



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**MÉTHODE D'EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT DES ALIMENTS
DANS DES CONTENANTS SCELLÉS HERMÉTIQUEMENT**

Alexander Fabricius

Laboratoire des poissons et des aliments
Agence canadienne d'inspection des aliments
Mississauga (Ontario) L5T 2R4

Courriel : fabriciusa@inspection.gc.ca

Patti Wilson

Laboratoire de Dartmouth de l'ACIA
1992 Agency Drive
Dartmouth (Nouvelle-Écosse) B3B 1Y9

Courriel : wilsonpa@inspection.gc.ca

Comité des méthodes microbiologiques

**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE
SANTÉ ET DES ALIMENTS**
Division de l'évaluation de microbiologie
Bureau des dangers microbiens, Direction des
aliments

Localisateur postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Courriel : Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

Dev C. Nundy

Laboratoire des aliments
Division des services de laboratoire
Agence canadienne d'inspection des aliments
Ottawa (Ontario) K1A 0C6

Courriel : dnundy@inspection.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode peut être utilisée pour l'examen microscopique d'aliments avariés au stade initial ou non initial conservés dans des contenants scellés hermétiquement et traités thermiquement, que l'on soupçonne d'être compromis sur le plan microbiologique. L'établissement des caractéristiques morphologiques des organismes est requis afin de déterminer si ces organismes ont une importance ou non pour la santé publique. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-25G, datée d'octobre 1991.

2. PRINCIPE

La méthode décrit des aliments conservés dans des boîtes de conserves ou dans d'autres contenants scellés hermétiquement, qui sont contaminés et suspects sur le plan microbiologique et qui peuvent être utilisés dans la préparation de frottis colorés simples ou de montages humides, leur examen microscopique et l'enregistrement des résultats.

NOTE : Si l'analyste utilise des variantes des techniques de coloration énumérées ci-dessous (c'est-à-dire un produit offert sur le marché ou une méthode improvisée), il incombe à l'analyste ou au superviseur de laboratoire d'en assurer l'équivalence.

3. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 2 pour les définitions non comprises dans la présente section.

- 3.1 Contenants scellés hermétiquement : Il s'agit de contenants conçus pour protéger le produit alimentaire contre l'entrée d'air et de micro-organismes. Ces contenants peuvent être : 1) rigides, comme des bouteilles en verre ou des boîtes en métal de deux ou de trois pièces; 2) semi-rigides, comme des plats de service jetables utilisés pour conserver certains repas prêts à servir, et 3) souples, comme des sachets stérilisables.
- 3.2 Produits semi-liquides : Ces produits peuvent être difficiles à verser, mais peuvent être mélangés en agitant le contenant.
- 3.3 Produits semi-solides : Il s'agit de produits à viscosité élevée. Ils sont très difficiles à verser et ne peuvent être mélangés en agitant le contenant fermé.
- 3.4 Aliments acides et acidifiés : Les aliments dont le pH est égal ou inférieur à 4,6.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

- 4.1 Voir l'annexe B du volume 2 et suivre les instructions, s'il y a lieu. Selon la circonstance (type de contenant, type d'aliment et nombre d'échantillons requis pour un examen microscopique), les contenants peuvent être examinés individuellement.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

- 1) Tout matériel et équipement spécial nécessaire à l'analyse aseptique d'aliments conservés dans des contenants scellés hermétiquement, tel que répertorié dans la procédure MFHPB-01
- 2) Anses d'échantillonnage bactériologique stériles, écouvillons, pipettes de transfert et autres ustensiles nécessaires au prélèvement d'échantillons de frottis
- 3) Microscope optique avec un objectif à immersion d'huile de 100X
- 4) Colorants microbiologiques, comme des solutions à base d'éthanol au cristal violet ou au bleu de méthylène
- 5) Xylol
- 6) Lames de microscope propres et lamelles couvre-objet
- 7) Solution 0,05 N d'hydroxyde de sodium (NaOH)

6. MESURES DE SÉCURITÉ

MANIPULER TOUS LES CONTENANTS BOMBÉS COMME S'ILS CONTENAIENT DU *CLOSTRIDIUM*

BOTULINUM ET(OU) SES TOXINES JUSQU'À CE QUE LEUR ABSENCE AIT ÉTÉ ÉTABLIE.

