



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

**ÉCHANTILLONNAGE ENVIRONNEMENTAL
POUR LA DÉTECTION DES MICROORGANISMES**

1.0 DESCRIPTION

Cette méthode s'applique au prélèvement d'échantillons dans les établissements de transformation des aliments effectué dans le cadre des activités d'application de la loi relatives à l'article 7 de la Loi sur les aliments et drogues. L'échantillonnage porte, sans s'y limiter, sur le matériel et sur les surfaces qui entrent en contact avec les aliments. La présente directive décrit les méthodes à utiliser pour prélever et manipuler les échantillons prélevés dans l'environnement d'une usine et destinés aux évaluations microbiologiques.

2.0 PRINCIPE

La présence d'organismes pathogènes ou d'un grand nombre de bactéries dans les établissements de transformation des aliments peut être l'indice de mauvaises conditions d'hygiène ou de foyers de croissance microbienne. Cette méthode sert à estimer le nombre ou à établir la présence de microorganismes viables prélevés sur une surface échantillonnée. Les échantillons prélevés sont inoculés dans ou sur un milieu sélectif dont le type dépend du ou des microorganismes recherchés. On suppose que chaque microorganisme viable se multipliera dans les conditions d'incubation précises du milieu en question et donnera lieu à une croissance visible pouvant être mesurée, dénombrée et identifiée. Ce genre de méthode est encore considéré comme une méthode semi-quantitative, car il n'y a que très peu de relation entre le nombre de colonies observées sur la gélose et le nombre réel de cellules viables présentes sur la surface échantillonnée. Toutefois, l'identification des microorganismes isolés peut être une précieuse source d'information.

3.0 RENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX

C'est dans les années 70 que l'échantillonnage environnemental a été utilisé pour la première fois par la Direction générale de la protection de la santé pour étudier la contamination par Salmonella dans les usines de lait en poudre. Cette méthode peut être utilisée pour déterminer la présence d'organismes pathogènes et de micro-organismes indicateurs (par exemple, coliformes) sur la machinerie et les diverses surfaces qui entrent en contact avec les aliments. On reconnaît aujourd'hui que les bactéries peuvent croître sur les surfaces de contact avec les aliments et former des films biologiques qui sont très difficiles à éliminer.

Les résultats des analyses microbiologiques des échantillons environnementaux peuvent être utilisés par les inspecteurs pour documenter les écarts par rapport aux bonnes pratiques de fabrication aux fins de l'application de la loi et servir d'outil pédagogique pour amener la direction des usines à apporter les mesures correctives qui s'imposent. Il est important qu'une technique propre et commune soit utilisée par tous les inspecteurs de la Direction générale de la protection de la santé de façon à uniformiser cette approche à travers le pays.

4. AVANT L'ÉCHANTILLONNAGE

Avant d'entreprendre un échantillonnage environnemental, la personne chargée de l'opération doit prendre les mesures suivantes :

- Dresser un diagramme du procédé et un schéma de la circulation du personnel dans l'usine;
- Déterminer le ou les organismes cibles et les dangers;
- Déterminer les points de contrôle critiques;
- Choisir les sites d'échantillonnage;
- Prendre des arrangements avec le personnel de laboratoire quant à l'équipement et au matériel stériles nécessaires; et
- Choisir le matériel et l'identifier en fonction du site d'échantillonnage.

La numération des colonies aérobies et des coliformes sont les déterminations les plus souvent utilisées pour évaluer les conditions globales d'hygiène.

S'il l'on veut évaluer l'efficacité du nettoyage et de la désinfection d'une usine avant la production, le prélèvement des échantillons devrait se faire avant le commencement des opérations mais après le nettoyage et la désinfection.

S'il faut obtenir des renseignements sur les conditions environnementales (microbiologiques) régnant dans l'usine pendant la production, on recommande de prélever les échantillons pendant la production.

5.0 MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE

Pour procéder à l'examen microbiologique d'un milieu où sont transformés des aliments, il faut choisir les bonnes méthodes pour prélever les échantillons. Parmi ces méthodes figurent les suivantes: l'écouvillonnage, le recours aux Petrifilm^{MC}, le recours aux boîtes RODAC, et l'échantillonnage de l'air.

