

Introduction

Les denrées alimentaires sont des matrices complexes dont la qualité microbiologique, physico-chimique et nutritionnelle doit être évaluée afin de garantir leur conformité aux exigences sanitaires et réglementaires. L'échantillonnage est une étape essentielle de cette évaluation, car la fiabilité des résultats analytiques dépend directement de la représentativité des échantillons prélevés.

Les micro-organismes jouent un rôle déterminant dans la fabrication, la transformation, la conservation et l'altération des aliments. Leur présence peut être bénéfique ou, au contraire, compromettre la qualité sanitaire des produits alimentaires. Ainsi, des études, des expérimentations et des contrôles microbiologiques sont réalisés afin d'évaluer la qualité des aliments, leur conformité aux normes en vigueur ainsi que l'efficacité des procédés de fabrication.

Dans l'idéal, l'ensemble des unités constituant un lot devrait être analysé. Toutefois, une telle démarche est généralement irréalisable en raison des contraintes de temps, de coût et de faisabilité technique. Il est donc nécessaire de recourir à l'échantillonnage, qui consiste à prélever un nombre limité d'unités représentatives d'un lot afin d'en évaluer les caractéristiques microbiologiques et de tirer des conclusions sur l'ensemble du lot.

Qu'est-ce qu'un échantillon ?

Avant d'effectuer une analyse microbiologique, il convient de procéder à une série d'opérations très importantes dont dépend en grande partie la qualité du résultat de l'analyse. Il faut d'abord choisir les échantillons ou définir le lieu et les conditions des prélèvements, puis réaliser ces prélèvements et les transmettre dans de bonnes conditions au laboratoire d'analyse.

Un échantillon est une ou plusieurs unités prélevées à partir d'un lot en vue d'une analyse ou d'un examen. Il doit être représentatif du lot dont il est issu afin que les résultats obtenus puissent être extrapolés à l'ensemble de celui-ci. Les échantillons alimentaires peuvent être constitués de produits entiers emballés, de portions de produits conditionnés ou de portions d'aliments en cours de préparation.

1. Le pourquoi de l'échantillonnage

L'échantillonnage constitue la première étape de l'analyse microbiologique. Il s'agit d'une opération **fondamentale**, souvent délicate, dont dépend la fiabilité des résultats obtenus. Des règles précises ont été établies par différents organismes de normalisation, notamment l'AFNOR (Association française de normalisation) et la DGCCRF (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes), afin de garantir la représentativité et la qualité des échantillons prélevés.

L'échantillonnage consiste à sélectionner et à prélever une partie représentative d'un lot en vue de son analyse. Il permet de collecter des aliments, des ingrédients, de l'eau, des échantillons d'environnement ou d'autres matériaux afin d'évaluer leur qualité microbiologique et leur conformité aux normes de salubrité alimentaire. Il est également utilisé pour vérifier l'efficacité des mesures de maîtrise mises en place pour prévenir, éliminer ou réduire les dangers de contamination. Pour être représentatif du lot analysé, l'échantillon doit être homogène et obtenu sans modification de ses caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques.

Il est également essentiel que les conditions de prélèvement, d'entreposage et de transport ne compromettent pas son intégrité, faute de quoi les résultats d'analyse risquent d'être inexacts ou dépourvus de signification.

1.1. Objectifs de l'échantillonnage

L'objectif **principal** de l'échantillonnage est de prélever des échantillons représentatifs d'un lot tout en veillant à ce que leurs caractéristiques microbiologiques ne soient pas modifiées entre le prélèvement et l'analyse. Il permet également de prendre en compte et de **documenter** la variabilité pouvant exister au sein d'un même lot.

L'objectif poursuivi influence le choix du plan d'échantillonnage, la nature des paramètres analysés ainsi que l'interprétation des résultats obtenus. Dans le cadre des analyses microbiologiques, l'échantillonnage peut notamment être réalisé pour rechercher des **micro-organismes pathogènes**, contrôler la qualité microbiologique des produits et vérifier leur conformité aux exigences d'hygiène et de salubrité.

L'échantillonnage est également utilisé pour vérifier qu'un produit a été fabriqué, manipulé et stocké dans de bonnes conditions. Afin de garantir la fiabilité des résultats, les prélèvements doivent être réalisés de manière aseptique afin d'éviter toute contamination des échantillons destinés à l'analyse.

1.2. Echantillonnage

Il s'agit du choix des éléments à analyser. Deux types de prélèvement sont possibles :

1.2.1. Prélèvement d'éléments apparemment défectueux en vue de mettre en évidence la cause du défaut ; cette méthode pose très peu de problèmes. Il permet d'identifier plus facilement les produits défectueux ou non conformes aux normes.

En général, les échantillons sont prélevés pour constituer des preuves tangibles des anomalies constatées par l'inspecteur ou pour être analysés en laboratoire dans le cadre d'un aliment suspect.

L'échantillonnage sélectif est relativement simple, car on dispose généralement d'indices ou d'autres renseignements permettant de remonter aux aliments que l'on choisit de prélever.

1.2.2. Prélèvement au hasard d'éléments apparemment normaux pour le contrôle de la qualité. Les méthodes statistiques sont théoriquement applicables. L'échantillon doit être statistiquement significatif. Pour procéder à un échantillonnage objectif, l'inspecteur doit avoir accès à l'ensemble des unités constituant le lot à échantillonner, chaque unité doit être identifiable et avoir une probabilité égale d'être choisie.

Il prélève alors de petites unités au hasard à de nombreux endroits du lot, puis les regroupe en un seul échantillon, plutôt que de prélever l'échantillon entier en un seul endroit choisi au hasard (**Figure 1**).

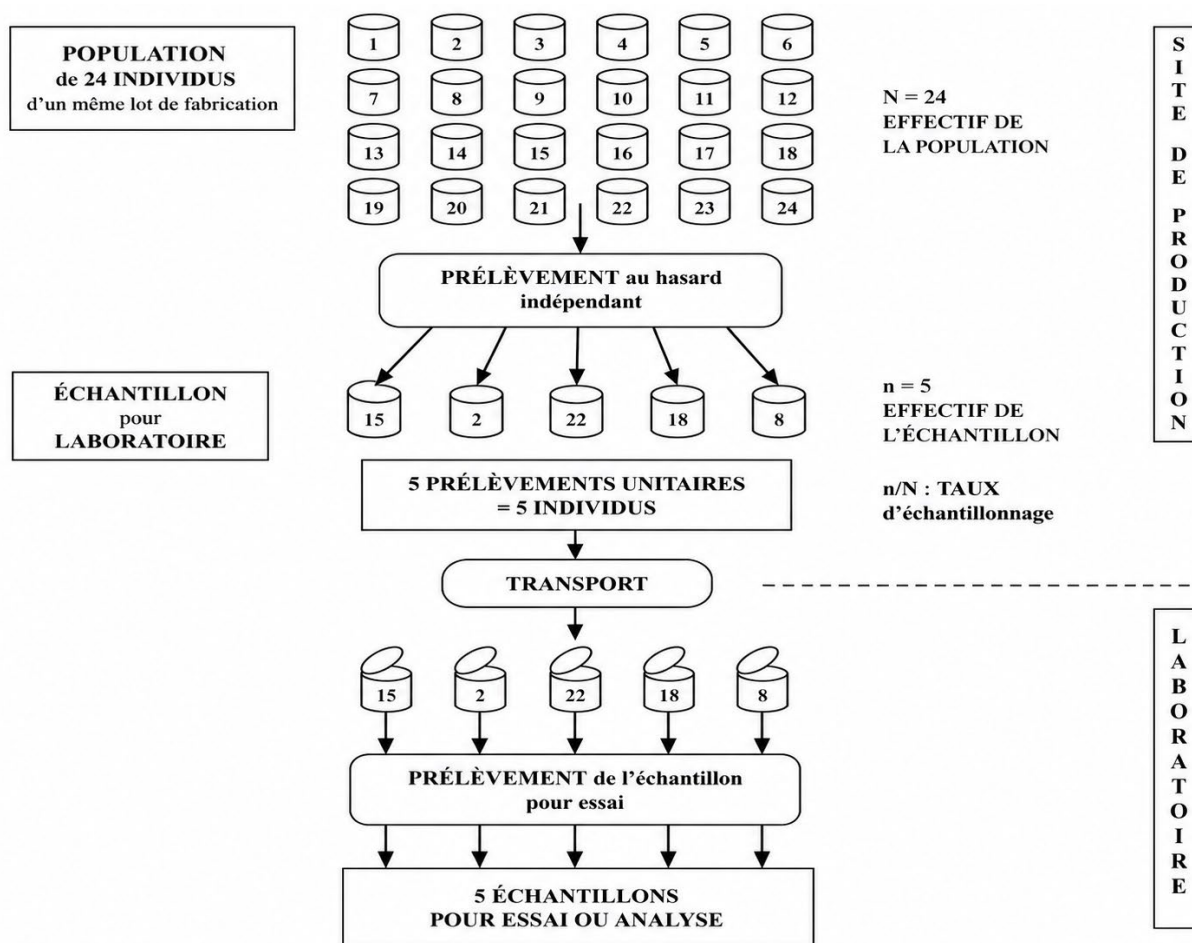


Figure 1. Échantillonnage en vue de l'analyse microbiologique.

1.3. Étapes du prélèvement

Tout prélèvement comprend trois étapes :

- **Prélèvement des échantillons élémentaires** : les prélèvements répétés d'échantillons élémentaires en différents endroits du lot sont mélangés pour former un échantillon global ;
- **Homogénéisation de l'échantillon global** ;
- **Constitution des échantillons finaux pour analyse** : deux échantillons finaux seront prélevés, un à des fins d'analyse et un autre destiné au propriétaire ou détenteur du lot échantillonné.

Lors d'un prélèvement, il convient d'utiliser un matériel d'échantillonnage propre et ne présentant aucun risque de contamination.

1.4. Facteurs influençant l'échantillonnage

Le choix des échantillons, leur nombre et la fréquence des prélèvements dépendent de nombreux facteurs.

- **Nature du produit** :

- nombre d'éléments échantillonnables ;
- répartition éventuelle en emballages regroupant plusieurs éléments ;
- modalités de prélèvement en continu ou en discontinu ;
- le lot peut être homogène (cas des fluides alimentaires tels que le lait) ; dans ce cas, un prélèvement minimal peut être représentatif de l'ensemble du lot ;
- le lot peut être hétérogène ; le nombre d'unités à échantillonner doit alors être adapté à sa variabilité.

- **Caractère à examiner** : il peut être commun à tous les éléments ou présenter une répartition irrégulière dans le lot.

- **But de l'analyse** :

- contrôle systématique des produits finis ;
- contrôle de routine sur une chaîne de fabrication ;
- contrôle en cours de fabrication nécessitant la détection de micro-organismes spécifiques ;
- recherche des causes d'un accident ou d'un défaut de fabrication (détermination de la qualité générale ou recherche de défauts isolés).

- **Rigueur des normes à respecter et tolérances admises** : les exigences réglementaires et les critères de conformité déterminent le plan d'échantillonnage à appliquer.

En fonction de chaque situation, il convient d'appliquer les schémas d'échantillonnage existants ou de réaliser une étude préalable permettant de définir le rythme et le nombre des prélèvements.

Dans le cadre des contrôles de routine ou à la suite d'un incident de fabrication, l'échantillonnage doit être effectué de manière systématique tout au long de la chaîne de production (matières premières, équipements, fluides, emballages et produits finis).

1.5. Méthodes d'échantillonnage : regroupent l'ensemble des techniques permettant de sélectionner un échantillon au sein d'une population de manière à obtenir, dans la mesure du possible, un échantillon représentatif de cette population. Il existe quatre méthodes d'échantillonnage :

1.5.1. L'échantillonnage aléatoire simple : méthode dans laquelle les unités sont sélectionnées au hasard (**Figure 2**), de telle sorte que chaque élément de la population possède la même probabilité d'être choisi.

L'échantillonnage aléatoire simple : méthode dans laquelle les unités sont sélectionnées au hasard (**Figure 2**), de telle sorte que chaque élément de la population possède la même probabilité d'être choisi.

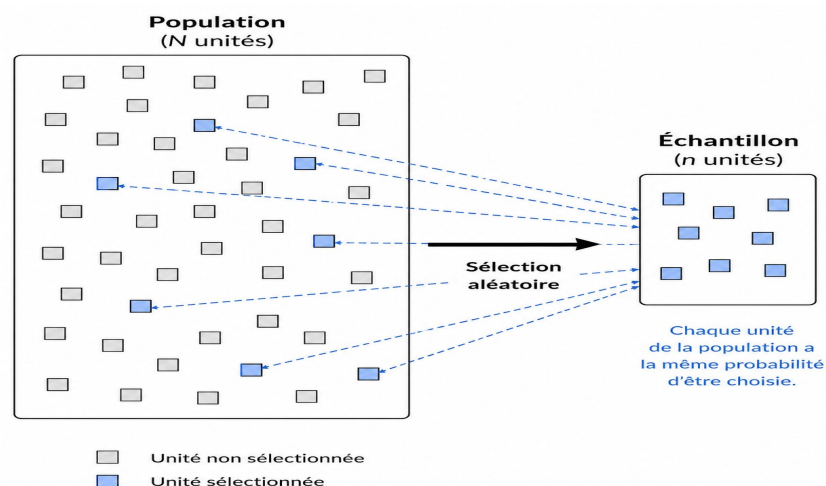


Figure 2. Schéma de l'échantillonnage aléatoire.

1.5.2. Échantillonnage par grappes : cette méthode consiste à subdiviser une population en grappes (sous-groupes), puis à en sélectionner aléatoirement certaines. Tous les éléments appartenant aux grappes retenues sont ensuite inclus dans l'échantillon.

1.5.3. Échantillonnage systématique : cette méthode est réalisée selon un intervalle de prélèvement régulier (**Figure 3**). Elle consiste à établir la liste de tous les éléments de la population visée, puis à déterminer le rapport suivant :

(Nombre d'éléments de la population) / (Taille de l'échantillon).

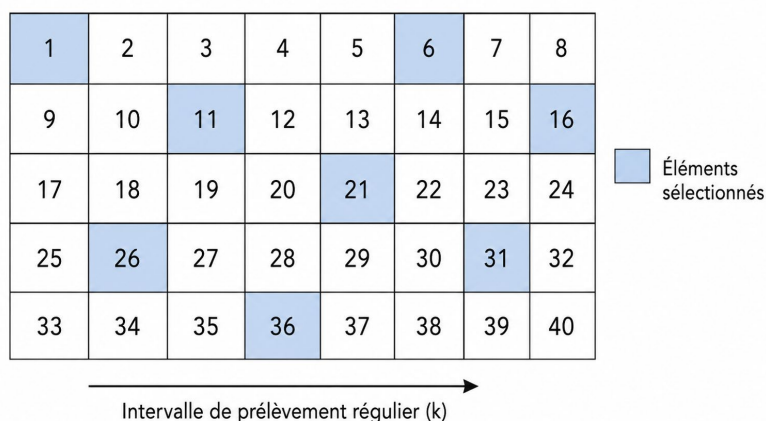


Figure 3. Échantillonnage systématique.

1.5.4. Échantillonnage stratifié : Cette méthode consiste à subdiviser une population hétérogène en strates (sous-groupes) (**Figure 4**). Les éléments sont ensuite sélectionnés dans chaque strate de manière à ce que les proportions des caractéristiques étudiées dans l'échantillon soient les mêmes que dans la population.

