

**manuels
sur le contrôle de la qualité
des produits alimentaires**

**12. assurance de la qualité dans
le laboratoire d'analyse
microbiologique des aliments**



**manuels
sur le contrôle de la qualité
des produits alimentaires**

**12. assurance de la qualité dans
le laboratoire d'analyse
microbiologique des aliments**

Les appellations employées dans cette publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites.

M-82
ISBN 92-5-203053-0

Tous droits réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite, mise en mémoire dans un système de recherche bibliographique ni transmise sous quelque forme ou par quelque procédé que ce soit: électronique, mécanique, par photocopie ou autre, sans autorisation préalable. Adresser une demande motivée au Directeur de la Division des publications, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italie, en indiquant les passages ou illustrations en cause.

© FAO 1992

AVANT-PROPOS

Le contrôle de l'innocuité et de la qualité des aliments fait partie intégrante des programmes nationaux de développement. Les systèmes nationaux de contrôle des denrées alimentaires visent à protéger la santé et le bien-être des consommateurs, à faciliter le commerce des produits alimentaires et à protéger les intérêts des producteurs, industriels ou négociants loyaux et honnêtes contre la concurrence malhonnête et déloyale. L'accent est mis sur la prévention des risques d'ordre chimique et biologique découlant de la contamination, du frelatage ou simplement d'une mauvaise manutention des aliments. Tout aussi important est le maintien de la qualité des vivres en général.

Aucun système national de contrôle des aliments ne saurait se passer d'un service de laboratoires dotés de compétences en matière d'analyse chimique et microbiologique. Dans chacun de ces domaines techniques, il faut appliquer des spécifications et des procédures différentes afin de pouvoir organiser et maintenir des activités analytiques de haute qualité.

La présente publication est un manuel pratique pour l'établissement d'un programme d'assurance de la qualité dans les laboratoires de contrôle microbiologique des aliments. Son objectif fondamental est de garantir que chaque laboratoire microbiologique obtienne des résultats analytiques de haute qualité accompagnés en permanence d'une documentation cohérente donnant des informations claires, exactes et incontestables sur le déroulement des analyses. Un manuel analogue destiné aux laboratoires d'analyse chimique est en préparation.

Ce manuel s'adresse aux administrateurs et analystes des laboratoires de microbiologie, mais il pourra être utilement consulté par les fonctionnaires des services de réglementation et toutes autres personnes intéressés désirant connaître les problèmes que posent l'élaboration et l'exécution d'un programme d'assurance de la qualité dans un laboratoire de contrôle microbiologique des aliments.

La FAO tient à exprimer sa gratitude au Dr Wallace Andrews, Division de microbiologie, Food and Drug Administration (FDA), Washington DC, Etats-Unis, qui a préparé le manuel. Elle remercie également de leur concours d'autres fonctionnaires de la FDA, notamment Mmes Lois Tomlinson (mise en page technique) et Donna Alesia Newman (dactylographie de la version initiale). Une partie du texte a été rédigée par M. Peter Martin de la firme Lynn, Martin and Radford, Public Analysts, Reading, Berkshire, Angleterre.

La version provisoire du manuel a été revue par les experts suivants: M. B. Amla, Directeur de l'Institut central de recherche technologique sur les aliments, Mysore, Inde; M. T. Karki, Directeur du Laboratoire central de recherche bromatologique, Ministère de l'agriculture, Katmandou, Népal; M. H. Leonhardt, Directeur de la Coopération scientifique internationale, Institut Robert von Ostertag, Berlin, Allemagne; et M. H. Mol, ancien Directeur du Service national d'inspection des aliments, Utrecht, Pays-Bas. La FAO remercie chaleureusement ces experts de leur précieuse collaboration.

Le manuel est à la disposition des particuliers et des organisations. Observations et suggestions en vue de leur incorporation éventuelle dans des éditions ultérieures du manuel devraient être envoyées à l'adresse suivante:

Chef du Service de la qualité des aliments et des
normes alimentaires
Division des politiques alimentaires et de la
nutrition
Organisation des Nations Unies pour l'alimentation
et l'agriculture
Viale delle Terme di Caracalla
00100 Rome (Italie)

AVERTISSEMENT

Les méthodes d'analyse décrites dans le présent manuel doivent être appliquées par un personnel qualifié dans un laboratoire dûment équipé. De même que pour beaucoup d'autres travaux de laboratoire, les méthodes indiquées comportent parfois la manipulation de substances dangereuses.

Pour que ces méthodes soient exécutées correctement en toute sécurité, il est indispensable que le personnel de laboratoire observe des normes de sécurité.

Bien qu'on ait accordé le plus grand soin à la présentation des informations ci-incluses, la FAO décline expressément toute responsabilité pour les dommages de toutes sortes que les usagers pourraient encourir par suite de l'application des méthodes décrites.

En outre, l'inclusion dans le présent manuel de ces méthodes d'assurance de la qualité ne doit pas les faire considérer comme étant des procédures officielles.

