.

Si le produit est hétérogène (plats cuisinés, conserves etc.) il faut s'assurer de la bonne représentativité du prélèvement.

Pour mieux expliquer la procédure d'échantillonnage des produits en vrac solide on prend l'exemple des grains, dont l'échantillonnage se fait avec le matériel suivant : grandes pelle et pelle à main, sonde cylindrique.

Prélèvement en bateau : se fait pendant l'opération de déchargement en plusieurs endroits et à des intervalles de temps déterminés, ainsi à partir de l'échantillon global, on réalise l'échantillon de laboratoire. Prélèvement dans les citernes (Wagons ou dans des camions) : se fait dans toute la hauteur de la couche à l'aide d'une sonde cylindrique, et à des endroits de prélèvement au centre et à environ 50cm des parois (5, 8,11 points de prélèvements).

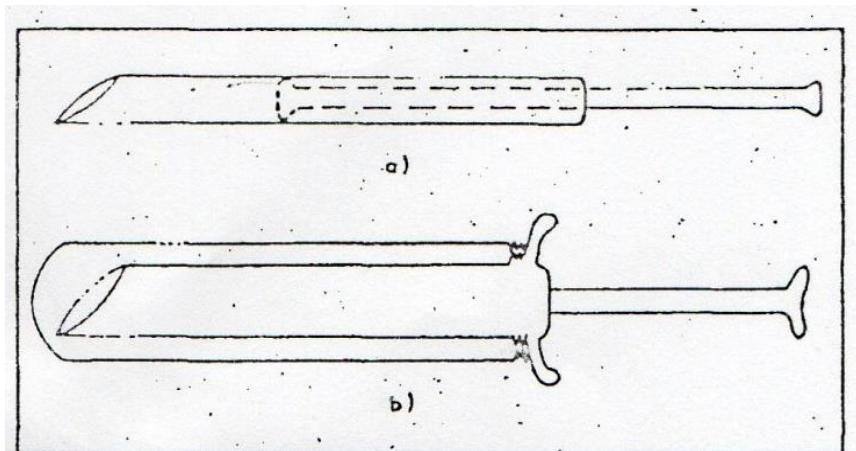


Figure 43: Instrument de prélèvement
a) pipette harpon b) myectome

Remarque : En général la surface d'exposition à l'air est éliminée par un premier prélèvement ou par grattage, ou bien est stérilisée par flambage ou cautérisation à l'aide d'une plaque métallique rougeie.

Pour étudier la flore de surface cette précaution n'est évidemment pas à prendre et le prélèvement est fait en conséquence. Il est possible dans ce cas d'utiliser la méthode d'écouvillonnage.

7.2.5. Cas des produits non homogènes (hétérogènes)

Certains produits présentent une structure hétérogène, mi-solide, mi-liquide (plats cuisinés, conserves etc.).

Dans ce cas il faut prélever de façon proportionnelle un peu de chaque élément. Une homogénéisation de l'ensemble est réalisée au laboratoire avant l'analyse.