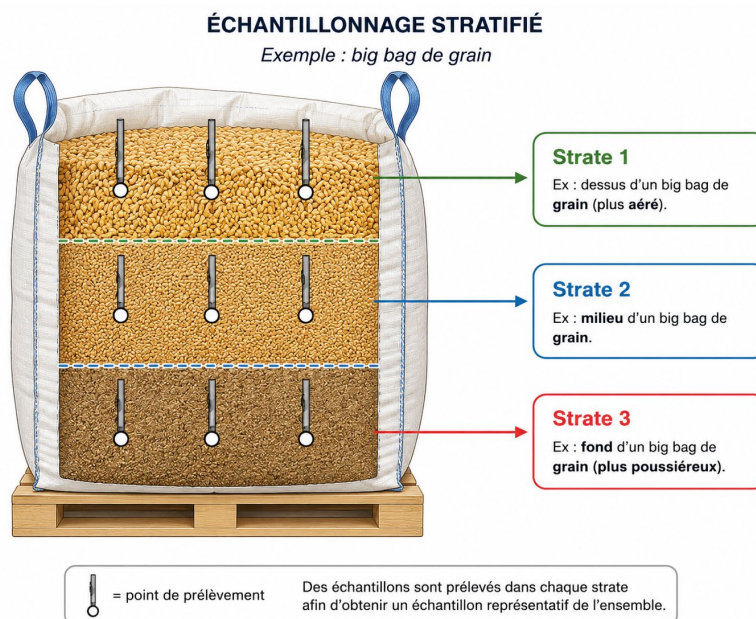


Figure 4. Schéma de l'échantillonnage stratifié.

2. Définition

- ✓ **Produit** : matière ou denrée destinée à être analysée.
- ✓ **Échantillon** : quantité de produit prélevée et représentative d'un lot, qui sera soumise à des essais en laboratoire. Un échantillon peut se composer d'une ou plusieurs unités d'échantillonnage.
- ✓ **Prélèvement** : opération consistant à prélever une ou plusieurs quantités de produit dans un lot en vue de constituer un échantillon destiné à l'analyse.

Aliquote : fraction représentative d'un échantillon ou d'un produit prélevée pour une analyse ou un essai déterminé.

Exemple : 5 est une aliquote de 25.

- ✓ **Prélèvement aseptique** est un prélèvement réalisé dans des conditions permettant d'éviter toute contamination de l'échantillon ou du lot initial par des micro-organismes exogènes.

Il garantit que les résultats microbiologiques reflètent fidèlement l'état du produit au moment du prélèvement. Ce type de prélèvement est indispensable pour tout échantillon destiné à une analyse microbiologique.

- ✓ **Lot** : partie d'une même livraison ou d'une même fabrication présentant les mêmes caractéristiques, telles que l'origine, la variété, le type d'emballage, l'emballeur, l'expéditeur ou l'étiquetage, et, dans le cas d'un processus de production, une quantité de produit fabriquée dans une seule usine en utilisant des paramètres uniformes, ou plusieurs de ces quantités lorsqu'elles sont produites de manière continue et entreposées ensemble.

Exemple : un lot de fabrication correspond à l'ensemble des produits de même nature, fabriqués à partir des mêmes composants de base, sur une même ligne de production et pendant un temps donné, c'est-à-dire l'ensemble des produits présentant des caractéristiques uniformes.

- ✓ **Élément** : partie indivisible d'un lot.
- ✓ **Échantillon élémentaire** : quantité de produit prélevée en un point de la portion échantillonnée.

- ✓ **Échantillon global** : ensemble des échantillons élémentaires prélevés dans un même lot et réunis pour constituer un échantillon représentatif.
- ✓ **Échantillon réduit** : fraction représentative de l'échantillon global, obtenue par réduction représentative de celui-ci.
- ✓ **Échantillon pour laboratoire** : fraction de l'échantillon global ou réduit destinée aux analyses en laboratoire.
L'échantillon destiné au laboratoire (tel que reçu par le laboratoire : boîtes de conserve, fromages entiers, etc.), peut-être l'échantillon final, l'échantillon réduit ou l'échantillon global, et doit contenir une quantité représentative nécessaire à l'analyse (cinq unités pour l'analyse microbiologique et trois unités pour l'analyse physicochimique).
- ✓ **Échantillon final** : partie de l'échantillon global ou réduit, préparée et conditionnée pour être soumise à l'analyse.
- ✓ **Portion échantillonnée** : lot sous lot ou partie identifiée d'un lot soumis à l'échantillonnage.
- ✓ **Échantillon scellé** : échantillon fermé ou identifié au moyen d'un dispositif de scellement ; empêchant tout accès à son contenu sans rupture ou retrait du scellé.
- ✓ **Non endommagé ou modifié** : échantillon protégé contre toute contamination extérieure et conservé dans des conditions limitant les modifications physiques, chimiques ou microbiologiques susceptibles d'altérer sa représentativité.
- ✓ **Unité d'échantillonnage** : portion ou contenant individuel de produit prélevé au hasard dans un lot. Une unité d'échantillonnage peut correspondre à un échantillon destiné à l'analyse.

3. Notion de l'échantillon représentatif

Un échantillonnage représentatif est essentiel lorsque l'analyse vise à détecter la présence de germes pathogènes ou de toxines susceptibles d'être répartis de manière hétérogène dans l'aliment, ou lorsque la commercialisation d'un produit dépend de sa conformité aux normes microbiologiques imposées par la législation.

L'échantillonnage a pour but d'obtenir une petite partie d'un lot qui le représente dans son ensemble. Le lot est échantillonné par le prélèvement répété d'échantillons élémentaires à différents endroits. Ces échantillons élémentaires sont ensuite combinés par mélange pour former un échantillon global. À partir de cet échantillon global, des échantillons finaux sont obtenus par division représentative.

Deux échantillons finaux sont prélevés pour chaque échantillon global : un est destiné à l'analyse (sécurité de l'ingrédient ou de l'aliment) et l'autre est remis au propriétaire ou détenteur du lot échantillonné pour une éventuelle contre-expertise.

La notion d'échantillon représentatif est associée à la fiabilité des résultats obtenus. Il doit donc posséder les mêmes caractéristiques que la population étudiée afin de permettre d'estimer, avec une marge d'erreur acceptable, les caractéristiques de cette dernière à partir des résultats de l'analyse de l'échantillon. On parle alors d'« échantillon représentatif » de la population étudiée.

La représentativité de l'échantillon dépend de plusieurs facteurs, notamment de la nature du produit, de la taille du lot, du nombre d'échantillons élémentaires prélevés et de leur répartition au sein du lot. Elle dépend également du respect des conditions de prélèvement, de transport et de conservation des échantillons. Un échantillonnage réalisé dans de mauvaises conditions peut compromettre la représentativité de l'échantillon et conduire à des résultats non fiables.

Dans le cas d'un produit homogène, les micro-organismes sont généralement répartis de manière uniforme dans l'ensemble du lot. Un nombre limité de prélèvements peut alors suffire à obtenir un échantillon représentatif. C'est notamment le cas de certains produits liquides correctement homogénéisés avant le prélèvement.

À l'inverse, dans un produit hétérogène, les micro-organismes peuvent être répartis de manière irrégulière ou localisée. Certaines parties du lot peuvent donc être plus contaminées que d'autres. Dans ce cas, il est nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons élémentaires et de multiplier les points de prélèvement afin de réduire le risque d'erreur et d'améliorer la représentativité de l'échantillon.

La contamination microbiologique peut également être influencée par les conditions de fabrication, de manipulation, de stockage ou de transport des aliments. Ces facteurs peuvent en effet entraîner une répartition non uniforme des micro-organismes au sein d'un lot, ce qui explique pourquoi il est nécessaire de prélever des échantillons à différents endroits ou à différents moments.

Un échantillon non représentatif peut conduire à une sous- ou à une surestimation de la contamination réelle du lot. Une contamination présente dans l'aliment peut par exemple ne pas être détectée si le prélèvement est insuffisant ou mal réparti. À l'inverse, un prélèvement effectué uniquement dans une zone fortement contaminée peut donner une image exagérée de l'état microbiologique du produit.

La qualité et la validité des résultats microbiologiques dépendent donc en grande partie de la qualité de l'échantillonnage. Même lorsque les méthodes analytiques utilisées en laboratoire sont performantes, les résultats obtenus ne peuvent être fiables que si l'échantillon analysé est représentatif du lot dont il provient. L'obtention d'un échantillon représentatif est donc une étape fondamentale de toute analyse microbiologique des aliments.

4. Types de prise d'échantillon

L'échantillonnage idéal est un échantillonnage à 100 %, ce qui est impossible lorsque l'on a affaire à des éléments indivisibles que l'analyse conduit à détruire (conserves). Il peut toutefois être appliqué lorsque l'on a affaire à des produits **en vrac**, pour lesquels une partie aliquote peut être prélevée sans nuire le reste du lot.

4.1. Nombre et volume des échantillons

Le premier problème à résoudre est le contrôle d'une donnée quantitative dont la présence est constante et normale. Il s'agit de contrôler, souvent en continu, le niveau d'une flore ou d'un constituant chimique dans la matière première, le produit fini ou à des étapes cruciales de la fabrication. Il faut soit maintenir ces niveaux dans une fourchette, soit déterminer une valeur moyenne pour le caractère étudié.

Du point de vue statistique, un échantillonnage satisfaisant est réalisé en prélevant un nombre d'échantillons égal à la racine carrée du nombre de divisions élémentaires du produit à analyser. Ce nombre devient toutefois rapidement excessif. De nombreux auteurs recommandent donc de prélever au moins dix échantillons élémentaires, quel que soit le nombre d'éléments dans chaque lot.

Le deuxième problème, très différent du premier, consiste à mettre en évidence un défaut grave et inhabituel dans certains éléments d'un lot, par exemple une contamination bactériologique exceptionnelle. Dans ce cas, la proportion minimale de pièces défectueuses détectables dépend de la taille de l'échantillon, c'est-à-dire du nombre de pièces prélevées et analysées. La détermination de la proportion de pièces contaminées dépend du nombre absolu de pièces prélevées pour composer l'échantillon, et non du rapport entre le nombre de pièces échantillonnées et le nombre total de pièces du lot.

Exemple du pourcentage de contaminations décelables en fonction du nombre de pièces analysées dans un lot.

Nombre de pièces échantillonnées	% de contamination décelable
10	37
20	21
30	16
50	10
100	4

Le nombre d'échantillons à prélever (ou à analyser dans un lot) peut être déterminé de manière mathématique en fonction du niveau de confiance recherché, à l'aide de la formule suivante :

$$n = \frac{\log(1-p)}{\log(1-d)} \quad (\text{ICMSF, 1986}).$$

n : nombre d'éléments à échantillonner ;

p : probabilité de déceler le défaut (le micro-organisme) dans les éléments prélevés (en général, $p = 0,95$) ;

d : pourcentage de défaut dans les éléments du lot entier (souvent inférieur à 0,05).

La plupart des techniques d'échantillonnage des produits préemballés peuvent être regroupées en trois catégories (**Guiraud, 2003**) :

- **Technique des pourcentages** : pour les lots considérés comme très importants (1% pour un grand lot, 10% pour un lot plus ou moins petit) ;

- **Technique de la racine carrée ($2\sqrt{N}$)** : pour les lots de taille moyenne ($2\sqrt{N}$ de l'effectif du lot) ;

Un échantillonnage satisfaisant au point de vue statistique est obtenu en appliquant la formule suivante : $n = \sqrt{N}$

Dans la quelle **n** : est le nombre d'échantillons à analyser et **N** le nombre total de divisions du produit à analyser. Cependant, cette méthode conduit souvent à un nombre trop élevé d'analyses, en particulier lorsque **n** est supérieur à 10.

- **Technique de la racine cubique ($3\sqrt{N}$)** : pour les lots considérés comme assez grands ($3\sqrt{N}$ de l'effectif du lot).

4.2. Choix des échantillons

- **Prélèvement au hasard** (tables de nombres) : il s'agit de choisir des échantillons apparemment normaux dans un lot. Ces échantillons doivent être choisis **de manière aléatoire**. Il existe des tables de prélèvement au hasard (**Tableau 1**), qui sont des successions de nombres généralement déterminés par tirage au sort. Il suffit de compter les éléments du lot et de prélever ceux correspondant au 1^{er} nombre, et ainsi de suite pour les nombres successifs.

Tableau 1. Table des nombres au hasard (Extrait).

07	59	66	97	63	46	18	42	62	56
45	01	64	32	48	85	43	84	10	24
32	36	52	26	54	28	95	13	08	32
62	44	03	61	09	37	48	42	28	49
84	88	65	64	14	01	20	79	16	11
96	44	92	77	26	52	29	34	45	04
53	62	97	78	95	08	84	61	71	59
49	20	83	56	61	85	88	52	50	28
59	26	29	62	89	83	10	13	25	32
72	83	58	75	45	53	94	02	22	22
08	91	36	76	59	69	05	89	14	98
14	98	26	99	26	14	91	52	01	85
24	45	52	95	27	26	94	63	89	39
07	26	11	26	45	52	63	65	79	03
05	92	74	50	33	45	66	25	42	27
25	09	39	18	08	90	72	75	26	57
41	90	46	51	73	98	35	84	59	78
96	05	59	89	61	38	80	95	01	67
22	84	05	97	09	46	62	73	17	63
46	45	83	96	47	23	51	45	37	83
09	17	71	96	79	58	92	78	70	80
68	93	43	12	48	68	87	22	54	46
32	26	62	65	90	57	06	39	79	14
92	24	87	91	13	18	89	72	45	37
58	54	36	07	15	68	12	23	66	02

Pour effectuer un prélèvement au hasard, on associe à chaque élément un ou plusieurs groupes de chiffres. On lit ensuite les nombres figurant sur la table à partir d'un point et dans un ordre arbitraire, puis on compose l'échantillon avec les éléments dont le numéro correspond.

Exemple :

- si l'on désire prélever 5 pièces au hasard dans un lot de 90, on prélèvera selon la première ligne de la table la 7^e, la 59^e, la 66^e, la 63^e et la 46^e, la valeur 97 étant évidemment exclue.

- si l'on désire dans un lot de 1000 pièces prélevé hasard 10 pièces on peut utiliser des nombres de 3 chiffres obtenus par exemple en lisant verticalement les colonnes et on prélèvera donc la 43^e, 752^e, 503^e, 916^e, 665^e, 642^e, 482^e, 932^e, 726^e et 645^e.

D'autres méthodes sont également utilisées :

Exemple 1 : si N est le nombre d'éléments d'un lot et n le nombre d'échantillons à prélever on calcule $x = N/n$, puis on compte jusqu'à x , on prélève, et ainsi de suite. La périodicité d'un tel prélèvement peut toutefois être critiquable.

Exemple 2 : une autre méthode consiste à prendre la racine carrée du nombre N , soit y , et à diviser le lot en groupes de y . Dans chaque groupe, on compte de 1 à y , puis on prélève le y^{e} élément dans le 1^{er} groupe, le $y-1^{\text{e}}$ dans le 2^e groupe, et ainsi de suite jusqu'au nombre d'échantillons souhaité. Cette méthode est plus satisfaisante.

Ces méthodes de choix s'appliquent à des lots, par exemple au niveau du stockage ou de la livraison, mais aussi aux lots en cours de fabrication. Les prélèvements s'effectuent alors au fur et à mesure, au passage en un point ou à la fin de la chaîne de fabrication.

Pour être significatif, l'échantillonnage doit être étalé dans le temps : un échantillon constitué exclusivement d'éléments successifs est peu représentatif de l'ensemble d'une production ou d'un lot. Il est souvent conseillé d'effectuer des prélèvements espacés d'au moins un quart ($1/4$) d'heure d'heure dans le cadre d'un échantillonnage limité.

4.3. Fréquence des prélèvements et analyses

L'échantillonnage doit être planifié et réparti dans le temps afin d'assurer une surveillance représentative de la production. La fréquence des prélèvements dépend principalement du volume de production, de la nature du produit et des risques de contamination ou de non-conformité liés au procédé de fabrication.

La fréquence des analyses de routine doit être définie de manière régulière et adaptée au niveau de production ; elle augmente avec l'importance de la production et le niveau de risque identifié. Des analyses complémentaires peuvent également être réalisées à chaque modification susceptible d'influencer la qualité du produit, notamment lors d'un changement de lot de matière première, de la mise en service d'un équipement, ou après une intervention de maintenance, une modification ou une réparation d'un appareil.