ASSURANCE DE LA QUALITE DANS LE LABORATOIRE D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS

TABLE DES MATIERES

	Page
1. ADMINISTRATION	1
1.1 Objectifs du laboratoire	1
1.2 Assurance et contrôle de la qualité: définitions	2
1.3 Avantages d'un programme d'assurance de la qualité	3
1.4 Détermination des responsabilités	4
Responsabilités de l'administration	4
Responsabilités de l'unité de l'assurance de la qualité	6
Responsabilités de l'analyste	7
1.5 Références	9
2. LE PROGRAMME D'ASSURANCE DE LA QUALITE	10
2.1 Définition	10
2.2 Préparation	10
2.3 Le manuel sur l'assurance de la qualité	12
2.4 Application	12
2.5 Références	14
3. LE LABORATOIRE	15
3.1 Conception du laboratoire	15
Généralités	15
Le laboratoire de microbiologie	15
3.2 Surveillance de l'environnement	18
Généralités	18
Le laboratoire de microbiologie	18
3.3 Services de nettoyage	19
3.4 Références	21
4. PERSONNEL	22
4.1 Sélection et qualifications	22
4.2 Formation	23
4.3 Comportement professionnel	25
Généralités	25
Programmes de contrôle par sondage	25
4.4 Références	28

5.	ECHANTILLONS	29
5.1	Responsabilité	29
5.2	Identification et intégrité	30
5.3	Echantillonnage aux fins d'analyse	31
5.4	Entreposage et destruction des échantillons	32
5.5	Emballage et expédition	32
5.6	Références	36
6.	MATERIEL	37
6.1	Maintenance et réparation	37
	Etuves à incubation	37
	Bains-marie	38
	Réfrigérateurs et congélateurs	38
	Autoclaves	38
	Fours à air chaud	40
	Balances	40
	pH-mètres	40
	Mélangeurs	41
	Hotte à flux laminaire	41
	Microscopes	41
	Programme de maintenance et réparation	42
6.2	Etalonnage	42
	Etuves à incubation	42
	Bains-marie	43
	Réfrigérateurs et congélateurs	44
	Autoclaves	44
	Fours à air chaud	44
	Balances	44
	pH-mètres	44
	Mélangeurs	45
	Hotte à flux laminaire	45
	Microscopes	45
6.3	Tests de performance	45
	Etuves à incubation	45
	Bains-marie	46
	Réfrigérateurs et congélateurs	47
	Autoclaves	47
	Fours à air chaud	47
	Balances	47
	pH-mètres	47
	Mélangeurs	48
	Hotte à flux laminaire	49
	Microscopes	49
6.4	Verrerie	49
6.5	Références	51

7.	PRODUITS CHIMIQUES/MILIEUX DE CULTURE/REACTIFS	52
7.1	Spécifications et commandes	52
7.2	Préparation et emploi	53
7.3	Conservabilité et conditions d'entreposage	55
7.4	Spécifications fonctionnelles	56
7.5	Références	60
8.	SUBSTANCES ETALONS	61
8.1	Spécifications et commandes	61
8.2	Préparation et emploi	62
8.3	Conservabilité et conditions d'entreposage	62
8.4	Spécifications fonctionnelles	62
	Pureté	62
	Morphologie	63
	Réactions biochimiques	63
	Réactions sérologiques	64
8.5	Références	65
9.	METHODOLOGIE	66
9.1	Choix des méthodes	66
9.2	Témoins	68
	Echantillons témoins	68
	Témoins analytiques positifs	68
	Témoins analytiques négatifs	68
	Stérilité de la verrerie	69
	Cultures témoins pour les bains-marie	69
9.3	Validation des méthodes	69
9.4	Echantillons de référence	71
9.5	Références	72
10.	UTILISATION D'ANIMAUX DE LABORATOIRE	73
10.1	Hygiène personnelle	73
10.2	Achat et quarantaine	73
10.3	Animalerie	73
10.4	Cages	74
10.5	Soins et alimentation	74
10.6	Sélection aux fins d'analyse	75
10.7	Contention et voies d'injection	75
10.8	Elimination	75

11.	DOCUMENTATION	76
11.1	Repérage	76
11.2	Fiches d'échantillonnage	77
11.3	Comptes rendus d'analyse	79
11.4	Autres documents	83
12.	INSPECTIONS ET VERIFICATIONS DE L'ASSURANCE DE LA QUALITE	85
12.1	Examen des activités courantes	85
12.2	Etudes rétrospectives	86
12.3	Accréditation	87
12.4	Activités de suivi	88
12.5	Références	88