NE JAMAIS GOÛTER LA NOURRITURE D'UNE BOÎTE QUI FAIT L'OBJET D'UNE ENQUÊTE. TOUJOURS SE SERVIR DE PIPETTES MÉCANIQUES.

LES CONTENANTS BOMBÉS, TOUT PARTICULIÈREMENT LORSQU'IL S'AGIT D'UN BOMBEMENT DE TYPE PERMANENT, PEUVENT LAISSER JAILLIR LEUR CONTENU LORSQU'ILS SONT PERFORÉS. IL CONVIENT DONC D'UTILISER LES TECHNIQUES DE MANIPULATION APPROPRIÉES AFIN D'ÉVITER TOUTE CONTAMINATION DU MILIEU ENVIRONNANT. IL EST RECOMMANDÉ DE MANIPULER LES CONTENANTS BOMBÉS DANS UNE ENCEINTE DE BIOSÉCURITÉ DE CLASSE II QUI PROTÈGE L'OPÉRATEUR ET LE PRODUIT.

NE JAMAIS CHAUFFER DES BOMBEMENTS DE TYPE PERMANENT, CAR LA CHALEUR ABSORBÉE PEUT CAUSER L'ÉCLATEMENT DU CONTENANT.

LES COLORANTS ET LES SOLVANTS PEUVENT ÊTRE NOCIFS. CONSULTER LES FICHES SIGNALÉTIQUES ET UTILISER L'ÉQUIPEMENT DE PROTECTION INDIVIDUELLE AU BESOIN.

7. MARCHE À SUIVRE

7.1 Manipulation et préparation des échantillons

7.1.1 Suivre la procédure MFHP-01, pour l'identification du contenant, l'enlèvement et l'identification de l'étiquette, l'ouverture aseptique du contenant et le mélange du contenu (le cas échéant).

7.2. Préparation d'un frottis sec

Lorsque cela est possible, essayer d'inclure quelques particules solides dans l'échantillon. Étaler l'échantillon de manière égale sur une couche mince à la surface de la lame. La surface du frottis doit être d'environ 2 x 3 cm. Écraser les morceaux solides avec l'anse durant le frottis, car les frottis trop épais peuvent empêcher une pénétration adéquate de la lumière pendant l'examen microscopique. Sécher à l'air. Fixer ensuite le frottis en passant doucement la lame plusieurs fois dans la flamme d'un brûleur. Éviter de surchauffer, car cela pourrait produire des déformations cellulaires et(ou) briser la lame.

7.2.1 Aliments liquides ou semi-liquides

Bien mélanger le contenu. À l'aide d'une anse d'échantillonnage bactériologique stérile, prélever un échantillon du contenu et le transférer sur une lame de verre propre pour microscope. Étaler pour former un mince film.

7.2.2 Aliments solides et semi-solides

On peut trouver des micro-organismes dans des produits solides et semi-solides. On les retrouvera plus probablement au centre du produit, s'il n'a pas été suffisamment traité, ou près des joints ou du couvercle si le contenant a fui.

En tenant compte de ce qui précède et en utilisant un outil stérile approprié, gratter la surface extérieure du produit, plus particulièrement la surface à proximité des joints, et(ou) prélever de manière aseptique un échantillon de frottis de l'intérieur du produit, plus particulièrement à proximité du centre. Une goutte d'eau distillée peut être requise pour

permettre une distribution du matériau à la surface de la lame pour former un mince film.