Bien que la méthode de prélèvement par écouvillonnage soit la méthode préférée, les boîtes RODAC et les Petrifilm^{MC} peuvent également être utilisés pour détecter les microorganismes indicateurs ou les organismes pathogènes. Le type d'écouvillons utilisé, p. ex. les coton-tiges, les éponges, la gaze, ou les tissus, etc., dépend de la nature de la surface à échantillonner et du matériel disponible au laboratoire.

Il est très important que le personnel qui prélève les échantillons environnementaux ait une bonne connaissance de la microbiologie.

NOTE: On devrait s'assurer que le matériel utilisé pour l'échantillonnage n'inhibe pas la croissance des microorganismes.
--

5.1 SITES D'ÉCHANTILLONNAGE

Le choix des sites d'échantillonnage dépend du but de l'échantillonnage. Il peut s'agir, par exemple:

- des murs, des planchers et des drains des aires de transformation des aliments;
- du réseau de canalisations des fluides;
- des systèmes d'aspiration de l'air et de ventilation;
- des appareils de réfrigération;
- du matériel de transformation.
- Tout endroit où se trouvent de l'eau, des éléments nutritifs et où la température d'incubation est considérée comme un élément critique.

5.2 MATÉRIEL

5.2.1 Matériel stérile¹:

- Cuillères (manches longs et courts)
- Pincés
- Couteaux (Victorinox (fournisseur local) ou l'équivalent)
- Contenants de plastique (8 onces, Becton Dickinson Labware, n° 4015, ou 10 onces, Georges Gagné et ass.², ou l'équivalent)
- Coton-tiges
- Éponges pré-humidifiées, chiffons-J, gaze, chiffons dans des pots Nalgene
- Combinaison, couvre-chef, couvre-chaussures et masque jetables³ (si des vêtements stérilisés sont nécessaires)
- Gants chirurgicaux⁴ pré-emballés (poignet)
- Manchons
- Sacs Whirlpak^{MC}
- Boîtes RODAC
- Petrifilm^{MC} (pré-humidifié)
- Contenants en polypropylène (Nalgene ou l'équivalent)

¹Chaque trousse stérile doit porter la mention de sa date de péremption

²Georges Gagné et ass., 784, Prom. Iroquois, Cornwall (Ontario) K6H 5C5 (613-933-6050)

³(Kimberley-Clark Canada Ltd., 365 East Bloor St. Toronto (Ont.), M4W 3L9, Tél. : 1-800-361-5876)

⁴Becton-Dickinson, Tru-Touch, Stretch Vinyl, Medical Gloves, Usage unique

- Milieux nutritifs appropriés

5.2.2 Matériel non stérile :

- Désinfectant (c.-à-d. Rocal⁵, éthanol à 70 %, en atomiseur)
- Serviettes absorbantes (Gibson ou l'équivalent)
- Serviettes pré-emballées humidifiées (à l'alcool isopropylique)
- Exacto (ne pas utiliser dans les zones de transformation des aliments)
- Sacs à ordures (sacs transparents)
- Sacs de plastique
- Marqueurs (les stylos à pointe rétractable, les crayons à mine et les crayons de cire sont les marqueurs préférés; les stylos à capuchon amovible devraient être évités)
- Bandes élastiques
- Ruban masque
- Boîte d'échantillonnage⁶ (grosse boîte à compartiments pour transporter les milieux de culture et les écouvillons dans l'usine)
- Incubateur/réfrigérateur portatif (Koolatron ou l'équivalent)
- Couvre-chaussures de plastique jetables
- Lampe de poche
- Glacière (glacière à surface lisse, non poreuse et qui peut être désinfectée)
- Sachets réfrigérants dans des sacs de plastique
- Gants chirurgicaux non stériles
- Porte-documents qui peuvent être désinfectés
- Formulaire⁷ de prélèvement d'échantillons environnementaux

⁵contient 10% chlorure de benzalkonium

⁶Plano Model 797, Plano Molding Company, P.O. Box 189, Plano Illinois 60545-0189,
tél. : 312-552-3111

⁷On ne devrait apporter dans l'usine que le nombre nécessaire de formulaires et de porte-documents dont on aura besoin. Evitez d'utiliser le même porte-document et le(s) même(s) formulaire(s) dans plus d'une usine.