ANNEXES

Annexe 1	Exemple de manuel sur l'assurance de la qualité	89
Annexe 2	Contrôle des surfaces - Méthode par contact au tampon	96
Annexe 3	Contrôle des surfaces - Méthode par contact direct sur gélose (méthode RODAC)	97
Annexe 4	Exemple de fiche de prise en charge d'un échantillon	98
Annexe 5	Exemple de bande de fermeture pour échantillon	99
Annexe 6	Entreposage des échantillons de produits alimentaires	100
Annexe 7	Etalonnage d'un thermomètre à immersion partielle	107
Annexe 8	Etalonnage d'un microscope	108
Annexe 9	Détermination du pouvoir bactéricide des lampes à rayons ultraviolets	109
Annexe 10	Détermination des résidus de substances bactériostatiques/bactéricides à la surface de la verrerie de laboratoire	110
Annexe 11	Détermination de la qualité de l'eau servant à préparer les milieux et réactifs microbiologiques	111
Annexe 12	Conservation des cultures-mères microbiologiques	115
Annexe 13	Exemple de certificat sanitaire vétérinaire	124
Annexe 14	Procédure d'immobilisation des souris pour pratiquer une injection intrapéritonéale	125
Annexe 15	Méthodes de sacrifice euthanasique des souris	126
Annexe 16	Exemple d'ordinogramme pour les échantillons à analyser en laboratoire	127
Annexe 17	Exemple de fiche d'échantillonnage	128
Annexe 18	Exemple de compte rendu d'analyse	129
Annexe 19	Résumé des résultats de l'analyse bactériologique	130
Annexe 20	Rapport d'analyse bactériologique	132
Annexe 21	Rapport sur la recherche de <u>Salmonella</u>	135
Annexe 22	Rapport sur la recherche de <u>Shigella</u>	136
Annexe 23	Analyse d'un aliment en conserve - Feuillet complémentaire	137
Annexe 24	Recherche de <u>Botulinum</u> - Feuillet complémentaire	138
Annexe 25	Fruits de mer - Rapport d'analyse bactériologique	139
Annexe 26	Liste des opérations de contrôle pour l'assurance de la qualité	140

ASSURANCE DE LA QUALITE DANS LE LABORATOIRE D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS

1. ADMINISTRATION

1.1 Objectifs du laboratoire

Les objectifs du laboratoire devraient être clairement définis, et énoncés en termes aussi simples que possible. Cela est d'une extrême importance, car c'est sur des définitions précises que reposeront toutes les activités du laboratoire. Le directeur du laboratoire devrait en fixer les objectifs après avoir entendu les avis de personnes compétentes et compte tenu des instructions de ses supérieurs. Cet exercice devrait prendre en considération les éléments suivants: qualité, ponctualité et rapport coût-utilité des résultats. Ces objectifs pourront comprendre un certain nombre de buts secondaires. Tous les facteurs revêtant un intérêt fondamental pour les opérations du laboratoire devraient entrer en ligne de compte, sans toutefois être analysés en détail.

Le laboratoire a pour objectif principal de fournir des résultats fiables, point qui doit donc faire l'objet d'une attention approfondie. En fait, tout laboratoire dont les résultats seraient trop souvent peu sûrs ne saurait certainement être agréé dans un dispositif gouvernemental. Garantir la qualité des résultats ne représente pas une tâche ou activité supplémentaire facultative; il s'agit de l'un des instruments indispensables dont disposent le directeur et son personnel pour assurer la pleine réalisation de leurs opérations.

Les objectifs en matière de qualité doivent être aussi réalistes que ceux concernant d'autres domaines. On pourrait dire que l'objectif général du laboratoire est de fournir des données analytiques d'une exactitude et d'une fiabilité adéquates en un laps de temps acceptable et pour un coût convenable.

L'objectif qualitatif pourrait être considéré comme étant aussi sûr que possible s'il permet d'obtenir à peu près le résultat juste. Cela mérite quelques explications. Que faut-il entendre par "aussi sûr que possible"? Cette expression signifie que l'objectif est tellement sûr que, s'il se révélait ultérieurement incorrect, les raisons de ce fait ne devraient pas porter atteinte à l'intégrité, à la probité et à la compétence technique du personnel du laboratoire. Et comment faut-il comprendre "à peu près"? Cela veut dire obtenir un résultat suffisamment bon pour les fins auxquelles il sera utilisé. Si un échantillon présente une grave carence en un élément particulier, l'entité précise de la carence n'aura probablement pas une grande importance pratique pour, par exemple, un recours en justice ou le refus d'une livraison. Si la quantité de l'élément considéré est voisine de la limite légale, l'exactitude du résultat de l'analyse, lorsque celui-ci s'approche de la limite, compte plus que le degré de précision de la méthode. Ainsi, exactitude et précision doivent être plus élevées dans le cas des échantillons marginaux que pour ceux qui s'écartent beaucoup d'une norme ou d'une limite.

Le programme d'assurance de la qualité (AQ) représente la fonction administrative qui garantit la qualité des résultats. Il s'agit d'une activité qui devrait être réalisée dans la mesure nécessaire, ni trop ni trop peu, et faire partie intégrante des fonctions administratives quotidiennes. La question, il importe de la noter, est non seulement d'obtenir le résultat juste mais encore de pouvoir démontrer, documentation à l'appui, que le résultat juste a été obtenu. L'introduction pour la première fois dans un laboratoire de procédures AQ écrites peut exiger d'importantes modifications d'attitudes. Quand elle est présentée de manière correcte, l'AQ contribue à améliorer le moral des analystes dont la confiance en leurs résultats se trouve accrue et qui sont capables de pouvoir démontrer la véracité de ces résultats. Le programme AQ attire l'attention sur les aspects pertinents des activités quotidiennes et sur les besoins en matière de formation, et aide les opérateurs à développer leur compétence professionnelle et à poursuivre leur carrière.