7.2.3 Aliments à forte teneur lipidique ou aliments préparés dans l'huile

Les aliments mis en boîte dans de l'huile ou ayant une teneur élevée en gras sont difficiles à colorer. Les frottis de tels aliments doivent être soigneusement égouttés si possible et(ou) dégraissés en immergeant les lames fixées à la chaleur dans du xylol pendant une à deux minutes. Retirer et laisser sécher avant de fixer.

7.3 Coloration d'un frottis sec

Lorsqu'un examen de frottis pour déterminer le type morphologique et la concentration cellulaire est requis, une coloration simple (à l'aide d'un seul colorant comme du cristal violet ou du bleu de méthylène (Loeffler)) appliquée à un frottis fixé et sec est adéquate. Une coloration de Gram n'est pas recommandée pour des frottis directs, car la présence de vieilles cellules ou de cellules agressées et une surdécoloration peuvent mener à des réactions de Gram erronées.

7.3.1 Colorations simples

Cristal violet - Appliquer une solution de cristal violet au frottis fixé; laisser reposer dix secondes; rincer doucement avec de l'eau distillée ou de robinet et assécher à l'aide d'un papier buvard.

Bleu de méthylène - Suivre les directives données pour le cristal violet, sauf qu'il faut laisser le colorant sur la lame pendant 30 secondes.

7.3.2 Frottis préparés à partir d'aliments emballés dans des sirops ou de la saumure

Après la coloration, éliminer l'excès de colorant en trempant la lame doucement dans un béccher d'eau distillée. Ne pas maintenir la lame sous un jet d'eau courante. Laisser sécher à l'air. Ne pas sécher à l'aide d'un papier buvard.

7.3.3 Aliments acides

L'acidité peut parfois mener à une précipitation excessive du colorant sur la lame, ce qui rend le frottis difficile à examiner. On peut éviter ce problème en neutralisant l'acidité de la manière suivante : ajouter une anse de l'échantillon à une lame de verre propre et mélanger avec une goutte de NaOH 0,05 N. (Par exemple, si une goutte de NaOH 0,05 N est ajoutée à une anse (10 µl) d'un aliment ayant un pH de 3,5, on obtiendra un pH d'environ 7,00). Suivre la procédure MFHPB-03 pour mesurer le pH des aliments.

7.4 **Examen des frottis colorés**

Examiner les frottis colorés à l'aide d'un microscope avec un objectif à immersion d'huile de 100X. Au moins la moitié d'un frottis doit être balayée pour localiser les surfaces qui présentent les meilleures concentrations de cellules identifiables et la meilleure variété de types morphologiques. Au moins cinq de ces champs doivent être examinés. Compter séparément les différents types morphologiques identifiés dans chaque champ.

7.5 **Enregistrement des résultats**

L'annexe A de la présente procédure présente un tableau qui peut être utilisé pour enregistrer les résultats.

7.5.1 Noter les types morphologiques généraux des bactéries et déterminer le nombre

approximatif de ces types présents dans les cinq champs. Consigner dans le tableau le compte moyen par champ pour chaque type morphologique de bactérie.

- 7.5.2 Si aucune cellule n'est présente lors du balayage de la lame, indiquer qu'aucune cellule n'a été détectée.

8. BIBLIOGRAPHIE

- 8.1 American Public Health Association (APHA). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4^e éd., F.P. Downes et K. Ito (éditeurs), American Public Health Association, Washington, D.C., 2001.
- 8.2 American Public Health Association (APHA). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, ch. 6, 16^e éd., American Public Health Association, Washington, D.C. 1992.
- 8.3 W. L. Landry, A. H. Schwab et G. A. Lancette. « Examination of Canned Foods » dans *Bacteriological Analytical Manual*, 8^e éd., rév. A, 1998, ch. 21A, publié par l'AOAC International, Gaithersburg, MD., 1995.
Site Web : <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
- 8.4 National Food Processors Association. *Laboratory Manual for Food Canners and Processors*, vol. 1, National Food Processors Association, AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut, 1980.