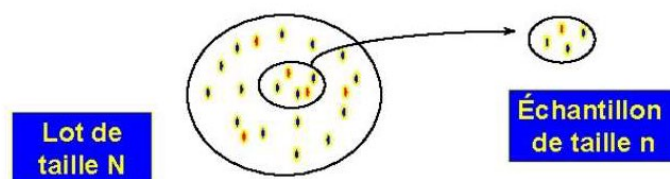
❖ Fréquences couramment recommandées :

- mensuelle ;
- bimestrielle ;
- trimestrielle.

5. Plan d'échantillonnage

Les plans d'échantillonnage sont établis en fonction de l'objectif du contrôle : contrôle de qualité régulier, programme de surveillance, recherche de micro-organismes pathogènes en fonction de l'évaluation du risque, contrôle réglementaire, etc. Le nombre d'unités à prélever n'est pas systématiquement fixé à cinq et varie selon les recommandations et les normes applicables (ICMSF, 1986 ; Codex Alimentarius ; Norme ISO 2859 ; Jarvis, 1989 ; Puri, 1990).

Un plan d'échantillonnage définit le nombre d'unités constituant l'échantillon ainsi que la règle de décision permettant d'évaluer la conformité d'un lot par rapport à une spécification donnée. Il s'agit d'une procédure statistique utilisée pour déterminer si un lot doit être accepté ou rejeté.



5.1. Principes généraux des plans d'échantillonnage

La Commission Internationale des Normes Microbiologiques relatives aux denrées alimentaires a défini des méthodes d'échantillonnage pour l'analyse systématique des produits alimentaires.

Le principe de base est le suivant : un échantillon analysé est considéré comme non satisfaisant s'il contient des micro-organismes dangereux ou des germes en nombre supérieur à une limite au-delà de laquelle ils deviennent potentiellement dangereux.

Dans cette méthode, 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 micro-organismes dangereux, **m** peut être égal à 0.

Lorsqu'un micro-organisme 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** sépare la 2^{ème} et la 3^{ème} (Figure 5).

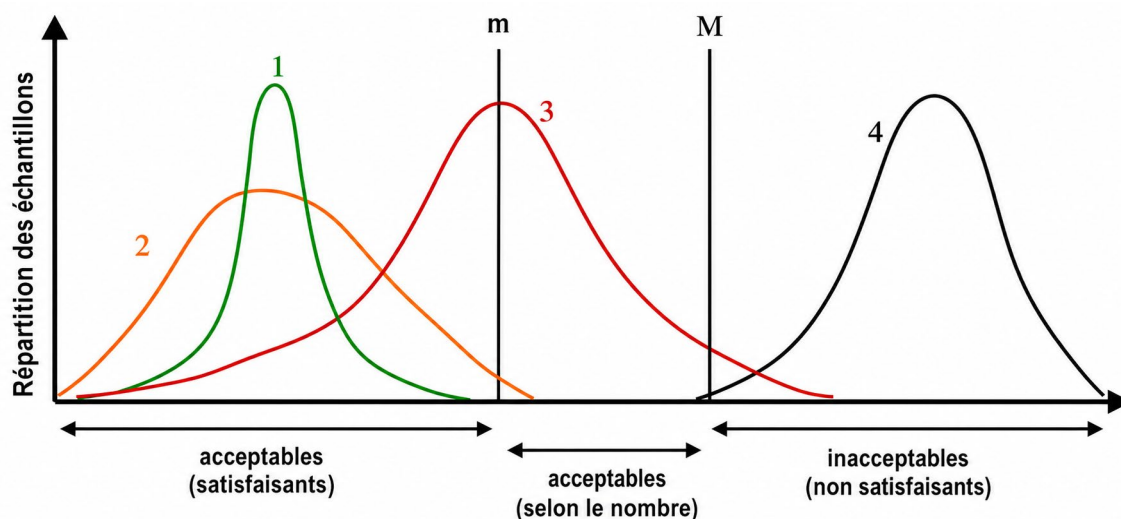


Figure 5. Distribution des échantillons selon l'ICMSF.

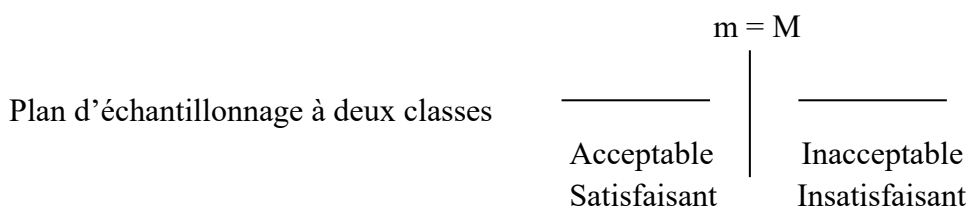
L'échantillonnage microbiologique est exprimé en fonction de plans à deux ou trois classes, en fonction du niveau de risque. Les plans à deux classes sont utilisés quand on ne tolère pas, dans les aliments, la présence d'une contamination microbienne. L'échantillonnage à trois classes est utilisé quand on tolère la présence d'un certain niveau de contamination.

5.1.1. Plan à deux classes

Dans un plan d'échantillonnage à deux classes, les échantillons analysés sont divisés en deux catégories : « **satisfaisant** » (acceptable) et « **insatisfaisant** » (inacceptable), en fonction d'une seule valeur limite de référence « **m=M** ».

Ce plan permet de qualifier simplement chaque unité d'échantillonnage comme satisfaisante (bonne qualité microbiologique) ou insatisfaisante. Dans certains plans, la présence d'un organisme particulier, tel que *Salmonella spp.*, est inacceptable.

Dans d'autres plans, un nombre limité d'organismes peut être acceptable. Pour ces derniers, une seule limite est établie, et indiquée par « **m** ». Elle permet de distinguer un compte acceptable d'un compte inacceptable. Le plan à deux classes rejette un lot si plus de « **c** » unités sur « **n** » unités échantillonnées examinées sont inacceptables. En général, **c=0** pour les micro-organismes pathogènes primaires.



Dans le plan à 2 classes, le résultat de l'analyse peut être :

- «**Acceptable ou satisfaisant, propre à la consommation**» si le nombre de germes est inférieur à la norme désignée par la réglementation (Résultat < **m**) ;
- «**Inacceptable ou insatisfaisant, impropre à la consommation**» si le nombre de germes est supérieur à cette même norme (Résultat > **m**) (**Figure 6**).

Avec un plan d'échantillonnage à 2 classes, **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 (**c=0**).

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

5.1.2. Plan à trois classes

Plan à trois classes est fondé sur l'utilisation de 2 valeurs limites de référence (m et M), séparant la conformité de la qualité marginale tolérée, de la non-conformité.

Les unités d'échantillonnage présentant un nombre de micro-organismes inférieur à la valeur de « m » sont acceptées ou de bonne qualité.

Les unités présentant un nombre de micro-organismes situé entre les valeurs de « m » et « M » sont jugées comme étant de qualité médiocre (marginale), et les unités renfermant plus de « M » sont insatisfaisantes au regard des bonnes pratiques de fabrication ou inacceptables.

Dans le cas d'un échantillon prélevé au hasard, où « n » unités d'échantillonnage seraient choisies dans un lot, le lot serait alors rejeté si l'une des unités présentait un compte supérieur de la valeur de « M » ou si plus de « c » unités présentaient des comptes supérieurs à la valeur de « m ».

	m	M
Plan d'échantillonnage à trois classes		
Acceptable	Médiocre	Inacceptable ou
Satisfaisant	Acceptable	Insatisfaisant au
		regard des bonnes
		pratiques de fabrication.

Dans le plan à 3 classes, le résultat de l'analyse peut être :

- **Résultat $\leq m$** : le résultat est considéré comme « satisfaisant, propre à la consommation » ;
- **Résultat compris entre m et M** : le résultat est toléré, il est de qualité médiocre (toujours « acceptable, toujours propre à la consommation » ;
- **Résultat $\geq M$** : le résultat est considéré comme « non satisfaisant ou inacceptable, impropre à la consommation sans que pour autant le produit soit considéré comme toxique ». Les valeurs de M sont généralement fixées à :

- ✓ $M = 10 m$ lors du dénombrement effectué sur milieu **solide**.
- ✓ $M = 30 m$ lors du dénombrement effectué en milieu **liquide**.

Toutefois, ces valeurs peuvent varier selon le micro-organisme considéré, la matrice alimentaire analysée et le référentiel microbiologique utilisé.

Cependant, dans certains cas particuliers, le résultat d'une analyse microbiologique peut être : « potentiellement toxique ». Le produit, impropre à la consommation, doit évidemment être immédiatement retiré de la vente (**Figure 6**).

La présence de *Salmonella spp.* dans une denrée alimentaire pour laquelle son absence est exigée rend le produit non conforme et potentiellement dangereux pour le consommateur.

De même, la présence de *Listeria monocytogenes* dans une denrée alimentaire pour laquelle son absence est requise, ou lorsque les critères réglementaires sont dépassés, entraîne une non-conformité pouvant conduire au retrait ou au rappel du produit.

PLAN A DEUX CLASSES

<u>CAS GÉNÉRAL</u>	
ABSENCE	PRÉSENCE
SATISFAISANT	NON SATISFAISANT
<u>CAS PARTICULIER</u>	
S'applique à quelque cas de produits carnés	
3m solide	Milieu
m	
.....	
10 m liquide	Milieu
SATISFAISANT	NON SATISFAISANT

PLAN À TROIS CLASSES

Tolérance d'origine analytique			
m	3 m	M = 10 m	S = 10³ m en milieu solide

	10 m	M = 30 m	S = 10³ m en milieu liquide
SATISFAISANT	ACCEPTABLE si $c/n \leq 2/5$	NON SATISFAISANT	NON SATISFAISANT Produit toxique ou corrompu
	NON SATISFAISANT si $c/n > 2/5$		

Figure 6. Interprétation des résultats de l'analyse microbiologique.

Les symboles et termes utilisés dans les plans, ainsi que leurs définitions, sont les suivants :

n : représente le nombre d'unités de prélèvement prélevées au hasard dans un lot et examinées pour répondre aux exigences définies. Il correspond à la taille de l'échantillon. Selon le cas, « **n** » peut être égal à 1, 2, 3, 4, 5, etc. Il peut varier en fonction du risque, du nombre d'unités disponibles et de la taille des lots, selon le plan d'échantillonnage utilisé. Le nombre **5** a été établi par l'ICMSF dans le but d'augmenter la probabilité de détecter un problème microbiologique lorsqu'il est présent.

m : la valeur numérique de « **m** » représente des concentrations acceptables de micro-organismes, généralement exprimées en g ou en ml. Dans un plan à deux classes, « **m** » sert à distinguer les unités de qualité acceptable de celles de qualité inacceptable. Dans un plan à trois classes, « **m** » permet de distinguer les unités de qualité acceptable de celles de qualité médiocre.

M : (Plans à trois classes seulement). Il représente des concentrations inacceptables de micro-organismes, généralement exprimées en g ou en ml. Leur dépassement indique des conditions inacceptables, non contrôlées et/ou un risque pour la santé, selon le critère considéré.

« **M** » permet de distinguer les unités de qualité médiocre de celles qui sont de qualité inacceptable. Si la valeur d'une seule unité d'échantillonnage est supérieure à « **M** », l'unité d'échantillonnage ou le lot dont provient l'échantillon est considéré comme inacceptable.

c : représente le nombre maximal permis d'unités prélevées de qualité marginale. Si le nombre d'unités de qualité marginale est supérieur à **c**, le lot dont provient l'échantillon est inacceptable (ou insatisfaisant).

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* de 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* entéropathogènes, streptocoques β 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.).

5.2. Critères microbiologiques

D'après Jean-Louis Jouve (1996), un critère microbiologique correspond à : « *Un ensemble d'éléments qualitatifs et quantitatifs définissant les caractéristiques microbiologiques essentielles attendues d'un produit donné, qu'il est possible d'atteindre par des interventions appropriées.* »

Selon le règlement (CE) n° 2073/2005, les critères microbiologiques sont répartis en deux catégories principales : les critères de sécurité alimentaire et les critères d'hygiène du procédé.

5.2.1. Critères de sécurité alimentaire (CSA) définissent l'acceptabilité sanitaire d'un aliment et s'appliquent principalement aux produits mis sur le marché. Le non-respect d'un de ces critères entraîne le retrait, le rappel, le retraitement ou le réemploi du produit concerné. Ces critères s'appliquent aux denrées alimentaires mises sur le marché communautaire ainsi qu'à celles importées dans la Communauté.

5.2.2. Critères d'hygiène du procédé (CHP) sont des indicateurs de l'acceptabilité du fonctionnement hygiénique du processus de production ou de distribution. Le non-respect d'un critère microbiologique entraîne des actions correctives destinées à maintenir l'hygiène du procédé, comme la révision des bonnes pratiques d'hygiène et du système HACCP, ou une meilleure sélection des matières premières. Le non-respect de ces critères ne permet pas de conclure que l'aliment est impropre à la consommation humaine.

Chaque couple « denrée alimentaire-critère microbiologique » est caractérisé par un niveau de risque associé, qui reprend :

❖ **Santé 1** : le danger indiqué représente un risque direct et élevé pour la santé de la population, avec des conséquences imminentes sérieuses ou pouvant entraîner la mort.

Des mesures appropriées seront prises à l'égard du produit, suivant une évaluation des risques, afin que le consommateur n'y soit pas exposé. Ces interventions garantiront que le produit ne sera plus vendu et, si nécessaire, que la population ne le consommera pas.

❖ **Santé 2** : le danger identifié représente un risque pour la santé humaine si les micro-organismes sont présents en nombre suffisant. Il s'agit d'une situation qui pourrait avoir des répercussions indésirables temporaires sur la santé des gens, sans menacer leur vie. La probabilité de répercussions indésirables graves est jugée faible. Le danger peut également être associé à la présence d'un indicateur (par exemple, *E. coli*). Des mesures doivent être mises en place pour identifier les causes de la non-conformité et garantir l'innocuité du produit.

Différentes situations pourraient justifier une augmentation du niveau de risque de « santé 2 » à « santé 1 », notamment lorsque :

- les produits constituant un risque « santé 2 » sont associés à une maladie lors d'une épidémie d'origine alimentaire ;
- les micro-organismes pathogènes « santé 2 » sont présents à des concentrations correspondant aux doses infectieuses ou toxigènes ;
- des produits constituant un risque « santé 2 » pour la population générale sont destinés à des populations sensibles, comme les enfants, les personnes âgées ou les personnes dont le système immunitaire est affaibli.

5.2.3. Altération : le dépassement du critère indique un processus d'altération microbiologique du produit. En général, ce dépassement n'entraîne pas de risque pour la santé humaine, mais il peut indiquer de mauvaises pratiques, comme une durée de conservation à l'étalage trop longue. Le dépassement du critère ne provoque pas automatiquement une altération organoleptique macroscopique (**Tableau 2**).

Tableau 2. Synthèse de l'interprétation des résultats microbiologiques selon les critères d'acceptabilité.

Critère	Résultats		
	<m	m<x<M ou >c	>M
Santé 1 (m=M)	Conforme	/	Inacceptable Risque pour la santé
Santé 2	Conforme	Médiocre	Non conforme
CHP	Conforme	Médiocre Au regard des BPF	Insatisfaisant Au regard des BPF
Altération	Conforme	Médiocre Au regard des BPF	Insatisfaisant Au regard des BPF

Dans le cadre d'un échantillonnage sélectif, si une denrée alimentaire est contaminée par plusieurs micro-organismes, lors de l'interprétation, c'est le niveau « non conforme » qui est prioritaire sur le niveau « médiocre », même si le micro-organisme médiocre analysé est de catégorie 2 contre un micro-organisme de catégorie 1 pour le non conforme.

5.3. Interprétation des résultats

La terminologie utilisée pour la rédaction des interprétations réalisées sur les rapports d'appréciation du service de la sécurité alimentaire liés aux résultats d'analyses microbiologiques est la suivante :

Pour les matrices alimentaires pour lesquelles les valeurs de « n » et « c » ne sont pas spécifiées, les valeurs par défaut : $n = 5$ et $c = 2$ peuvent être utilisées.