1.2 Assurance et contrôle de la qualité: définitions

Bien que l'expression "assurance de la qualité" puisse sembler s'expliquer d'elle-même, elle est souvent confondue avec une autre expression, "contrôle de la qualité", et utilisée à sa place. Garfield (8) définit le contrôle de la qualité comme un "système planifié d'activités qui ont pour but de fournir un produit de qualité". Dans le cas d'un laboratoire de contrôle des aliments, ce produit de qualité sera un résultat analytique valable. Le même auteur définit l'assurance de la qualité comme un "système planifié d'activités visant à fournir l'assurance que le programme de contrôle de la qualité est réellement efficace." Garfield recourt à l'expression "assurance de la qualité" pour recouvrir les deux définitions.

Des expressions et définitions quelque peu différentes sont employées par Taylor (6, 9) selon qui l'objectif d'un programme d'assurance de la qualité consiste à ramener les erreurs à un niveau acceptable et à donner l'assurance que les données ont une haute probabilité d'être d'une qualité acceptable. Deux autres notions entrent aussi en jeu: pour Taylor, le "contrôle de la qualité" est le "mécanisme institué pour limiter les erreurs", alors que l'"évaluation de la qualité" est le "mécanisme visant à vérifier que le système fonctionne dans des limites acceptables".

Une autre expression encore est usitée: il s'agit du "système de qualité" qu'un groupe de travail de la Conférence internationale sur l'accréditation des laboratoires (7) a défini comme "l'ensemble des structures, responsabilités, activités, ressources, etc. d'une organisation qui engendrent des procédures et des méthodes d'exécution organiques propres à garantir la capacité de l'organisation de satisfaire aux spécifications qualitatives". Selon le groupe de travail, le système de qualité englobe tous les éléments du contrôle et de l'assurance de la qualité.

On peut donc considérer que le contrôle de la qualité est la combinaison des systèmes, procédures, activités, instructions et études de gestion qui contrôlent et améliorent la qualité des travaux accomplis. D'autre part, l'assurance de la qualité est le système d'activités donnant à l'administration la certitude que les systèmes de contrôle de la qualité sont en place et permettent avec efficacité d'obtenir des résultats analytiques de la plus haute qualité.

1.3 Avantages d'un programme d'assurance de la qualité

Un bon programme d'assurance de la qualité offre plusieurs avantages. Tout d'abord, il fournit une série de relevés qui garantissent l'intégrité des échantillons, permettent de vérifier le fonctionnement correct des appareils de laboratoire et attestent que les résultats des analyses ont été obtenus en conformité de protocoles agréés. Cette documentation est particulièrement importante dans le cas des laboratoires officiels dont les analyses doivent être inattaquables devant un tribunal.

Un deuxième avantage est représenté par les économies en termes de temps et de coûts. Même si le programme d'assurance de la qualité peut sembler au début limiter la productivité d'un laboratoire, il peut à long terme entraîner des économies puisque les analyses seront d'emblée correctes.

En troisième lieu, un programme d'assurance de la qualité concourt à cerner les besoins des analystes en matière de formation. Celle-ci ne devrait pas être limitée aux nouveaux employés; elle devrait aussi concerner les analystes en poste dont le rendement laisse à désirer ou qui requièrent un cours de perfectionnement.

Un quatrième avantage découlerait de la confiance accrue des analystes en la fiabilité de leurs résultats, ce qui contribuerait à l'amélioration du moral et du comportement du personnel.

Le programme présente d'autres avantages encore, notamment:

- Il garantit que les erreurs sont réduites au minimum ou éliminées. Toutes les erreurs ne peuvent certes être supprimées, mais il est possible de garantir que très peu d'erreurs graves ne seront pas repérées avant la publication des résultats.
- Il garantit la crédibilité juridique. De manière générale, les tribunaux sont très prudents quant à la recevabilité des preuves. Les critères appliqués pour admettre qu'une preuve est scientifiquement valable sont très rigides, mais cela ne signifie pas nécessairement que l'élément de preuve répondra aux statuts et règlements du tribunal ou lui sera compréhensible. Par exemple, même si la preuve juridique est acquise "en toute certitude", il se pourrait que le tribunal éprouve quelque difficulté à l'assimiler à une donnée statistique probabiliste.
- Dans le cas d'une enquête ou d'un litige, il donne à l'administration la certitude que les résultats d'analyse sont justes. Cette certitude découle des preuves graduellement acquises quant à l'efficacité des travaux du laboratoire.
- Dans le cas d'une enquête, d'un litige ou d'une faute, il garantit la présence d'archives pour résoudre le problème. Les dossiers devraient être conservés assez longtemps, de préférence pendant six ans.