- Échantillonneur d'air⁸

Le matériel non stérile devrait être désinfecté avant l'inspection, en particulier les couvre-chaussures de plastique jetables et les parois extérieures de la glacière. Une fois désinfectés, tous les articles devraient être placés dans un contenant ou un sac imperméable qui peut être désinfecté, jusqu'à ce qu'ils soient utilisés. Si les articles ne peuvent être désinfectés d'avance, ils devraient l'être (à l'aide de désinfectant Rocal, d'alcool, etc.) immédiatement avant d'entrer dans l'aire de transformation des aliments.

5.3 MÉTHODE DE PRÉLÈVEMENT PAR ÉCOUVILLONNAGE

La méthode de prélèvement par écouvillonnage peut être utilisée pour échantillonner toute surface jusqu'à concurrence de 1 m² (en particulier les murs et les planchers). Il est préférable d'utiliser des chiffons pour les murs et les planchers (1 m²), et des cotons-tiges et des éponges pour la machinerie et les petites surfaces de contact avec les aliments (100 cm²).

Il ne devrait y avoir qu'un seul écouvillon stérile pré-humidifié par contenant. Aucun diluant résiduel ne devrait se trouver dans le contenant une fois l'écouvillon humidifié. Si plusieurs écouvillons doivent être placés dans un même contenant, prenez les précautions appropriées afin d'éviter toute contamination de l'écouvillon ou du contenant à chaque fois qu'on prend un écouvillon à l'aide de pinces.

NOTE: Il est suggéré de mettre de côté deux écouvillons comme contrôle négatif. Un qui restera fermé, et un qui sera ouvert et transféré dans un milieu de culture sans avoir été utilisé.

Ouvrir le contenant (Nalgene ou sac Whirlpak) dans lequel sont placés le ou les écouvillon(s) stérile(s). Prendre l'écouvillon de façon aseptique. Refermez le contenant. Dépendant de la surface à échantillonner on peut soit utiliser des pinces stériles ou porter un gant stérile pour faire l'échantillonnage.

Frottez l'écouvillon fermement sur toute la surface à échantillonner. Faites cinq passages de bas en haut et cinq de gauche à droite. Sur les surfaces difficiles à échantillonner à cause de leur forme, il arrive qu'il soit impossible de rejoindre une zone précise à l'aide de cette méthode. Ces surfaces devraient être frottées le mieux possible.

Ouvrez le contenant dans lequel on a mis le milieu approprié, mettez-y l'écouvillon et refermez. Lorsqu'un écouvillon de type coton-tige est utilisé, sectionnez la partie qui servait à le tenir pendant l'écouvillonnage. Mettre les pinces ou le gant stérile de côté et en prendre un autre pour le prochain site d'échantillonnage.

5.3.1 SURFACES HORIZONTALES ET VERTICALES

Pour prélever des échantillons sur les surfaces horizontales, telles que les planchers, les tables, etc., et sur les surfaces verticales, telles que les murs, on peut utiliser des pinces stériles pour tenir l'écouvillon. Après avoir passé des gants stériles, ouvrez l'enveloppe contenant les pinces stériles et assurez-vous que le bout de l'instrument n'est pas contaminé. Procédez comme à la section 5.3.

Lorsque la surface à échantillonner est de grande dimension, les chiffons ou les cotons-tiges peuvent se révéler plus commodes.

5.3.2 INTÉRIEUR DES INSTALLATIONS DE GRANDES DIMENSIONS

Il est assez rare qu'il faille prélever des échantillons à l'intérieur des grosses pièces d'équipement (p. ex.

⁸All glass Impinger-30 (AGI-30, Ace Glass Inc., 1430 Northwest Blvd., Vineland, NJ), ou Reuter Centrifugal Air Sampler (RCS sampler, Biotest, Diagnostics Co., 6 Daniel Road East, Fairfield, NJ) ou Andersen 6-stage Sieve Air Sampler (Anderson Impactor, Andersen Samplers Inc., 4215 Wendell Dr., Atlanta, GA).

les séchoirs à lait). Par contre, si l'on doit prélever de tels échantillons, il faut revêtir une combinaison et des accessoires **stériles** : couvre-chef, masque (au besoin), combinaison jetable et couvre-chaussures.

Procédez comme à la section 5.3.

NOTE: N'apportez jamais de matériel non stérile à l'intérieur des machines.