5.3.1. Qualité microbiologique conforme : le résultat analytique est inférieur à « m ».

5.3.2. Qualité microbiologique médiocre/acceptable : pour un seul échantillon, le résultat analytique est supérieur à « m » sans dépasser « M ». Si $n > 1$, le nombre d'échantillons supérieur à « m » sans dépasser « M » doit être inférieur ou égal à « c ». Le profil microbiologique de l'aliment se situe près des critères satisfaisants.

5.3.3. Qualité microbiologique insatisfaisante au regard des bonnes pratiques de fabrication : cet énoncé s'applique lorsque le produit n'est pas encore altéré, mais que la valeur « c » ou « M » est dépassée, et est principalement associé aux critères d'hygiène du procédé (CHP) ou d'altération dans les aliments prêts à consommer. À ce moment, la signification se rattache aux mauvaises pratiques de fabrication et à une (ou plusieurs) situation(s) non contrôlée(s) de l'établissement.

➤ **Critères CHP :** Germes aérobies mésophiles, bactéries lactiques, coliformes totaux, *Enterobacteriaceae*.

5.3.4. Qualité microbiologique non conforme : en présence de micro-organismes indicateurs de santé 2, cette conclusion s'applique lorsque le résultat analytique est supérieur à « M » ou si le nombre d'échantillons de qualité médiocre est supérieur à « c ».

Critère de santé 2 : *E. coli*, *staphylocoques coagulase positive*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*.

5.3.5. Qualité microbiologique inacceptable présentant un risque pour la santé humaine : la denrée alimentaire est considérée comme dangereuse. Présence, dans un aliment prêt à consommer, de micro-organismes pathogènes primaires, de toxines microbiennes de santé 1 ou de micro-organismes pathogènes de santé 2 à des concentrations correspondant aux doses infectantes ou toxigènes.

Exemple : micro-organismes pathogènes primaires :

Virus : *norovirus*, hépatite A, *rotavirus*, etc.

Bactéries : *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* thermotolérants, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* (souches pathogènes), *Shigella*.

Toxines : la limite est supérieure ou égal à 10^5 pour les entérotoxines de *Staphylococcus aureus coagulase positive*, toxines de *Bacillus cereus* et de *Clostridium botulinum*, toxines d'algues présentes dans les produits marins et l'eau embouteillée, etc.

Protozoaires : *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, etc.

- ✓ **Les Micro-organismes pathogènes de santé de niveau 2 à des concentrations correspondant aux doses infectantes ou toxigènes, correspondent à un niveau de risque de santé de niveau 1 :**

Staphylococcus aureus : $\geq 10^5$ UFC/g ou ml ;

Clostridium perfringens : $\geq 10^5$ UFC/g ou ml ;

Bacillus cereus : $\geq 10^5$ UFC/g ou ml ;

Vibrio parahaemolyticus : $\geq 10^6$ UFC/g ou ml.

5.4. Choix du plan

Le plan à **trois classes** est le plus souvent adopté. La valeur de **m** est déterminée à partir des résultats d'analyse de nombreux échantillons prélevés sur des lots jugés satisfaisants. La valeur de **M** est plus difficile à fixer et dépend du produit, du micro-organisme recherché et de la méthode utilisée.

Les valeurs de **n** et de **c** sont choisies en fonction du niveau d'acceptabilité ou de rejet souhaité pour les lots. Il est évident que plus **n** est grand et plus **c** est petit, meilleur est le contrôle réalisé (**Tableau 3**).

Tableau 3. Choix des valeurs de **n** et **c**, ainsi que du type de plan, en fonction des risques pour la santé et des modalités d'utilisation du produit.

Utilité ou risque		Condition prévisible de manipulation et de consommation après échantillonnage, dans les conditions normale d'emploi		
		réduction du risque	pas d'influence sur le risque	Augmentation du risque
Pas de risque direct pour la santé. Utilité : vie commerciale		Cas n°1 3 classes n= 5 c= 3	Cas n°2 3 classes n= 5 c= 2	Cas n°3 3 classes n= 5 c= 1
Risque pour la santé	Faible, indirect	Cas n°4 3 classes n= 5 c= 3	Cas n°5 3 classes n= 5 c= 2	Cas n°6 3 classes n= 10 c= 1
	Moyen, direct Diffusion limité	Cas n°7 3 classes n= 5 c= 2	Cas n°8 3 classes n= 5 c= 1	Cas n°9 3 classes n= 10 c= 1

	Moyen, direct Large diffusion possible	Cas n°10 2 classes n= 5 c= 0	Cas n°11 2 classes n= 10 c= 0	Cas n°12 2 classes n= 20 c= 0
	Sévère, direct	Cas n°13 2 classes n= 15 c= 0	Cas n°14 2 classes n= 30 c= 0	Cas n°15 2 classes n= 60 c= 0

Exemple d'application : contrôle de l'absence de salmonelles dans le lait en poudre.

Les caractéristiques de risque « produit » sont classées en :

- les produits contenant des ingrédients suspects ;
- absence d'application de traitements antimicrobiens efficaces sur le germe considéré ;
- possibilité de croissance en cas d'erreur (composition du produit, pH, température, activité de l'eau, etc.).

À partir de ces caractéristiques, cinq catégories d'aliments peuvent être déterminées :

- Catégorie I : aliments destinés aux enfants malades, déficients ou âgés ;
- Catégorie II : aliments présentant les trois catégories de risque ;
- Catégorie III : aliments présentant deux catégories de risque.
- Catégorie IV : aliments présentant une seule catégorie de risque ;
- Catégorie V : aliments ne présentant aucune caractéristique de risque (**Tableau 4**).

Il est alors possible de définir un plan d'acceptation basé sur l'analyse d'échantillons unitaires de 25 grammes et sur les cas n° 13, 14 et 15 (Tableau 3).

Tableau 4. Plan d'échantillonnage pour la recherche de *Salmonella* dans du lait en poudre.

Catégorie du produit	Nombre d'unités testées		Signification : probabilité à 95% qu'il n'y ait pas de 1 <i>Salmonella</i> dans
	0 positif	Pas plus de 1 positif	
I	60 (1500 g)	95 (2375 g)	500 g
II	30 (750 g)	48 (1200 g)	250 g
III, IV, V	15 (375 g)	24 (600 g)	125 g

6. Effectif de l'échantillon à prélever

6.1. Échantillon pour laboratoire

La taille de l'échantillon destiné au laboratoire dépend de la nature du produit et doit être de :

- pour des portions unitaires de viande et des denrées animales ou d'origine animale : si possible, au moins cinq unités ;
- pour des conserves à base de denrées animales ou d'origine animale : cinq unités ;
- pour les coquillages : un nombre suffisant pour obtenir au laboratoire au moins 5 fois 25 g de chair et de liquide inter-valvaire.

Dans de nombreux cas, le laboratoire doit disposer d'environ 500 g afin de réaliser l'ensemble des analyses prévues.

6.2. Échantillon pour essai

La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et de ses dilutions doit être réalisée à partir :

- les parties superficielles et profondes, **notamment** pour les produits en tranches, hachés ou divisés, ainsi que pour les plats cuisinés à l'avance ;
- la partie profonde du produit pour les viandes (pièces), les produits de charcuterie (pièces) et les poissons entiers, après cautérisation de la surface ;
- le produit homogénéisé (lait) ou les parties superficielles et profondes, selon la nature du produit, pour les produits laitiers.

Dans le cadre d'examens microbiologiques effectués à la suite de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), il est nécessaire de rechercher les germes pathogènes, toxinogènes et/ou leurs toxines. Cette recherche doit être effectuée à la fois en surface et en profondeur des aliments analysés.

6.3. Nombre d'échantillons élémentaires

Le nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever à partir d'ingrédients ou d'aliments en vrac répartis uniformément est indiqué dans le tableau suivant (**Tableau 5**).

Tableau 5. Nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever selon la taille du lot d'ingrédients ou d'aliments en vrac répartis uniformément.

Taille du lot	Nombre minimal d'échantillons élémentaires
$\leq 2,5$ tonnes	7
$> 2,5$ tonnes	$\sqrt{(20 \times \text{Nb tonnes de la portion échantillonnée})}$

6.3.1. Cas du vrac

Déterminée en fonction du temps de déchargement et de la taille du lot échantillonné. En se référant au tableau 5 « Nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever en fonction de la taille de la portion échantillonnée d'ingrédients ou d'aliments en vrac », il est possible de déterminer la fréquence d'échantillonnage du vrac en fonction de ces deux variables.

Exemple de calcul permettant de déterminer la fréquence d'échantillonnage :

1. Le lot de vrac comprend 1 remorque de 40 tonnes qui sera déchargée en environ 90 minutes.
2. Le poids total est de 40 tonnes :
 $(\sqrt{20 \times 40} = \sqrt{800} = 28,28),$

Ainsi, **29 échantillons élémentaires** doivent être prélevés.

3. Le déchargement du lot dure 90 minutes et nécessite 29 échantillons :
 $90 \div 29 = 3,1$ minutes

4. Un échantillon sera donc prélevé toutes les **3 minutes** environ pendant le déchargement du lot de 40 tonnes.

5. La pelle utilisée dans cet exemple a une capacité de 200 g.

6. Les 29 échantillons de 200 g représentent :

$$29 \times 200 = 5\,800 \text{ g}$$

L'échantillon global obtenu est donc de **5,8 kg**, ce qui est supérieur à la quantité minimale requise de **4 kg**.

6.3.2. Cas des ingrédients ou aliments emballés

Si l'ingrédient ou l'aliment est emballé, les échantillons élémentaires sont prélevés dans des emballages sélectionnés selon un plan d'échantillonnage approprié, à l'aide d'outils adaptés tels que des sondes d'échantillonnage.

Pour assurer l'échantillonnage d'un ingrédient ou d'un aliment emballé, les conditions suivantes doivent être respectées :

1. Le personnel nécessaire au déplacement des emballages doit être disponible, au besoin.
2. Tous les emballages constituant le lot doivent être accessibles.
3. Tous les emballages du lot doivent contenir le même produit, avoir le poids et porter la même identification.
4. Tous les emballages doivent être étiquetés ou marqués d'un numéro de lot ou d'identification identique.

6.3.2.1. Nombre d'unités à échantillonner

Le nombre d'unités (sachets, sacs, boîtes, barils, etc.) dans lesquelles des échantillons élémentaires doivent être prélevés est présenté dans le tableau suivant (**Tableau 6**) :

Tableau 6 : Nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever en fonction de la taille du lot d'ingrédients ou d'aliments emballés.

Taille du lot	Nombre minimal d'échantillons élémentaires
De 1 à 20 unités	Un échantillon prélevé dans toutes les unités.
De 21 à 1000 unités	Un échantillon prélevé dans 6% des unités du lot, mais au minimum 20 échantillons prélevés au hasard parmi toutes les unités.
> 1000 unités	Un échantillon prélevé dans 3% des unités du lot, mais au minimum 60 échantillons prélevés au hasard parmi toutes les unités.

7. Méthodes de prélèvement

Il est important que le laboratoire d'analyse microbiologique reçoive un échantillon réellement représentatif du lot de produit, qui n'ait subi aucune altération ni contamination lors du transport ou du stockage.

De manière générale, la taille de l'échantillon d'un produit de même nature, réparti en portions unitaires, doit être d'au moins cinq unités. Pour les conserves, elle est également fixée à cinq unités. Le laboratoire doit disposer d'environ 500 g de produit, soit cinq fois 100 g, ces 100 g pouvant être obtenus à partir d'une ou plusieurs pièces. Lorsque le prélèvement de cinq unités s'avère trop élevé par rapport au volume de production, les prélèvements peuvent être répartis dans le temps. Les opérations de prélèvements doivent respecter les principes d'**asepsie** et de **représentativité**.

Le prélèvement peut être effectué sur des éléments indivisibles (boîtes de conserve, bouteilles, produits de petite taille, etc.), sur des produits en vrac ou sur une partie d'un produit de grande taille. Le premier cas est le plus simple, surtout lorsque les produits sont emballés et prélevés en fin de chaîne de fabrication. Ils sont alors recueillis en l'état, sans autre précaution que de bien les identifier.

Dans le deuxième cas, et parfois dans le premier lorsque l'aliment n'est pas protégé contre les contaminations microbiennes, des précautions particulières doivent être prises.

7.1. Exigences générales relatives aux opérations de prélèvement

Les conditions essentielles à respecter lors du prélèvement sont le respect des règles d'asepsie et l'absence de modification des flores présentes dans le produit. Dans la mesure du possible, les échantillons destinés à analyser doivent être acheminés au laboratoire dans leur conditionnement d'origine afin d'éviter toute contamination.

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

Il est nécessaire d'utiliser des flacons propres, secs, étanches, à col large, stérilisés au four de Pasteur (160 °C pendant 1 h à 2 h), par autoclavage (121 °C pendant 15 à 20 min) ou à usage unique et stériles. Leur capacité doit être adaptée au volume de l'échantillon à prélever.

Les récipients peuvent être en verre, en métal ou en matière plastique (polyéthylène, polycarbonate ou polypropylène). Dans ce dernier cas, il s'agit de récipients à usage unique dont la stérilisation est obtenue à froid par irradiation. Dans tous les cas, les récipients de prélèvement doivent être munis d'un système de fermeture hermétique.

Le prélèvement d'un produit non emballé doit être effectué dans la zone de stérilité créée par un bec Bunsen ou par tout autre dispositif équivalent.

7.1.1. Quantité

La quantité à prélever dépend de la nature de l'analyse et du plan d'échantillonnage, en particulier de la valeur n , qui est généralement égale à 5.

On prélève généralement cinq échantillons, correspondant soit à cinq unités, soit à cinq prises de 25 à 100 g pour les produits en vrac.

- Dans le cas de pièces unitaires de petite taille, un échantillon peut être constitué de plusieurs pièces.
- Dans le cas d'une production de faible volume, le prélèvement des cinq échantillons peut être réparti dans le temps.

7.1.2. Homogénéité

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

Dans certains cas, il pourra être nécessaire d'effectuer plusieurs prélèvements à différents endroits de l'aliment ou de la matière alimentaire. Cette méthode peut être intéressante sur le plan industriel pour connaître la localisation et l'activité des différentes flores, mais aussi sur le plan de l'analyse de la qualité pour mettre en évidence les 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 avant de prélever ou d'effectuer un prélèvement composite. Un brassage du produit sera effectué, lorsque cela est possible, avant le prélèvement.

7.1.3. Précautions d'asepsie (stérilisation)

Il est indispensable qu'aucune contamination extérieure ne vienne altérer 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 (dans un four Pasteur ou un autoclave) et protégés dans un emballage stérile, ou stérilisés sur place. Les récipients en plastique peuvent être stérilisés à froid par irradiation.

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

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

7.2. Méthodes générales

Les techniques utilisées sont très variées en fonction du **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 d'étudier la flore présente sur les surfaces d'un aliment, le matériel de fabrication ou de stockage, les récipients et emballages, les plans de travail, les murs et les sols des locaux, ainsi que les mains du personnel.

7.2.1.1. Écouvillonnage

Cette méthode présente l'avantage de permettre des prélèvements dans des endroits difficiles d'accès, ainsi que sur des surfaces planes.

Un écouvillon en coton hydrophile (**Figure 7**) est placé dans un tube à essai et stérilisé. Au moment du prélèvement, l'extrémité de l'écouvillon est immergée dans une solution stérile de Ringer au 1/4 ou dans un bouillon tryptone-sel additionné de 0,05 % de Tween 80. Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface du produit, puis l'écouvillon est immergé dans 10 ml de Ringer au 1/4, 10 ml de bouillon tryptone-sel ou d'eau physiologique additionnée de 1 % d'hexamétaphosphate de sodium (Calgon). Toutes ces opérations doivent être effectuées dans les meilleures conditions d'asepsie. L'analyse est réalisée à partir de la suspension ainsi obtenue.