- Il permet de relever les insuffisances, fautes et doléances de manière à prendre les mesures systématiques qui s'imposent pour améliorer la situation.
- Il garantit que l'utilisation des ressources est optimale. Il s'agit souvent là d'un processus lent, mais à mesure que s'accumulent les données sur le fonctionnement du laboratoire il est plus facile d'évaluer le degré d'efficacité de l'utilisation de ses ressources. Par exemple, il est plus facile de vérifier si des réactifs utilisables sont disponibles.
- Il fournit des informations suffisamment fiables pour être insérées dans des bases de donnée aux fins de politiques locales, nationales et internationales en matière de contrôle des aliments, de santé publique, de nutrition, etc. Ces bases de données sont extrêmement utiles pour la surveillance continue des denrées alimentaires. Elles permettent de déceler l'évolution des produits dans le temps et de comparer très facilement les résultats des analyses. Si les bases de données ne contiennent pas de renseignements fiables, on pourrait aisément en tirer des conclusions erronées.

1.4 Détermination des responsabilités

Responsabilités de l'administration

Bien souvent hélas, la composante assurance de la qualité des travaux d'un laboratoire n'est pas suffisamment prise en considération ou n'est pas bien interprétée. Par exemple, elle peut être détaillée au point d'englober pratiquement chaque attribution analytique. Bien qu'apparemment séduisant et avantageux, ce type de programme risque de se révéler écrasant et frustrant pour le personnel du laboratoire. Ce qui semble au début une entreprise admirable peut donc finir par engendrer découragement et faillite du programme. A l'opposé, un programme trop flou sera dénué d'utilité. Il incombe à l'administration de déterminer le champ d'application et le degré de priorité du programme d'assurance de la qualité applicable à un laboratoire déterminé, sur la base d'un calcul du rapport coût-efficacité. Une fois qu'elle a choisi un programme, l'administration doit veiller à sa mise en route, à son exécution et au respect de ses principes. Si le personnel a l'impression que l'administration se désintéresse du programme, on peut s'attendre à une certaine indifférence de sa part.

Lorsqu'un programme d'assurance de la qualité est devenu partie intégrante des opérations journalières, l'administration a le devoir de dégager des ressources pour son exécution et pour la mise en place d'une unité chargée de suivre son application. L'administration doit donner une image positive du programme d'assurance de la qualité. Celui-ci ne devrait pas être perçu comme quelque chose de menaçant, comme une source d'affrontements ou comme un surcroît de travail. Il devrait au contraire être compris comme un moyen d'améliorer les activités du personnel et d'attester et récompenser un travail exceptionnel.

Beaucoup d'analystes ont commencé leur carrière dans des laboratoires où l'assurance de la qualité, au sens actuel du terme, n'était pas pratiquée. Même si leur nombre diminue, il existe encore des laboratoires de ce genre. A un moment ou à un autre, l'analyste devra modifier sa façon de travailler et considérer positivement le concept d'assurance de la qualité. Mais de nombreux obstacles devront être surmontés.

L'analyste peut éprouver le sentiment que toutes ses activités passées sont remises en cause du fait qu'elles n'ont pas été réalisées selon le nouveau système. Au début, l'application de l'assurance de la qualité prend du temps. L'analyste estimera probablement qu'il en fait déjà assez et qu'aucune de ses opérations n'est superflue. Pour lui, le nouveau système est irréalisable, inutile et prend beaucoup de temps. L'administration peut facilement expliquer cette attitude négative par de médiocres compétences, un manque de conscience professionnelle et une mauvaise compréhension. Il faut malheureusement reconnaître que les programmes d'assurance de la qualité sont souvent instaurés à la suite de pressions extérieures, pour recevoir une accréditation ou pour reconquérir une réputation ternie par une faute.

Il faudra peut-être promouvoir le concept d'assurance de la qualité aussi bien à l'intérieur que hors du laboratoire. En premier lieu, il pourra se révéler nécessaire de convaincre les personnes qui interviennent dans les décisions relatives au financement du laboratoire. Parfois sera-t-il difficile de persuader les gestionnaires et les juristes, dont les connaissances techniques peuvent être limitées, de la nécessité d'une dépense supplémentaire alors qu'à leur avis le laboratoire semble avoir donné satisfaction pendant longtemps avec l'ancien système et que de nouvelles dépenses ne sauraient donc se justifier.

Les raisons pour lesquelles la situation évolue doivent fréquemment être explicitées. Le risque de voir mis en doute les résultats d'un laboratoire existe depuis toujours, mais il augmente à mesure que d'autres laboratoires adoptent des programmes d'assurance de la qualité et améliorent leur technologie et leur gestion. Les décideurs doivent tenir compte de l'évolution des concepts concernant la technologie appliquée. L'automatisation et l'informatisation croissantes détournent l'attention des techniques de manipulation imposées par des analyses souvent lentes et assommantes pour la porter sur les méthodes d'administration et de gestion requises pour garantir la qualité d'une importante quantité de données. Il se produit donc aussi une évolution à l'intérieur même du laboratoire où l'on passe du prélèvement d'échantillons au hasard à des programmes d'échantillonnage bien élaborés, d'un tout petit nombre de prélèvements à une quantité optimale d'échantillons d'un même type de produit, de la virtuosité analytique à des résultats qualitativement garantis, de la réaction événementielle à une politique d'application du droit alimentaire. L'optique habituelle des gestionnaires, à savoir améliorer la rentabilité et l'utilisation des ressources, n'est plus valable si elle ne tient pas compte de l'assurance de la qualité.