5.4 AUTRES MÉTHODES

5.4.1 MÉTHODES SUR BOÎTES

L'utilisation de boîtes RODAC (*Replicate Organism Direct Agar Contact*) est indiquée quand il s'agit d'échantillonner des surfaces unies et imperméables. Il est cependant préférable de recourir aux Petrifilm^{MC} lorsque les surfaces à échantillonner sont irrégulières.

5.4.1.1 MÉTHODE SUR BOÎTES RODAC⁹

Portez des gants stériles. Ouvrez le sac contenant les boîtes RODAC et retirez-en une. Enlevez le couvercle de plastique et pressez soigneusement la surface de la gélose contre la surface à échantillonner. Veillez à ce que toute la surface de la gélose soit en contact avec la surface à échantillonner en appliquant une pression uniforme sur le fond de la boîte. Refermez le couvercle. Constituez des piles de 5 à 10 boîtes utilisées et attachez-les ensemble avec du ruban masque. Placez les boîtes dans des sacs Whirlpak^{MC} ou dans d'autres contenants adéquats. Fermez hermétiquement les sacs et veillez à ce qu'ils soient manipulés avec toute la précaution voulue durant leur transport vers le laboratoire.

La direction de l'usine pourrait entretenir certaines craintes concernant les risques de contamination. Aussi, vous devriez toujours essuyer la surface échantillonnée avec un linge humide stérile ou avec un désinfectant (p. ex., Rocal ou éthanol à 70 %) avant de vous rendre au prochain site d'échantillonnage.

5.4.1.2 MÉTHODE SUR PETRIFILM^{MC} 10

Portez des gants stériles. Ouvrez le sac et soulevez la pellicule qui recouvre la gélose du Petrifilm^{MC}. La gélose adhèrera à la pellicule.

Appliquez la gélose contre la surface à échantillonner (en pressant sur la pellicule recouvrant la gélose, non pas sur la partie cartonnée du dessous). Évitez de toucher avec vos doigts la zone de croissance ou la partie inférieure cartonnée, ou encore des surfaces en contact avec les aliments qui ne sont pas visées par l'échantillonnage.

Frottez fermement avec vos doigts toute la surface de la pellicule recouvrant la gélose afin que celle-ci soit en contact avec toute la surface à échantillonner. Décollez la pellicule de la surface et joignez les couches supérieure et inférieure du Petrifilm^{MC}.

NOTE: Il arrive parfois que la gélose se sépare et adhère à la fois à la pellicule et à la partie cartonnée du Petrifilm^{MC} lorsqu'on soulève la pellicule recouvrant la gélose. Le produit demeure efficace malgré la séparation de la gélose et doit être utilisé conformément à la méthode susmentionnée.

Identifiez chaque Petrifilm^{MC}. Placez les Petrifilm^{MC} dans un sac Whirlpak^{MC} et veillez à ce que les sacs

⁹La surface couverte par une boîte Rodac est d'environ 25 cm².

¹⁰Les Petrifilm^{MC} doivent être réhydratés par le personnel du laboratoire avant d'être utilisés. La surface couverte par un Petrifilm est d'environ 20 cm².

soient manipulés avec précaution durant leur transport vers le laboratoire.

Nettoyez la surface échantillonnée avec un désinfectant avant de vous rendre au site d'échantillonnage suivant.

Ni les boîtes Rodac ni les Petrifilm^{MC} ne requièrent une incubation durant le transport.

5.5 ÉCHANTILLONNAGE DES MATIÈRES SÈCHES (p. ex., échantillonnage par raclage, par balayage, etc.)

Portez des gants stériles. Prélevez un échantillon à chaque site d'échantillonnage choisi en utilisant les instruments stériles appropriés (cuillères, pinces, etc.). Placez chaque échantillon dans un contenant stérile (sac Whirlpak^{MC}, pot, etc.). Si cela est possible, vous devriez recueillir une quantité de matière sèche équivalente à celle qui serait échantillonnée pour l'analyse de produit fini.

6.0 TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons doivent être réfrigérés et transportés au laboratoire le plus rapidement possible. Ils doivent être placés dans une glacière propre et désinfectée dans laquelle on aura placé un nombre suffisant de sachets réfrigérants qui eux aussi seront propres et désinfectés. La température maintenue dans la glacière devrait être entre 0 et 4°C. On devrait s'assurer que l'on a atteint la bonne température en mesurant la température interne de la glacière avec un thermomètre. Les échantillons ne doivent pas être congelés.