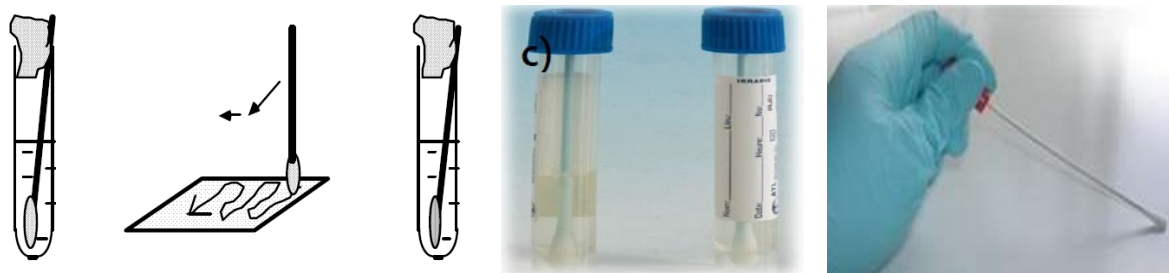


Figure 7. Écouvillons.

7.2.1.2. Rinçage

Cette méthode est applicable aux récipients et aux 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 les tuyauteries ont été traités à l'eau chlorée, il est nécessaire de neutraliser les résidus éventuels d'antiseptiques en ajoutant 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 d'un ruban adhésif.

➤ **Impression directe sur milieu gélosé :** cette méthode nécessite l'emploi de boîtes de Pétri (**a**), (ou lames d'immersion (**b et d**)), dont le couvercle est plus haut que la partie destinée à contenir la gélose. Cette partie est collée sur un disque ou un anneau en plastique dont le diamètre est supérieur à celui de la boîte, de façon à ce que le couvercle repose sur lui (**Figure 8**).

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

Au moment de l'utilisation, la boîte est ouverte et appliquée avec précaution sur la surface à étudier.

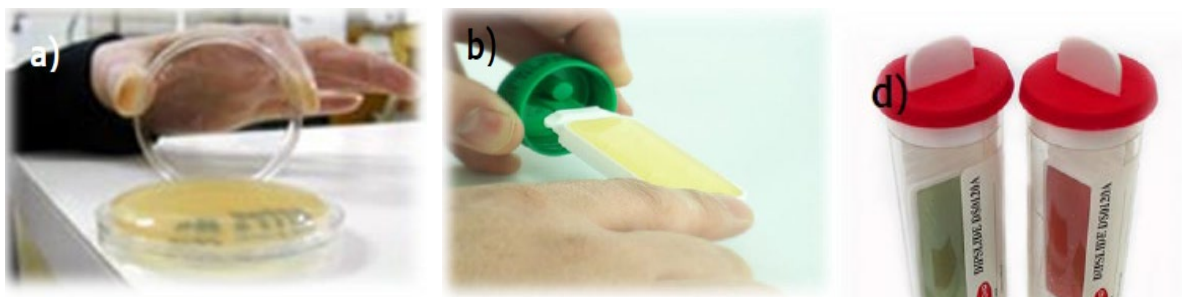


Figure 8. Méthode des empreintes sur gélose : (a) boîtes de contact, (b) et (d) lames d'immersion.

➤ **Emploi de ruban adhésif :** un ruban adhésif est stérilisé par rayonnement ultraviolet (10 minutes d'exposition à 20 cm d'une lampe germicide UV sont généralement suffisantes) dans une boîte de Pétri ouverte.

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

Cette méthode est pratique pour les surfaces planes ou rugueuses, ainsi que pour le contrôle de la contamination des mains.

7.2.1.4. Coulage de milieu gélosé

Cette méthode permet d'examiner des bouteilles vides. Le milieu gélosé en surfusion (à 45°C) est introduit dans le récipient, puis réparti uniformément par rotation de ce dernier selon un axe horizontal, sous un courant d'eau froide. Après solidification, le flacon est mis à incubé. Cette méthode est intéressante d'un point de vue quantitatif.

7.2.1.5. Méthode du cylindre

Un cylindre creux de section connue est appliqué sur la surface à analyser, puis quelques ml de diluant stérile y sont introduits. Après quelques secondes de contact, le diluant est retiré et analysé.

7.2.2. Prélèvements pour le contrôle de l'air

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

- par exposition dans les salles de boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé et que l'on ouvre, en particulier aux endroits permettant l'entrée d'air ou exposés aux courants d'air ;
- par utilisation d'une fiole à vide contenant un milieu de culture liquide et fermée par un bouchon muni d'un tube de communication avec l'extérieur, ce tube plongeant dans le milieu. Un certain volume d'air est alors 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 dans une boîte de Pétri.

7.2.3. Prélèvement des produits liquides

La technique varie en fonction de la nature du produit, du volume à prélever et de la forme du récipient.

Les précautions et méthodes générales sont les suivantes :

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

Selon le volume du produit à prélever, on utilise une pipette, une seringue, une louche ou un flacon lesté. Le prélèvement est effectué dans des conditions d'asepsie optimales : les instruments et flacons de prélèvement doivent être stériles et le contenant ne doit jamais être rempli à pleine capacité, mais aux trois quarts du volume.

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

Lorsque le liquide est prélevé à partir d'un réseau, il convient de purger le circuit afin d'éliminer le liquide des zones de stagnation. Cette précaution n'est pas nécessaire si l'on souhaite 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 liquides en vrac se fait à l'aide d'un échantillonneur de fond ou à soupape (**Figure 9**).

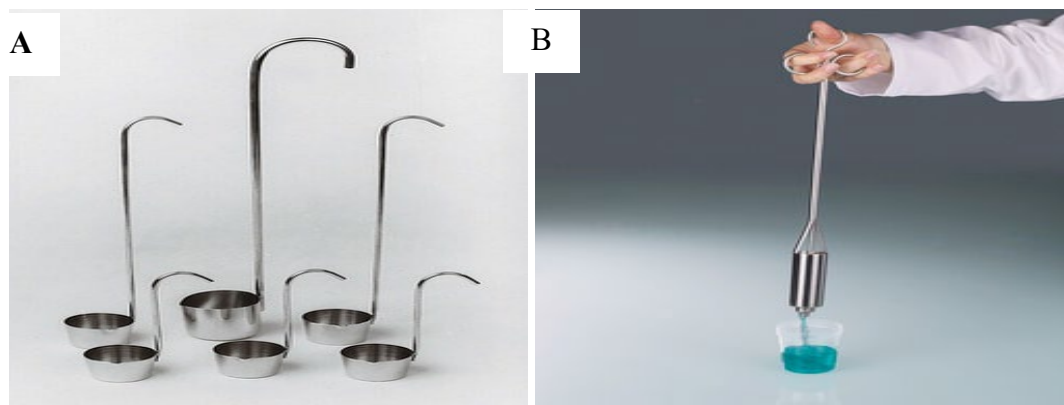


Figure 9. Échantillonneur de fond (A) ou à soupape (B).

Pour les citernes (fixes, wagons, camions ou navires), l'échantillonnage se fait sur un produit homogène à différents niveaux. À partir de l'échantillon global, on obtient l'échantillon de laboratoire. Si le produit n'est pas homogène, il faut réaliser des prélèvements séparés par intervalles de temps, de haut en bas. Dans le cas des citernes de navires, l'échantillonnage s'effectue en cours de transvasement, par des prises fréquentes à intervalles réguliers.

Remarque : l'échantillonnage doit être effectué aseptiquement, avec des mains préalablement désinfectées ou des gants stériles à usage unique, en utilisant des récipients propres et stériles ou des sachets stériles.

7.2.4. Prélèvement de produits solides

Selon la nature du produit, les prélèvements sont effectués au scalpel, à la sonde (pour les fromages et les produits mous), à la pipette harpon ou au myectome (**Figure 10**). La surface est souvent éliminée avant de procéder au prélèvement. Ces deux derniers appareils sont constitués d'un cylindre en verre ou en métal qui pénètre aisément dans la matière, et qui est parfois muni d'un piston servant à refouler le prélèvement. Ces instruments sont stérilisés avec soin avant utilisation. Si le produit est hétérogène (plats cuisinés, conserves, etc.), il faut s'assurer de la représentativité du prélèvement.

L'échantillonnage des ingrédients ou aliments solides en vrac peut être illustré par l'exemple des grains, généralement prélevés à l'aide d'une pelle à main adaptée. Ce dispositif est composé d'une coupelle fixée au bout d'un manche de 50 à 100 cm. La capacité de la coupelle doit être comprise entre 50 et 200 grammes. Trois types de pelles à main sont disponibles selon le cas pour échantillonner un ingrédient ou un aliment en vrac (**Figure 10**).

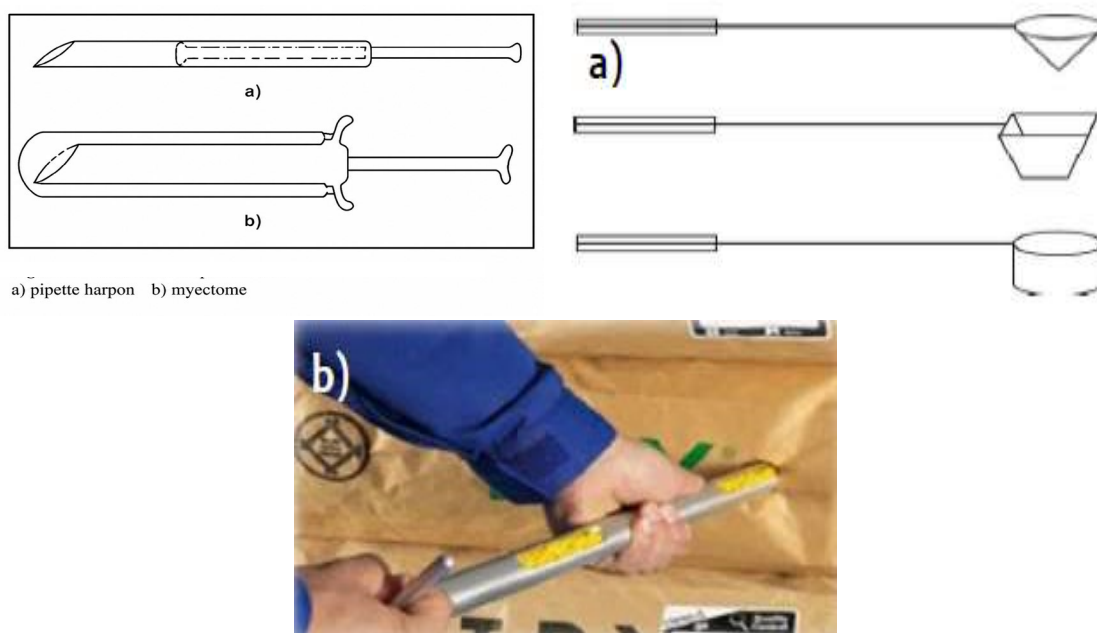


Figure 10. Instruments utilisés pour le prélèvement des produits solides : grandes pelle (a), et pelle à main (b).

L'échantillonnage d'ingrédients ou d'aliments emballés s'effectue à l'aide d'une sonde spécialement conçue à cet effet. Deux sondes sont disponibles selon le cas pour échantillonner un ingrédient ou un aliment emballé :

1. La sonde à double tube, qui peut être utilisée à l'horizontale ou à la verticale. Ce type de sonde présente toutefois un risque de contamination plus élevé. Il faut veiller à ce que l'ensemble des ouvertures des tubes intérieurs et extérieurs soit propre et qu'aucune particule ne se loge entre les tubes. La totalité du contenu du tube interne constitue un échantillon primaire. Lorsqu'elle est utilisée à l'horizontale, la sonde doit atteindre le côté opposé de l'emballage. Lorsqu'elle est utilisée à la verticale, la sonde doit être suffisamment longue pour atteindre le fond de l'emballage (**Figure 11**).



Figure 11. Sonde cylindrique à double tube.

2. La sonde Nobbe ne peut être utilisée qu'à l'horizontale. Ce type de sonde présente peu de risques de contamination. Elle doit pouvoir atteindre le centre de l'emballage et ne peut être utilisée que dans les emballages dans lesquels elle peut être plongée (**Figure 12**).



Figure 12. Sonde Nobbe (sonde cylindrique).

❖ **Le prélèvement en bateau :** se fait pendant l'opération de déchargement, en plusieurs endroits et à des intervalles de temps déterminés. À partir de l'échantillon global, on réalise ensuite l'échantillon de laboratoire.

❖ **Le prélèvement dans les citernes (wagons ou camions)** s'effectue sur toute la hauteur de la couche à l'aide d'une sonde cylindrique, à des endroits de prélèvement situés au centre et à environ 50 cm des parois (5, 8 ou 11 points de prélèvement).

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

Pour étudier la flore de surface, cette précaution n'est évidemment pas nécessaire et le prélèvement est effectué en conséquence. Il est alors possible d'utiliser la méthode d'écouvillonnage.

7.2.5. Produits non homogènes (hétérogènes)

Certains produits présentent une structure hétérogène, à la fois solide et liquide (plats cuisinés, conserves, etc.).

Dans ce cas, le prélèvement doit être effectué de manière proportionnelle en prélevant une fraction de chaque constituant du produit. L'ensemble des fractions prélevées est ensuite homogénéisé au laboratoire afin d'obtenir un échantillon représentatif avant l'analyse.

8. Conditions générales de prélèvement

8.1. Conditions de transport (conditionnement et envoi des échantillons)

Chaque échantillon doit être placé dans un récipient propre constitué d'un matériau inerte offrant une protection adéquate contre les risques de contamination et de détérioration pendant le transport. Toutes les précautions nécessaires doivent être prises pour éviter toute modification de la composition de l'échantillon pendant son transport ou son stockage.

Il convient de privilégier les moyens de transport permettant d'acheminer les échantillons dans les meilleurs délais. Une attention particulière doit être accordée au respect des températures de conservation.

- ✓ les produits frais sont conservés entre 0 °C et 4 °C ;
- ✓ les produits congelés sont conservés à une température inférieure ou égale à -18 °C ;
- ✓ les produits pasteurisés et assimilés sont conservés entre 0 °C et +4 °C.

8.2. Matériel de prélèvement

Les matériaux constituant les outils et équipements d'échantillonnage ne doivent en aucun cas être susceptibles de contaminer les ingrédients ou les denrées alimentaires à prélever. Les équipements réutilisables doivent être conçus de manière à faciliter leur nettoyage et leur désinfection afin d'éviter toute contamination croisée. Avant chaque utilisation, tout matériel réutilisable doit être nettoyé et désinfecté avec soin.

Avant le départ, le préleveur doit s'assurer que son matériel est disponible et en bon état.

- une sonde spécialement destinée au prélèvement ;
- un désinfectant alimentaire et une solution d'éthanol à 70 % ;
- un désinfectant pour les mains et des essuie-mains à usage unique ;
- un chalumeau à gaz avec ses recharges ;
- une enceinte isotherme de transport munie de blocs réfrigérants pour acheminer les échantillons vers le laboratoire.

8.3. Fermeture et étiquetage des échantillons

Chaque échantillon officiel doit être scellé sur le lieu de prélèvement, puis identifié conformément aux prescriptions en vigueur.

Un procès-verbal d'échantillonnage doit être établi pour chaque prélèvement. Ce document doit permettre d'identifier sans ambiguïté le lot échantillonné et doit notamment mentionner la date et le lieu du prélèvement, ainsi que toute information complémentaire susceptible d'être utile à l'interprétation des résultats des analyses.

8.4. Constitution des échantillons identiques

Les échantillons identiques destinés au contrôle, au recours ou à l'arbitrage sont prélevés à partir de l'échantillon global homogénéisé, sauf disposition contraire prévue par la réglementation d'échantillonnage applicable.

8.4.1. Dispositions générales

➤ Personnel chargé du prélèvement des échantillons

- Les prélèvements doivent être effectués par des personnes dûment mandatées à cet effet par l'autorité compétente.
- L'échantillon doit être scellé de manière à empêcher tout accès sans rupture ou retrait du scellé. La marque du scellé doit être clairement visible et identifiable.
- Il peut également être placé dans un récipient dont le système de fermeture rend toute ouverture irréversible afin d'éviter toute réutilisation.

➤ Identification de l'échantillon

- Chaque échantillon doit être muni d'un marquage indélébile et identifié de manière à établir un lien non équivoque avec le rapport d'échantillonnage.
- Deux échantillons finaux au minimum doivent être constitués à partir de chaque échantillon global.