Les décisions concernant la nature et l'ampleur de l'unité chargée de l'assurance de la qualité incombent à l'administration. Dans les grands laboratoires pluridisciplinaires, cette unité peut comprendre deux ou plusieurs agents ayant pour unique rôle de veiller à l'efficacité du programme d'assurance de la qualité. La direction des laboratoires plus petits ne voudra peut-être pas créer une unité s'occupant exclusivement de l'assurance de la qualité et chargera un analyste de contrôler à temps partiel l'observance d'un programme agréé d'assurance de la qualité.

La fréquence des vérifications formelles du degré d'application du programme d'assurance de la qualité est aussi déterminée par l'administration. Divers administrateurs peuvent se prononcer pour des inspections trimestrielles, voire mensuelles. D'autres pourront décider d'effectuer des revues mensuelles sommaires et un contrôle annuel complet. Quelle que soit la fréquence des inspections, l'administration se fonde sur les données et les recommandations préparées par l'unité de l'assurance de la qualité et peut décider de récompenser les employés qui ont le mieux suivi les prescriptions du programme d'assurance de la qualité. Par exemple, un système de plus en plus utilisé est celui des "primes de productivité" pour récompenser un employé. La décision de décerner une telle prime pourrait se baser entre autres sur la notion d'assurance de la qualité, ce qui permettrait à l'administration d'encourager le personnel à appliquer strictement le programme d'assurance de la qualité. Lorsque ce programme est mal observé, l'administration pourrait être amenée à prendre des mesures disciplinaires.

Outre l'examen des recommandations formulées par l'unité de l'assurance de la qualité, l'administration devrait revoir périodiquement la politique et le programme en matière d'assurance de la qualité. Bien que la politique et le programme doivent être observés scrupuleusement, il faudrait prévoir une certaine souplesse pour permettre des écarts raisonnables lorsque les dispositions du programme original d'assurance de la qualité sont trop spécifiques ou ne le sont pas assez. Si les écarts sont trop spécifiques, il faudra peut-être modifier le programme. Il incombe à l'administration de passer constamment en revue la politique et le programme d'assurance de la qualité pour y introduire les amendements nécessaires.

En résumé, l'assurance de la qualité ne saurait devenir partie intégrante des activités d'une organisation sans engagement et efforts de la part de l'administration. Il y a beaucoup à faire au début: rédiger un manuel sur la qualité, produire des données sur le contrôle qualitatif et organiser le système relatif à la qualité. A ce stade, le soutien de l'administration est essentiel: encouragements, conseils et fourniture de ressources adéquates. L'assurance de la qualité tombe en discrédit quand l'administration est encline à recourir aux anciennes méthodes de travail pour atteindre un objectif à court terme, par exemple fournir très vite un rapport d'échantillonnage pour répondre à certaines pressions. C'est typiquement dans ce cas que se commettent des erreurs. L'administration peut aussi faire connaître de manière très efficace l'importance qu'elle attribue au programme en insistant sur la stricte observation du calendrier des inspections et examens et en manifestant son intérêt pour toutes les mesures de suivi. Les inspections et les mesures qui en découlent constituent le mécanisme d'évolution incorporé dans le système d'assurance de la qualité et sont en grande partie le reflet de l'efficacité du programme.

Responsabilités de l'unité de l'assurance de la qualité

La première étape de la création d'une unité de l'assurance de la qualité consiste généralement à obtenir l'approbation budgétaire à la nomination d'un cadre chargé de l'assurance de la qualité ainsi que de ses collaborateurs, ou bien à conclure un accord pour réaffecter à l'unité du personnel et des fonds existants. Le titulaire de l'unité devrait de préférence posséder des qualifications bien établies en matière d'assurance de la qualité, mais cela n'est pas toujours possible. Le plus souvent, on désignera à ce poste un analyste qui devra entreprendre des études personnelles, suivre des cours, etc. Cette personne devra

être un analyste expérimenté dont les compétences techniques lui vaudront le respect de ses collègues. Le responsable de l'assurance de la qualité devra s'efforcer de comprendre les principes de l'AQ et de les appliquer correctement.

Le chargé de l'AQ doit pouvoir disposer d'inspecteurs qui seront habituellement choisis parmi les analystes. Une équipe de deux personnes suffira dans un petit laboratoire pour inspecter toutes les sections, y compris les services administratifs, mais non les leurs propres. Dans un plus grand laboratoire, le chef de l'unité aura peut-être besoin de collaborateurs permanents, mais les effectifs demeurent généralement faibles. Une proportion adéquate sera probablement d'un chargé de l'AQ pour dix à vingt analystes. Plus la variété des analyses effectuées est grande et le niveau général d'expérience est bas, plus l'assurance de la qualité est nécessaire.

L'unité de l'assurance de la qualité a pour fonction d'élaborer le plan ou le manuel d'assurance de la qualité et de veiller à ce que le personnel du laboratoire applique le programme. Elle assure la liaison entre l'administration, qui a fourni les fonds pour permettre le succès du programme, et le personnel du laboratoire, qui est directement responsable de la réalisation pratique du programme. L'unité fait appel aux employés, en particulier les analystes et le chef d'équipe, pour obtenir les données techniques nécessaires durant la rédaction du plan d'assurance de la qualité.