Ils doivent être analysés dès leur réception, selon la méthode décrite dans le document MFLP-41B (en révision).

Annexe 1

HABILLEMENT

Les responsables de l'échantillonnage environnemental pourraient jouer le rôle de vecteurs ou être perçues comme pouvant favoriser la transmission d'agents pathogènes dans l'usine durant les inspections des établissements de transformation de produits alimentaires. Le protocole présenté ci-dessous décrit les procédures à suivre durant les inspections.

Si l'on prévoit visiter plus d'une usine au cours d'une même journée, il faut emporter autant de paires de combinaisons que d'usines à visiter. Tout matériel appelé à être réutilisé au cours de l'inspection d'un autre établissement devrait être désinfecté au préalable.

1. Hygiène personnelle et exigences sanitaires

Les responsables de l'échantillonnage environnemental doivent suivre les règles élémentaires d'hygiène personnelle et veiller, en particulier, à ce que leurs mains, leurs ongles, leur chevelure, leur barbe et leurs vêtements (incluant les souliers et les bottes) soient d'une propreté irréprochable. Ils doivent également retirer tous leurs bijoux (montre, bagues, boucles d'oreilles, bracelets, pince à cravate, etc.) avant d'entrer dans les aires de transformation de l'usine.

Toute personne atteinte d'un rhume, d'une grippe, d'une infection cutanée, d'une maladie gastro-intestinale ou de toute autre affection devrait également s'abstenir de participer aux activités d'échantillonnage.

2. Matériel

2.1 Généralités

Les vêtements, les chaussures et tout autre matériel utilisés dans le cadre des inspections peuvent favoriser la transmission d'agents pathogènes. Les personnes chargées de l'échantillonnage environnemental devraient veiller à ce que le matériel utilisé soit à la fois adéquat et d'une propreté irréprochable avant de l'introduire dans l'établissement à inspecter.

2.2 Vêtements de protection

1. Combinaisons

Les combinaisons jetables sont recommandées. Les combinaisons réutilisables après blanchissage et emballées individuellement (de préférence blanches) sont également acceptables. Toutes les poches devraient se trouver en bas de la taille et être assez profondes pour recevoir des lampes de poche, des spatules, des plumes, etc. Les boutons devraient être remplacés par des boutons-pression, des fermetures-éclair ou des bandes velcro.

2. Résilles (cheveux, barbe et moustache)

Les résilles devraient être jetables, emballées individuellement et de préférence blanches.

3. Chaussures

Les personnes chargées de l'échantillonnage environnemental devraient porter des chaussures à embout d'acier à semelles antidérapantes (de préférence blanches).

Les chaussures jetables sont acceptables si elles ne présentent pas de risque pour la sécurité. La même remarque s'applique aux couvre-chaussures extensibles en caoutchouc.

4. Casques protecteurs

Durant l'échantillonnage, les responsables devraient en tout temps porter un casque protecteur (blanc) en plus de la résille.

2.3 Mesures de sécurité personnelles

Pendant l'échantillonnage environnemental

Il est recommandé:

- d'utiliser les bains de pieds et d'appliquer les autres mesures de sécurité prévues par la direction de l'usine;
- de se laver les mains après les pause-café, après être allé aux toilettes, après le déjeuner ou après toute exposition durant l'inspection à une source potentielle de contamination croisée (drains, pièces d'équipement démontées, etc.);
- de n'utiliser que les instruments appropriés durant l'inspection (en d'autres mots, il ne faut pas utiliser des stylos à bille ou des crayons pour examiner les drains ou les pièces de machineries démontées, car une telle pratique pourrait favoriser la contamination croisée).

Après l'échantillonnage environnemental

Il est recommandé:

- de replacer les combinaisons, les chaussures, les casques, etc., dans des sacs ou dans des contenants de façon à éviter la contamination du porte-document ou du véhicule;
- de se débarrasser du matériel jetable en utilisant les bacs à ordures appropriés à l'usine;

2.4 Séquence d'échantillonnage

L'échantillonnage environnemental devrait être réalisé dans le sens inverse du cheminement de production. À moins d'indications contraires, il est recommandé de commencer l'échantillonnage dans les aires d'entreposage des produits finis, de poursuivre dans les aires de transformation potentiellement contaminées et de terminer dans les aires d'entreposage et de réception des matières premières.