8.4.2. Utilisation de techniques aseptiques

Lors de la collecte d'échantillons à des fins d'analyses microbiologiques, il convient d'éviter d'introduire des micro-organismes dans les échantillons en respectant les procédures d'échantillonnage aseptiques :

- Seul du matériel et des contenants stériles doivent être utilisés ; les outils d'échantillonnage doivent être stérilisés avant chaque prélèvement.
- Tout contact avec le produit ou l'échantillon doit se faire exclusivement au moyen de l'outil de prélèvement ou du contenant approprié ;
- Lorsque la manipulation directe de l'échantillon est nécessaire, il faut porter des gants stériles. Un échantillon prélevé dans des conditions aseptiques ne doit jamais être manipulé à mains nues.
- L'exposition du produit, du matériel de prélèvement et de l'intérieur des contenants à l'environnement doit être réduite au minimum afin de limiter tout risque de contamination. Par exemple, évitez de prélever des échantillons d'air dans des zones où la poussière ou les conditions atmosphériques pourraient les contaminer, à moins que ces contaminations ne fassent partie intégrante de l'échantillon.
- Les opérations de prélèvement doivent être réalisées rapidement. Les contenants stériles ne doivent être ouverts que le temps strictement nécessaire à l'introduction de l'échantillon, puis immédiatement refermés.
- Tout contact inutile doit être évité. L'échantillon et l'outil de prélèvement ne doivent pas entrer en contact avec l'intérieur, le rebord ou le couvercle du contenant stérile.

8.4.3. Prélèvement d'échantillons d'aliments et d'ingrédients

Lors de la collecte d'échantillons :

- les mains doivent être lavées et séchées avant tout prélèvement ;
- les aliments préemballés doivent être prélevés dans leur emballage d'origine intact et scellé ;
- les contenants utilisés pour l'échantillonnage doivent être adaptés à la nature du produit, résister aux manipulations et aux conditions de transport ;
- les contenants doivent être soigneusement fermés pour éviter toute fuite ou contamination pendant les opérations de manipulation et de transport.

Remarque : les contenants ouverts, endommagés ou détériorés ne conviennent pas pour les opérations d'échantillonnage.

9. Traitement de l'échantillon avant contrôle

9.1. Conditions de conservation et de transfert des échantillons au laboratoire

9.1.1. Étiquetage

Lorsque le prélèvement aseptique est réalisé, le produit doit être immédiatement identifié à l'aide d'une étiquette ou d'une référence. Il est préférable d'éviter l'utilisation de crayons feutres sur les films plastiques (PVC), car l'encre peut pénétrer et perturber l'analyse.

L'étiquette doit comporter toutes les informations nécessaires à la bonne exploitation des résultats de l'analyse :

- Indications utiles telles que la température de la salle, la température et le pH d'un aliment voisin ;
- Température initiale et température de transport ;
- Nom de la personne ayant effectué le prélèvement ;
- Numéro d'ordre (numéro de facture) ;
- Date, heure et lieu du prélèvement, ainsi que le lieu et l'heure précis de réception du produit ;
- Modalités particulières du prélèvement (méthode d'échantillonnage, technique de prélèvement, incident éventuel, etc.) ;
- Une description du produit prélevé :
 1. Nom du produit échantillonné ;
 2. Fournisseur ;
 3. Identification de la matière première ;
 4. Propriétés physiques et sensorielles contrôlées lors de la réception ;
- Nom du propriétaire ou du détenteur du produit prélevé ;
- Informations sur le transport :
 - Nom du transporteur ;
 - Identification du véhicule ;
 - Identification de la remorque ;
- Signature du technicien ayant réalisé le prélèvement ;
- Rapport d'échantillonnage.

Les échantillons doivent ensuite être acheminés au laboratoire dans les plus brefs délais, en conservant autant que possible les conditions initiales du produit.

Dès leur réception, les échantillons sont enregistrés au laboratoire avec leur fiche signalétique (nature, date, heure et lieu de prélèvement, nom du préleveur, analyses demandées et autres informations utiles).

En cas de transport, le délai avant analyse doit être réduit au minimum. Il est souvent nécessaire de réfrigérer l'échantillon ; sans le congeler, afin de préserver les germes fragiles qui pourraient disparaître. Toutefois, les produits déshydratés ou en conserve ne doivent pas être réfrigérés.

9.1.2. Stabilité

La composition microbiologique de l'échantillon ne doit pas évoluer entre le moment du prélèvement et celui de l'analyse. Les principaux facteurs affectant la stabilité sont le temps, la température et la protection contre les contaminations.

✓ **Le temps** séparant le prélèvement et l'analyse doit être le plus court possible, tout en maintenant les conditions initiales du produit. Lorsque le laboratoire est situé sur les lieux de prélèvement, l'analyse doit être effectuée dans l'heure qui suit. En cas de transport ou d'expédition, il convient d'utiliser le moyen de transport le plus rapide et prendre des précautions appropriées.

Le délai admissible entre le prélèvement et l'analyse varie en fonction du type d'aliment et des conditions de son transfert (température) ; il est généralement de 24 heures.

✓ Les variations de **température** peuvent modifier la flore : un échauffement peut entraîner une prolifération anormale, tandis qu'une réfrigération excessive ou une congélation peut détruire certains germes fragiles. Idéalement, la température de l'échantillon ne devrait pas varier entre le prélèvement et l'analyse, mais cela est difficile lorsque la température extérieure est élevée et que le transfert au laboratoire est long.

Pour un produit **congelé**, il est essentiel d'éviter toute décongélation pendant le transport. Ils peuvent être conservés jusqu'à un mois avant l'analyse. La congélation entraîne une diminution plus ou moins importante de la charge microbienne. Il convient de s'assurer que la température du produit prélevé est d'au moins -18 °C, de le transporter à cette température, puis de le décongeler à l'air ambiant, à une température d'environ 20 °C, pendant moins de 3 heures, durée suffisante pour obtenir une texture permettant le prélèvement.

Les variations de température sont limitées grâce à l'utilisation d'enceintes isolantes (bacs en polystyrène ou glacières à double paroi).

9.1.3. Milieux de transport

Dans certains cas, il est nécessaire d'utiliser un milieu de culture pendant le transport afin de limiter la mortalité des micro-organismes particulièrement fragiles : il s'agit de milieux faiblement nutritifs permettant de maintenir l'activité métabolique des germes sans favoriser leur multiplication pendant un délai raisonnable.

Exemple : milieux de transport pour *Vibrio*.

9.2. Risques au laboratoire de microbiologie

Il est clair que les risques liés à la manipulation de micro-organismes dont l'identité et le pouvoir pathogène sont souvent inconnus lors des premières étapes de leur analyse doivent être parfaitement maîtrisés par des pratiques et un environnement **conforme** aux exigences de **sécurité microbiologique**.

Le microbiologiste doit toujours être conscient des risques liés à la manipulation de bactéries, et dans une moindre mesure de levures et de moisissures, en particulier après leur amplification nécessaire à leur étude. Rappelons qu'une colonie est constituée d'environ 10^9 à 10^{10} cellules, et qu'une turbidité appréciable d'un milieu de culture liquide correspond à environ 10^8 cellules par ml.

La maîtrise du risque microbiologique passe par une parfaite connaissance :

- des germes manipulés ou recherchés ;
- des voies de **pénétration** de ces germes dans l'organisme.
- des meilleures méthodes de manipulation pour minimiser ce risque.

Les micro-organismes sont classés en quatre groupes en fonction des risques potentiels qu'ils représentent :

- ✓ **Le groupe 1** comprend des micro-organismes peu dangereux pour le microbiologiste et son environnement ;
- ✓ **Le groupe 2** correspond à des germes faisant courir des risques modérés aux manipulateurs et des risques limités à la communauté ;
- ✓ **Le groupe 3** est constitué de micro-organismes à haut risque pour le manipulateur et à risque modéré pour la communauté ;
- ✓ **Le groupe 4** correspond à des micro-organismes très dangereux pour le manipulateur et son environnement.

Les voies d'infection sont essentiellement :

- **Buccale** (ingestion) : pipetage, port à la bouche de doigts ou d'objets contaminés (cigarettes, stylos, aliments, etc.). Ce type de contamination résulte d'un travail « aseptique » incorrect, de projections, de renversements ou d'actions divers non contrôlés
- **Aérienne** (trachée, bronches, poumons) par des aérosols ; Ces aérosols peuvent être générés par des opérations classiques et leur pouvoir de contamination est très élevé.
- Par **contact cutané** (*Brucella*, *Staphylococcus* ou *Pseudomonas*, par exemple) ou au niveau des muqueuses ou des organes, comme les yeux.
- Par **pénétration sous-cutanée** accidentelle (par piqûre ou au niveau d'une plaie).

9.2.1. Techniques générales

La qualité hygiénique dépend surtout de la nature, mais aussi souvent du nombre de micro-organismes présents dans le produit.

Si cette flore est composée de micro-organismes susceptibles d'engendrer des maladies après consommation (maladies infectieuses, toxi-infections ou intoxications), le produit est dangereux et ne doit en aucun cas être commercialisé. Il appartient alors au microbiologiste de détecter les points critiques affectant cette qualité hygiénique, pour laquelle la norme zéro défaut doit être un objectif prioritaire de l'ensemble du système de production.

En bactériologie alimentaire, il n'est donc pas nécessaire de rechercher, de compter et d'identifier systématiquement toutes les bactéries, levures et moisissures présentes dans le produit. Il suffit souvent d'effectuer :

1) Une étude quantitative de la flore microbienne :

- soit par dénombrement d'une flore microbienne donnée caractérisée par un ensemble de propriétés physiologiques communes, comme la numération de *la flore aérobie mésophile revivable* sur un milieu du type gélose nutritive ordinaire, la numération des *levures et moisissures* confondues ou la numération des *anaérobies sulfito-réducteurs*.

La présence de bactéries d'origine fécale ou tellurique dans nos aliments témoigne d'un manque d'hygiène et d'un défaut de rigueur technique, et peut laisser craindre la présence concomitante de bactéries entéro-pathogènes en nombre difficilement détectable ou après un temps d'analyse important.

- soit par dénombrement d'un groupe de bactéries pouvant correspondre à une contamination déterminée : coliformes thermotolérants et/ou streptocoques du groupe D pour la mise en évidence une contamination d'origine fécale, staphylocoques pour la mise en évidence une contamination d'origine cutanée, germes indigènes, germes putrides, etc.

2) une recherche orientée (ciblée) de certaines bactéries pathogènes telles que *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Mycobacterium*, *Listeria*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, etc.... Cette recherche exige l'utilisation de méthodes hautement sélectives spécifiques.

Le plus souvent, ces analyses ne diffèrent d'un produit alimentaire à un autre que par certains détails d'exécution. Parmi les analyses « communes » à tous (ou presque tous) les produits alimentaires, on peut citer, par exemple, les numérations de coliformes ou de la flore totale.

9.3. Préparation de l'échantillon

Les échantillons sont apportés au laboratoire dans leur emballage d'origine s'il s'agit de produits finis, ou dans des flacons ou récipients stériles s'il s'agit de produits en vrac ou de « prélèvements ». Il peut être nécessaire de disposer du matériel adapté pour prélever des aliments contenus dans des emballages solides (poinçons, ouvre-boîtes), ou pour des produits solides (cautérisateurs, pipettes, harpons, etc.).

L'échantillon reçu au laboratoire peut être un produit liquide, solide ou hétérogène placé dans un récipient stérile ou un produit emballé tel qu'il est commercialisé.

En pratique, la plupart des analyses sont réalisées à partir d'une suspension liquide standardisée par rapport au produit initial, c'est-à-dire dont la concentration est connue. La préparation de l'échantillon implique donc l'ouverture aseptique des récipients fermés (produits emballés, bouteilles, conserves), ainsi que l'homogénéisation ou la fluidisation des produits non liquides. Cette étape peut inclure un broyage associé à une première dilution.

9.3.1. Ouverture des récipients et emballages

- **Boîte de conserve métallique ordinaire** : la surface supérieure de la boîte doit être nettoyée à l'aide d'un coton imbibé d'alcool, puis flambée à l'alcool. Il convient d'éviter tout chauffage excessif, notamment dans le cas d'une boîte bombée.

L'ouverture est réalisée dans des conditions d'asepsie, à l'aide d'un poinçon métallique d'un diamètre de 1 à 2 cm ou d'un ouvre-boîte stérilisé à la flamme ou flambé à l'alcool.

Dans le cas d'une boîte bombée, des précautions sont nécessaires en raison du risque de projections violentes. La boîte est placée dans un cristalliseur, puis sa surface stérilisée est recouverte d'un entonnoir stérile à tige courte, obturé par un coton, à travers lequel est introduit un gros clou. La pointe du clou est stérilisée à la flamme avant utilisation.

La perforation est réalisée avec précaution en tapotant sur le clou, qui ne doit pas être retiré afin de permettre l'évacuation des gaz contenus dans la boîte. Une fois l'expulsion des gaz terminée, la boîte est légèrement agitée sans modifier le dispositif afin de dégager l'orifice qui pourrait être obstrué par des fragments solides. Après vérification, l'entonnoir et le clou sont retirés, puis la boîte est ouverte normalement.

Le prélèvement s'effectue, selon le cas, à l'aide d'une pipette Pasteur, d'une pipette harpon, d'une spatule ou d'une sonde.

✓ **Bouteille capsulée** : la bouteille, préalablement agitée, est renversée et sa capsule ainsi que son goulot sont immergés dans de l'alcool, puis flambés. L'ouverture est réalisée dans des conditions aseptiques, soit en perçant la capsule à l'aide d'un scalpel stérile, soit à l'aide d'une pince ou d'un décapsuleur stérile. Le goulot est ensuite flambé avant le prélèvement.

Dans le cas des bouteilles en plastique, le flambage doit être très bref, voire supprimé.

Pour les autres types d'emballages, les précautions d'asepsie doivent être respectées dans tous les cas. Les récipients en verre peuvent être ouverts manuellement, tandis que les emballages en plastique ou en carton doivent être ouverts à l'aide d'un couteau ou de ciseaux stériles. La zone d'ouverture doit être nettoyée, désinfectée, puis flambée si nécessaire.

9.3.2. Homogénéisation et broyage

Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon est homogénéisé (pour les liquides) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile, ce qui constitue la première dilution.

L'homogénéisation permet de répartir les micro-organismes de manière homogène dans l'échantillon. L'analyse d'une partie aliquote du produit homogénéisé doit être représentative de l'ensemble. Pour **les produits liquides ou semi-liquides**, une simple agitation manuelle peut suffire ; la présence de billes de verre permet d'améliorer l'homogénéité.

Pour **les produits visqueux**, il est possible d'utiliser un agitateur mécanique. **Les produits solides** ou hétérogènes nécessitent quant à eux un broyage associé à une dilution.

Broyage des produits solides : différentes techniques peuvent être utilisées :

1) Broyage manuel : il peut être réalisé au mortier ou au Potter, en présence de sable stérile ou de billes de verre ; On utilise un mortier ou un verre à pied contenant entre 5 et 20 g de sable de Fontainebleau ou de billes de verre (diamètre : 0,5 mm).

Un pilon ou un agitateur épais est placé dans le récipient, l'ensemble est ensuite emballé et stérilisé. L'opération est réalisée sous un bec Bunsen afin d'éviter toute contamination.

Après déballage, on ajoute 1 volume de produit et 1,5 volume de diluant, puis on procède au broyage. Pendant l'opération, on ajoute 2 à 5 volumes supplémentaires de diluant. Après un temps de repos de 5 minutes, le surnageant est prélevé. Bien que peu pratique, cette méthode nécessite un matériel simple et est notamment utilisée pour l'étude de produits très fragiles, comme la toxine botulinique.

2) Broyage mécanique

L'appareil utilisé doit permettre un travail aseptique et être stérilisable. Les appareils qui donnent les meilleurs résultats sont les mixeurs, en particulier ceux à couteaux, car ils assurent une bonne dispersion des germes sans les détruire, tout en limitant l'échauffement grâce à l'utilisation de récipients réfrigérés (glace).