L'unité AQ fait directement rapport à l'administration. Son personnel doit non seulement programmer et diriger les inspections, mais encore adresser à l'administration des recommandations sur la base des résultats de ces enquêtes, recommander à la direction la politique à suivre en matière d'assurance de la qualité, participer à son élaboration, identifier les besoins de formation du personnel et émettre des directives concernant tous les aspects pratiques du programme AQ.

Un des moyens dont dispose l'administration pour appuyer ces activités est de porter une attention vigilante aux inspections et aux mesures de suivi. Ces interventions régulières et assez formelles suscitent la discipline requise pour l'application constante du programme. Le titulaire de l'unité d'assurance de la qualité et, en tant que de besoin, ses collaborateurs doivent pouvoir consulter directement le directeur du laboratoire ou son adjoint. De cette façon, il sera possible d'examiner sans délai un rapport d'inspection ou une irrégularité et de prendre immédiatement les mesures qui s'imposent.

Il faudrait organiser une ou deux fois par an des réunions d'étude au cours desquelles, en consultation avec le chef AQ et les analystes principaux, l'administration pourra décider des modifications à apporter éventuellement à la politique et au programme. La nécessité de telles modifications découlera des inspections relatives à la qualité.

Responsabilités de l'analyste

L'analyste joue un rôle clé dans la mise en oeuvre du programme d'assurance de la qualité. L'analyste dûment formé est responsable de la qualité des données et des activités connexes du laboratoire; c'est la première personne capable de déceler un mauvais fonctionnement du système analytique. Le personnel du laboratoire d'analyse doit être en mesure de faire la distinction entre une irrégularité normale due au hasard et une faute anormale.

Aussi bien l'administration que l'unité AQ attendent des analystes collaboration et données techniques pour l'élaboration du programme d'assurance de la qualité. Certains analystes peuvent être invités à rédiger une partie du programme qui sera ensuite revue et approuvée par l'unité AQ et l'administration. Participer à la formulation du programme peut être un élément de motivation pour le personnel qui aura ainsi le sentiment d'avoir contribué de manière créative au programme d'assurance de la qualité.

Le personnel du laboratoire est responsable de l'observation du plan approuvé, dont le succès ou l'échec dépend en fin de compte du comportement des analystes. Ceux-ci, qui constituent en pratique le premier échelon de la "gestion" de tout programme d'assurance de la qualité, doivent exécuter correctement leur travail, le documenter et en faire la critique pour garantir qu'il répond à des normes acceptables.

Ainsi, chacun des trois groupes précités (analystes, unité AQ et administration) doit apporter sa contribution à la bonne exécution du programme d'assurance de la qualité. Les analystes apportent leurs compétences techniques, qui sont nécessaires à la préparation du programme, et veillent à son application dans leurs activités quotidiennes.

L'unité AQ contrôle l'observation du programme par le personnel et, sur la base de ses inspections, adresse des recommandations à l'administration, laquelle étudie les rapports de l'unité et se prononce sur ses recommandations.

1.5 Références

Les publications signalées ci-dessous contiennent des données générales sur la gestion des programmes d'assurance de la qualité:

1. NAMAS Executive 1989. General criteria of Competence for Calibration and Testing Laboratories. National Physical Laboratory, Teddington, TW11 OLW, U.K.
2. Uelner, A.F. 1984. The Watchdog of the Industry, Concepts, Toxicol. 1 (93-102) Karger, Basel.
3. Kilshaw, D. Quality Control & Assurance, MLW, June 1986, pp 25 and 26.
4. Loftus, P. 1986. Quality Assurance. Water Bulletin Supplement 21.3.86, pp 3 and 4.
5. Waddell, A. 1988. The Importance of Quality, International Good Laboratory Practice Conference, Stratford, England.
6. Taylor J.K. The Quest for Quality Assurance, American Laboratory, October 1985, 67-75.
7. Anonyme. 1984. Report of Task Force "D" at the International Laboratory Accreditation Conference, London, U.K. Department of Trade and Industry, London, U.K.
8. Garfield, F.M. 1984. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
9. Taylor, J.K. 1987. Quality Assurance of Chemical Measurements, Lewis Publishers, Inc., Chelsea, MI.
10. Weatherwax, J., and P.G. Martin. 1986. Manuals of Food Quality Control. 1. The Food Control Laboratory, 2nd ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

2. LE PROGRAMME D'ASSURANCE DE LA QUALITE

2.1 Définition

Un programme d'assurance de la qualité peut être défini comme étant un mécanisme qui sert à garantir que les données produites par un laboratoire sont de la plus haute qualité. Pour obtenir cette garantie, il faut veiller à ce que toutes les opérations du laboratoire soient faites comme il se doit. En outre, la documentation disponible permet de réactualiser les données selon les besoins.