- Le broyeur électrique à couteaux de type Virtis est couramment utilisé. Un broyage efficace est réalisé à 45 000 tours par minute pendant une minute. Le broyage s'effectue généralement 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 broyeur de type STOMACHER permet également une dispersion douce de l'échantillon dans le diluant. De plus, il n'est pas nécessaire de stériliser les récipients entre deux utilisations, comme c'est le cas avec un broyeur de type Virtis. En effet, le Stomacher utilise des sacs plastiques stériles à usage unique. La quantité d'échantillon prélevée est généralement de 1 g (ou 25 g) pour 90 mL (ou 250 mL) de diluant (**Figure 13**).

Pour les produits **très durs** (grains, farines, tourteaux, granulés, etc.), il faut utiliser un broyeur à billes de verre ou d'acier.

Le diluant de broyage peut être de l'eau physiologique, une solution de Ringer au $\frac{1}{4}$, de l'eau peptonée ou un milieu tryptone-sel. Les deux derniers milieux permettent de maintenir les micro-organismes en bon état physiologique ou de les réanimer. Toutefois, leur utilisation nécessite des précautions : les dénombrements doivent être réalisés dans l'heure suivant la dilution afin d'éviter la multiplication microbienne et les dilutions doivent être maintenues à température ambiante.

Selon le mode de broyage utilisé, le type d'appareil, ses conditions d'utilisation, le diluant, etc., les résultats de l'analyse peuvent varier.

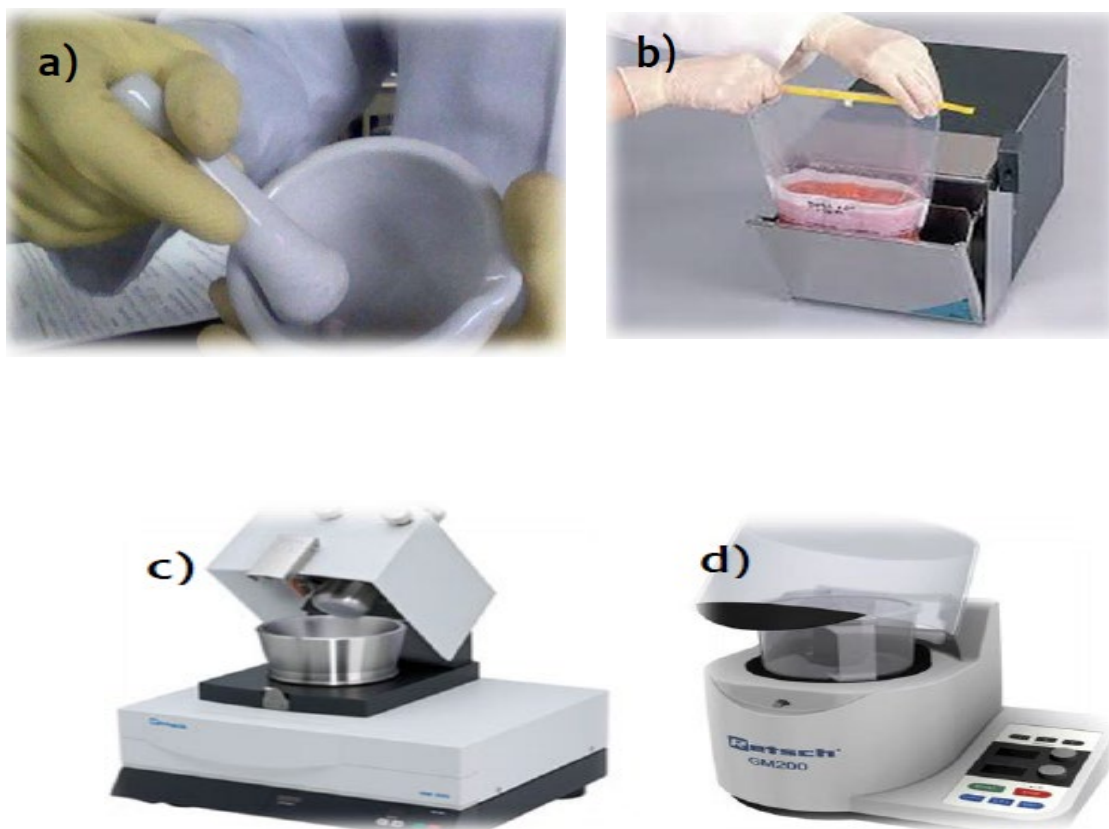


Figure 13. Schéma des divers systèmes de broyage/homogénéisation : (a) broyeur à main (mortier et pilon), (b) broyeur à malaxage mécanique de type stomacher, (c) broyeur électrique de type mortier et pilon, (d) broyeur électrique à couteaux.

9.3.3. Diluants

Au cours de la préparation des échantillons et des dilutions, les micro-organismes peuvent être inhibés ou même altérés, par le changement de milieu engendré par l'ajout du diluant (modification du pH, mais surtout de force ionique). L'effet bactéricide de certains diluants est bien connu : *Staphylococcus aureus* peut être détruit en quelques heures dans de l'eau distillée, de même que la plupart des entérobactéries (*Escherichia coli*). Il en est de même pour *Streptococcus pyogenes* dans du sérum physiologique ou du Ringer au 1/4, ainsi que pour *Escherichia coli* dans une solution saline à 8,5 ‰ (**Tableau 7**).

Actuellement, il est recommandé, sauf indication contraire liée au type d'aliment, de réaliser les préparations et les dilutions des échantillons dans une solution de tryptone-sel. En l'absence d'informations spécifiques, le choix du diluant dépend de la composition du produit à analyser : pour les produits riches en protéines et en minéraux, on peut utiliser une solution de Ringer ou une eau physiologique. Pour les fromages frais, les crèmes fraîches ou les caséinates, on peut également utiliser une solution de phosphate à 2 % à pH 7,4.

Tableau 7. Différents diluants.

La solution tryptone sel	Ringer (solution mère)	Eau physiologique	Eau peptonée tamponnée
Tryptone 1 g	NaCl 9 g	NaCl 9 g	Bacto peptone 20 g
NaCl 8,5 g	KCl 0,42 g	Eau distillée 1000 mL	NaCl 5 g
Eau distillée 1000 mL	CaCl ₂ 0,48 g		Na ₂ HPO ₄ 9 g
pH = 7	NaHCO ₃ 0,2 g		KH ₂ PO ₄ 1,5 g
	Eau distillée 1000 mL		Eau distillée 1000 mL
			pH = 7,2

Tous ces diluants sont stérilisés à 121 °C pendant 20 minutes.

Il convient de noter que les milieux tryptone-sel et l'eau peptonée tamponnée permettent, dans des conditions particulières (température et durée), de revivifier les micro-organismes.

L'eau peptonée tamponnée est notamment utilisée avec certains produits acides à fort pouvoir tampon, comme les yaourts.

9.3.3.1. Techniques de dilution

Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons doivent être préparés en vue d'effectuer un contrôle microbiologique.

Pour l'échantillon liquide, il constitue la solution mère (SM) et, si nécessaire, des dilutions décimales sont réalisées dans un diluant stérile. Ces dilutions sont ensuite utilisées pour la recherche et le dénombrement de micro-organismes selon les méthodes de dénombrement du ou des groupes de micro-organismes à rechercher.

Les échantillons solides doivent quant à eux être broyés dans un diluant stérile à l'aide de broyeurs de laboratoire. L'ensemble formé par l'échantillon et le diluant constitue la dilution mère (DM). Si nécessaire, des dilutions décimales supplémentaires sont ensuite effectuées.

Le titre des dilutions est calculé de la manière suivante : $T = P/V$, où P est le poids et/ou le volume de l'aliment et V est le volume total de l'aliment plus le diluant. Dans les deux cas, plusieurs rapports de dilution sont pratiqués (25 : 225, 10 : 90, 5 : 45, 3 : 27, 1 : 9, 0,5 : 4,5), dont le principe est le rapport 1 : 9, une partie de l'échantillon pour neuf parties de diluant.

9.3.4. Standardisation de la suspension mère

La suspension mère est constituée du produit brut lorsqu'il est liquide, et du produit de broyage dilué dans les autres cas.

Lorsque le produit est liquide, le prélèvement pour la première dilution est effectué à la pipette et les résultats de l'analyse peuvent être facilement rapportés au millilitre de produit brut.

Lorsque le produit n'est pas directement pipetable, qu'il subit une fluidisation ou un broyage, il est possible de procéder de deux façons :

- pesée exacte d'une quantité donnée de produit, par exemple 10 g, dans le récipient de broyage ou dans celui destiné à la première dilution, puis adjonction de la quantité nécessaire de diluant (40 ml pour une dilution au $1/5^e$, 90 mL pour une dilution au $1/10^e$).
- Prélèvement dans le récipient de broyage ou de dilution d'une quantité approximative de produit et pesée de l'ensemble, la tare du récipient étant connue. L'adjonction du diluant s'effectue ensuite en fonction du poids relevé. Cette deuxième méthode est la plus pratique, car elle permet de réaliser le prélèvement rapidement et donc dans les meilleures conditions d'asepsie.

Dans les deux cas, la concentration de la suspension mère est parfaitement définie par rapport à l'aliment brut : **x ml** de suspension correspondent à **y grammes** d'aliment. Les résultats de l'analyse sont d'abord ramenés au **millilitre** de suspension, puis au **gramme** d'aliment.

9.3.5. 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, notamment dans leur phase de latence, qui est augmentée, dans leurs besoins nutritionnels ou encore dans leur sensibilité aux conditions défavorables du milieu (pH, sels biliaires, colorants, sels, etc.).

En général, ces altérations sont réversibles, et une fois disparues, les bactéries récupèrent leurs propriétés initiales, notamment en ce qui concerne leur croissance ou leur pouvoir pathogène. Il est donc nécessaire de faciliter le « rétablissement » des cellules ayant subi des altérations sub-létales, c'est-à-dire leur « réanimation » ou leur revivification, avant de les soumettre à des milieux sélectifs souvent peu favorables à la croissance en raison de la présence d'inhibiteurs. En effet, la présence de cellules endommagées peut entraîner des variations dans les numérations ou donner l'impression qu'il n'y a pas ou peu de germes, et donc pas ou peu de risque pour le consommateur. Ceci est particulièrement important lorsqu'il s'agit de déterminer la présence ou non de micro-organismes pathogène ou indicatrice.

10. Échantillonnage de quelques produits alimentaires

Les laboratoires chargés d'effectuer des contrôles sur les produits alimentaires sont tenus de respecter des consignes précises relatives au prélèvement des échantillons.

La réalisation des prélèvements d'échantillons d'une population donnée est décrite dans les normes spécifiques à chaque aliment. Dans ce cas, la technique de prélèvement est simple (exemple : algues alimentaires), ou bien elle est décrite dans des normes générales concernant les techniques de prélèvement adaptées à une catégorie de produits (exemple viande, conserves, lait, etc.). Les normes précisent le matériel nécessaire au prélèvement, les conditions de stockage et de transport de l'échantillon, ainsi que son étiquetage.

10.1. Méthodes de prélèvement des produits laitiers

10.1.1. Lait entier, partiellement ou totalement écrémé, aromatisé ou fermenté, et crème

Le prélèvement peut être effectué sur une citerne de stockage de lait, sur un bidon de collecte, ou sur un récipient destiné à la vente au détail. Dans ce dernier cas, il s'agit le plus souvent de récipients entiers non ouverts. La méthode est la suivante :

- bien mélanger les liquides en vrac ;
- à l'aide d'un plongeur ou d'un agitateur (**Figure 14**), par agitation mécanique, ou à l'aide d'air comprimé propre, c'est-à-dire filtré ;
- la taille des plongeurs dépend de la taille des récipients contenant les laits en vrac.

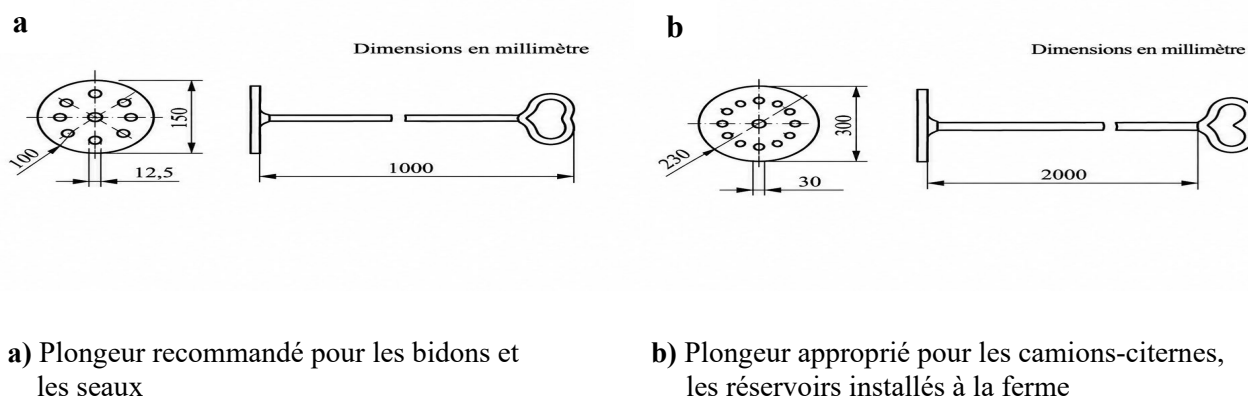


Figure 14. Instruments destinés à l'homogénéisation.

- prélever l'échantillon à l'aide d'une louche ou d'un extracteur, immédiatement après l'homogénéisation ; le volume de l'échantillon ne doit pas être inférieure à 200 mL ;
- l'équipement de prélèvement doit être propre et stérilisé : soit à l'air chaud (170°C pendant 1 heure), soit à la vapeur (121°C pendant 20 minutes à l'autoclave), soit par immersion dans l'eau bouillante (1 minute) ou dans de l'éthanol à 70 % v/v ;
- les récipients destinés à recevoir les prélèvements sont en verre, en matière plastique, ou en métal. Ils sont propres, secs et stériles ;
- La température de stockage doit être atteinte le plus rapidement possible après le prélèvement, et le délai entre le prélèvement et l'analyse doit être le plus bref possible (de préférence inférieur à 24 heures) (**Tableau 8**).

Tableau 8. Conditions de conservation de l'échantillon et quantité minimale.

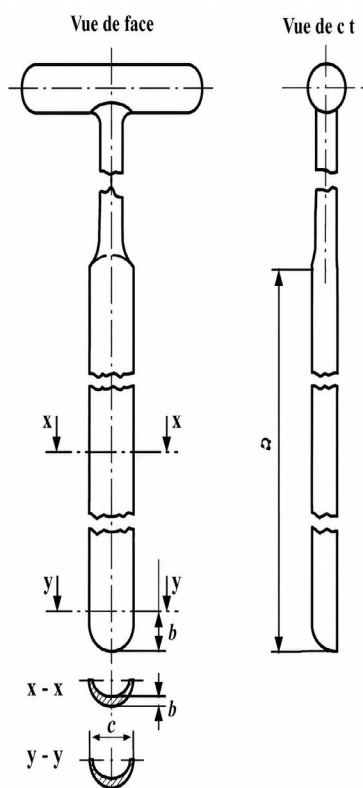
Produit	Température de stockage avant et durant le transport	Quantité minimale de prélèvement élémentaire
Lait non stérilisé	0 à 4 °C	200 mL
Lait stérilisé, UHT en récipients non ouverts	Température ambiante (25 °C au maximum)	200 mL
Glace de consommation et produits congelés à base de lait	- 18 °C	100 ou 200 g
Lait sec	Température ambiante (25 °C au maximum)	100 ou 200 g
Beurre	0 à 4 °C à l'obscurité	100 g ou 250 g ou 2 kg
Fromage	0 à 4 °C	100 ou 200 g

10.1.2. Beurre

La méthode est la suivante :

- prélever à partir du produit en vrac ou à partir d'un emballage contenant au moins 1 kg de produit, après avoir, si nécessaire, maintenu le produit à une température d'environ 8 °C pour qu'il ait atteint une fermeté permettant son prélèvement ;

Dans le cas d'un emballage de moins de 1 kg, c'est l'emballage dans son entier et non ouvert qui constitue l'échantillon ;



- enlever, à l'aide d'une spatule stérilisée, enlever la couche de surface de la zone d'échantillonnage sur une épaisseur ne dépassant pas 5 mm ;
- enfoncer la sonde stérilisée (**Figure 15**), en diagonale dans le produit, sans qu'elle atteigne la surface opposée ; puis faire pivoter la sonde d'un tour complet et la retirer ; elle contient le noyau ;
- verser le noyau dans un récipient stérile pour échantillon.

Figure 15. Sonde à beurre.

10.1.3. Fromage à pâte dure, de mi-dure, ou molle

La méthode est la suivante :

- sauf spécification contraire, l'échantillon doit comprendre la surface du fromage ;
- les échantillons sont prélevés soit à l'aide d'une sonde stérilisée, soit en coupant une portion à l'aide d'un scalpel ou d'un fil à couper stérilisé, ou bien directement dans le fromage entier non ouvert dans son emballage ;

Si l'échantillon est prélevé à l'aide d'une sonde, il faut d'abord enfoncer une première sonde jusqu'à 25 mm de profondeur, retirer un noyau, puis enfoncer une seconde sonde dans le canal ainsi créé, dont le diamètre est inférieur, la faire pivoter et retirer un second noyau.

- transférer ce noyau dans le récipient prévu à cet effet, et recommencer jusqu'à obtention de la quantité nécessaire.
- L'échantillon peut également être réalisé par prélèvement d'un morceau (**Figure 16**).

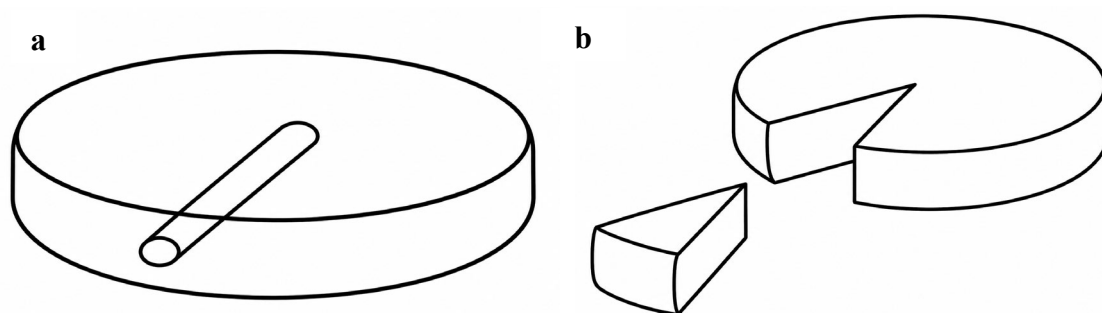


Figure 16. Méthodes d'échantillonnage des fromages : (a). prélèvement à l'aide d'une sonde et (b). prélèvement d'une portion.

10.2. Méthodes de prélèvement de la viande et des produits à base de viande

Les échantillons peuvent appartenir à différentes catégories :

- unités de viande ou de produits à base de viande, préparés ou conditionnés (bocal, barquette sous film plastique) ;
- morceaux de viande prélevés dans une unité de masse inférieure à 2 kg ;
- échantillons prélevés sur des unités de masse supérieure à 2 kg. Ces échantillons peuvent être réfrigérés, congelés ou surgelés, en l'état ou partiellement déshydratés.

L'analyse microbiologique peut avoir pour but la recherche et/ou le dénombrement de la flore de surface, de la flore profonde ou des deux.

Les échantillons doivent être manipulés dans des conditions d'asepsie.

10.2.1. Prélèvement d'un échantillon réfrigéré

- **Prélèvement en profondeur** : il est toujours réalisé après cautérisation de la surface.
- ✓ **Sur une pièce**, après avoir éliminé au couteau une pellicule superficielle de 2 mm d'épaisseur, cautériser la partie superficielle avec une lampe à souder sur une surface d'environ 25 cm². Éliminer la pellicule carbonisée sur une surface en retrait d'un centimètre par rapport à la surface cautérisée. Utiliser un outil approprié (pinces, bistouri, etc.). Effectuer un prélèvement en profondeur et déposer l'échantillon dans le récipient prévu à cet effet.

✓ **Sur une carcasse**, le prélèvement est effectué, sur les muscles pectoraux pour les gros animaux et sur la cuisse pour les petits animaux, après cautérisation de la partie superficielle.

• **Prélèvement superficiel** : il se fait sans cautérisation préalable.

- Appliquer un cadre (**Figure 17**), permettant de délimiter un carré de surface déterminée (exemple : 25 cm²).
- À l'aide d'un bistouri, inciser la viande en suivant le périmètre extérieur de la surface déterminée et dégager un lambeau superficiel de 2 à 3 mm d'épaisseur.
- S'il n'est pas possible d'appliquer un cadre, la surface de prélèvement est délimitée au bistouri.
- Lorsqu'un prélèvement de surface et un prélèvement en profondeur sont pratiqués, il n'y a pas de cautérisation.

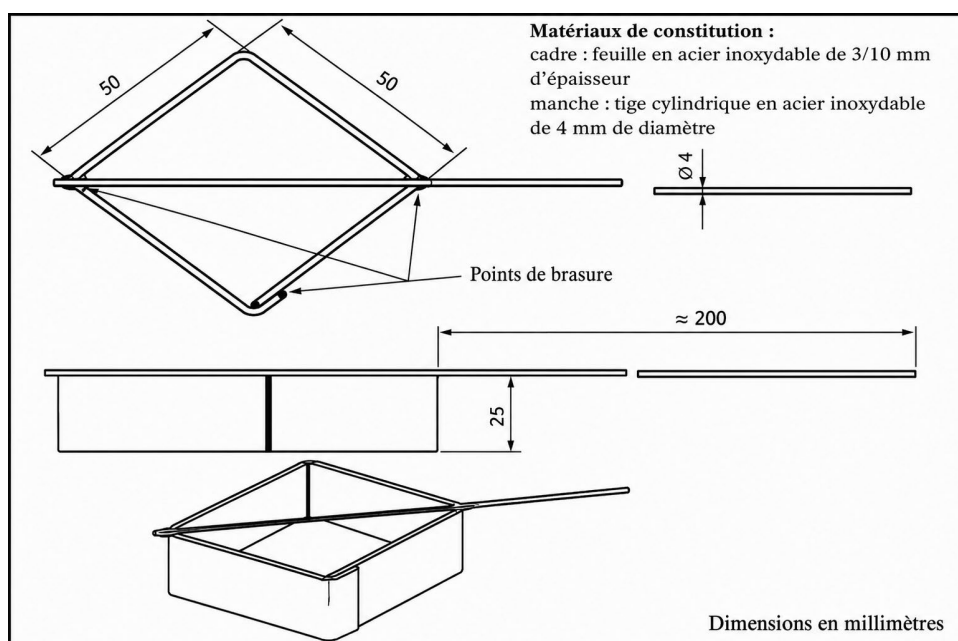


Figure 17. Cadre pour délimiter une zone de prélèvement superficiel.

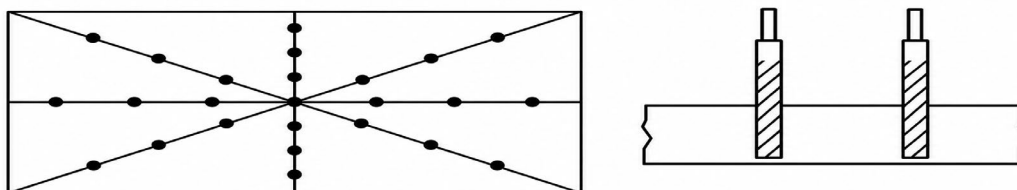
10.2.2. Prélèvement d'un échantillon congelé ou surgelé

• **Prélèvement sans décongélation** : les pièces de volume important sont perforées à plusieurs endroits à l'aide d'une perceuse électrique. Les copeaux obtenus sont recueillis à l'aide d'une spatule, puis placés dans le récipient de prélèvement. Si seul un prélèvement en profondeur est demandé, un lambeau superficiel de 3 mm d'épaisseur est dégagé au ciseau à bois sur une surface d'environ 30 cm² ; la surface dégagée est cautérisée, puis le prélèvement en profondeur s'effectue comme précisé ci-dessus.

Si seul un prélèvement superficiel est demandé, une surface est délimitée et un lambeau superficiel de 3 mm d'épaisseur est dégagé (**Figure 18**). Il n'est pas cautérisé puis prélevé, à l'aide du ciseau à bois.

A. Cas d'un pain non homogène (morceaux comprimés, agglomérés, congelés ou surgelés : masse comprise entre 25 g et 30 kg).

Points de perforation : prélèvement global.



B. Cas d'une pièce homogène

Points et limites des perforations pour un prélèvement en profondeur

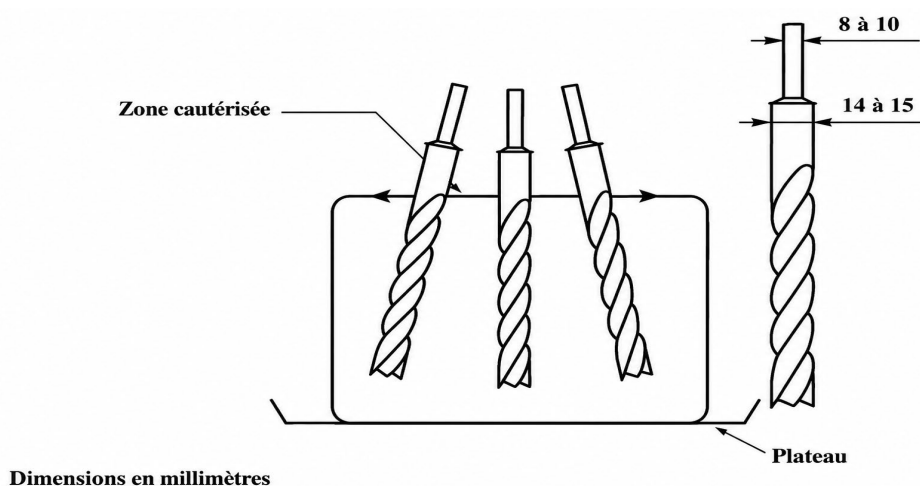


Figure 18. Modalités de prélèvement sur une pièce ou un pain congelé ou surgelé.

- Prélèvement après décongélation : l'échantillon est maintenu dans son conditionnement et amené à une température de 20 à 25 °C afin que le cœur de l'échantillon atteigne une température de -1 °C. Cette élévation de température doit se faire en moins de 2 à 3 heures.

Dans le cas des carcasses de volailles, la décongélation se fait en chambre froide et dure 15 à 16 heures.

Les prélèvements sont ensuite effectués selon les techniques décrites pour un produit réfrigéré.

10.2.3. Homogénéisation : elle est réalisée pour constituer un échantillon homogène et est indispensable pour tout prélèvement de masse supérieure ou égale à 50 g.

Le prélèvement est haché (tête de hachoir stérile) après un éventuel pré-découpage, puis le hachis est recueilli dans un sac en plastique, qui est fermé hermétiquement. Le malaxage est ensuite réalisé à l'aide d'un stomacher.

Pour les prélèvements de masse inférieure à 50 g, le malaxage seul suffit.

10.3. Méthodes de prélèvement aseptique des conserves

Les conserves peuvent se présenter dans différents types d'emballages : boîtes métalliques, bocaux en verre, barquettes, sachets, etc.

La conserve est un produit biologiquement stable sur lequel on peut être amené à effectuer des analyses pour déterminer les causes de défauts de fabrication ou dans le cadre d'enquêtes menées lors de TIAC.

Les analyses doivent être réalisées dans des conditions d'asepsie. Malgré cette précaution, La proportion de contamination exogène (« faux positifs ») est supérieure à 1 % du nombre de prélèvements élémentaires, ce qui est supérieur au pourcentage d'individus non conformes (dans l'échantillon) considéré comme acceptable (généralement < 1 %).

Les analyses menées sur les conserves donnent des résultats « tout ou rien » : un résultat positif indique la présence de micro-organismes, un résultat négatif, leur absence. Tout résultat positif est donc entaché de suspicion.

Il est donc indispensable de réduire au maximum les risques de contamination exogène, que ce soit lors du prélèvement ou lors des analyses.

La verrerie et les outils sont stérilisés et la stérilisation est contrôlée. Une enceinte à écoulement d'air unidirectionnel (hotte à flux laminaire) est préconisée.

10.3.1. Examen préalable

Les caractéristiques de l'individu de l'échantillon figurant sur l'emballage sont notées, de même que son aspect « normal » ou non.

10.3.2. Nettoyage de l'emballage

Le récipient est brossé avec une solution détergente dans le cas de boîtes métalliques ou de bocaux. Les sertis et les joints sont nettoyés avec attention. Le séchage est effectué à l'aide de papier absorbant.

10.3.3. Désinfection de l'emballage : l'opération doit avoir lieu sous la hotte à flux laminaire. À l'aide de cotons hydrophiles, Désinfecter à l'eau de Javel à 1,2° chlorométrique (environ 3,6 g/L de chlore actif), puis, après 10 minutes, renouveler l'opération avec de l'éthanol à 95°. Laisser sécher.

10.3.4. Ouverture de l'emballage

Il faut dans tous les cas faire attention aux risques de projection.

Immédiatement avant l'ouverture, passer un coton hydrophile imbibé d'éthanol à 95° à l'endroit où l'ouverture va être pratiquée.

- S'il s'agit d'une boîte métallique, utiliser le dispositif présenté à la **figure 19** ou travailler sous hotte. Le matériel ayant été stérilisé au préalable, il faut perforer la boîte à l'aide d'un poinçon et d'un marteau à manche métallique, puis, si nécessaire, agrandir l'ouverture à l'aide d'un ouvre-boîte à découpe circulaire.
- S'il s'agit d'un bocal à couvercle en verre avec joint de caoutchouc, ouvrir « normalement ».

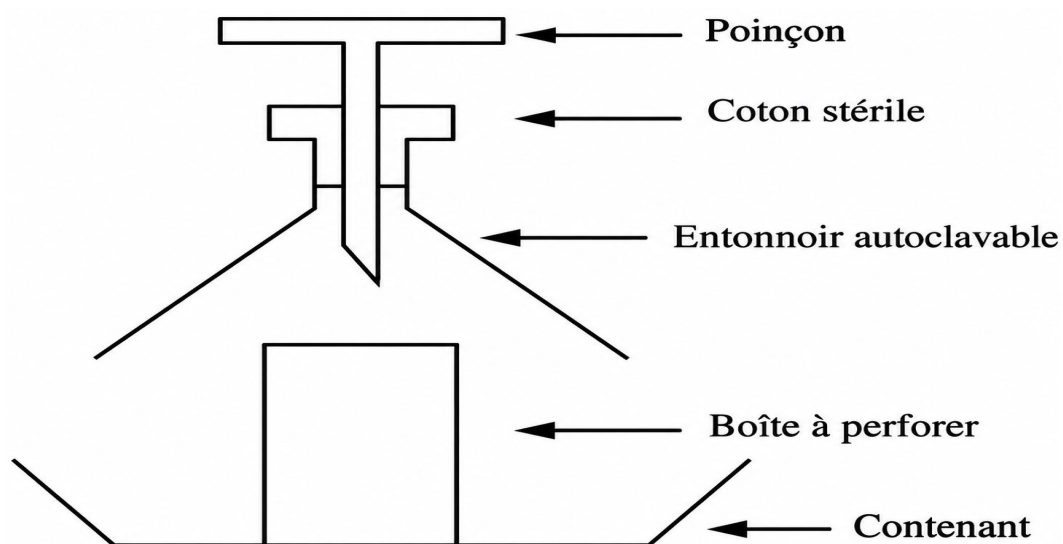


Figure 19. Dispositif pour la perforation des boîtes.

10.3.5. Prélèvement du contenu

Le matériel utilisé dépend de la nature liquide ou solide du produit. Si le produit est mixte (liquide et solide), prélever dans les deux phases. Placer le prélèvement dans un flacon stérile et le conserver à 4 °C jusqu'à l'analyse. Homogénéiser si nécessaire.