2.2 Préparation

La préparation d'un programme d'assurance de la qualité doit tenir compte de tous ses divers éléments. L'Institut national de la sécurité et de la médecine du travail des Etats-Unis (1) a identifié plus de vingt éléments qui peuvent être inclus dans un programme d'assurance de la qualité:

- a) Exposé des objectifs
- b) Déclarations de politiques
- c) Organisation
- d) Planification qualitative
- e) Procédures opérationnelles standard
- f) Registres
- g) Procédures de garde
- h) Mesures correctives
- i) Formation en matière de qualité
- j) Contrôle de la documentation
- k) Etalonnage des appareils
- l) Maintenance préventive
- m) Réactifs et étalons de référence
- n) Achats et contrôles
- o) Identification et contrôle des échantillons
- p) Analyses et contrôles en laboratoire
- q) Programmes d'essais inter et intralaboratoires
- r) Manutention, entreposage et fourniture des échantillons
- s) Contrôle qualitatif statistique
- t) Validation des données
- u) Inspection du système

L'élément e), à savoir Procédures opérationnelles standard (POS), décrit toutes les procédures autres que les méthodes d'analyse. Il peut s'agir d'une procédure administrative de routine non analytique, par exemple le montage d'un instrument, ou d'une quelconque autre procédure appliquée dans le laboratoire. En général, les POS décrivent des activités de manière suffisamment détaillée pour qu'elles puissent être effectuées sans supervision et, parfois, sans formation préalable. Une méthode d'analyse peut figurer dans les POS, mais il vaut mieux qu'elle fasse l'objet d'un document distinct. L'assurance de la qualité couvre toutes les opérations d'un laboratoire, et non uniquement les analyses. Toutes ces opérations sont contrôlées et ne peuvent l'être que s'il existe un relevé écrit de ces activités (ou peut-

être un enregistrement sur ordinateur, mais dans ce cas on dispose de sorties d'imprimante). L'ensemble de ces documents écrits constituent les POS.

En raison de la nature diverse des laboratoires de contrôle des aliments, un programme uniforme unique ne saurait englober toutes les activités de laboratoire. Un programme d'assurance de la qualité doit être adapté aux fonctions de tel ou tel laboratoire. Il ne doit cependant pas être spécifique au point de ne pouvoir être appliqué que dans un seul laboratoire. Un bon programme doit être suffisamment souple pour qu'il puisse, avec de petites modifications, être utilisé par différents laboratoires qui accomplissent des tâches fort semblables.

Un programme efficace d'assurance de la qualité est simple. Il doit être clair, concis, intelligible, non excessivement long et ennuyeux et ne pas contenir trop de détails inutiles ou sans importance. Un programme compliqué suscitera probablement l'hostilité et donc le désintérêt des analystes.

Un programme efficace d'assurance de la qualité doit être pratique en ce qui concerne la durée et le coût des analyses. Si son application requiert une proportion excessive de la journée de travail des analystes, cela signifie qu'il n'est pas correctement équilibré. Un programme efficace devrait aboutir à une réduction de la durée et du coût des analyses, vu qu'il sera rarement nécessaire de les refaire.

Il n'est pas indispensable que tous les 21 éléments précités soient pris en compte dans un programme d'assurance de la qualité. Une importance variable pourra être attachée à chacun de ces éléments selon le programme en cause. Garfield (2) propose une formulation beaucoup plus simple des programmes d'assurance de la qualité, prévoyant trois éléments essentiels:

- a) La prévention, qui exige une planification ordonnée et une série d'actions positives avant ou pendant les analyses pour garantir que tous les systèmes analytiques fonctionnent convenablement (par exemple étalonnage et entretien des appareils, utilisation de milieux de culture microbiologiques standard, formation).
- b) L'évaluation, forme de contrôle qui comporte l'étude périodique du rendement des analystes (par exemple essais de vérification sur échantillons, validation des méthodes).
- c) Les mesures correctives: détermination des causes des défauts de qualité et restauration du bon fonctionnement des opérations analytiques (par exemple suppression de l'origine du mauvais fonctionnement des appareils, réévaluation des méthodes, organisation de cours de perfectionnement).

La forme finale à donner au programme d'assurance de la qualité relève d'une décision à la fois scientifique et administrative. Les opérations analytiques quotidiennes du laboratoire de contrôle des aliments serviront à déterminer les éléments à inclure dans le programme. L'administration devra ensuite établir le degré de priorité de ces éléments et l'ampleur des ressources analytiques à allouer au programme.

2.3 Le manuel sur l'assurance de la qualité

Tout laboratoire qui applique un programme d'assurance de la qualité devrait disposer d'un manuel relatif à ses opérations. L'Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (3) définit ainsi le manuel sur l'assurance de la qualité: document écrit qui décrit les politiques, l'organisation, les finalités, les opérations fonctionnelles et les activités concrètes d'assurance de la qualité conçues pour atteindre les objectifs qualitatifs du laboratoire. Un manuel standard pourrait contenir les éléments suivants:

- a) Page de titre, avec la signature de tous les agents certificateurs.
- b) Table des matières.
- c) Organigramme, avec indication exacte du point où s'insère le laboratoire.
- d) Objectifs du programme d'assurance de la qualité.
- e) Principes essentiels du programme d'assurance de la qualité (voir plus haut).
- f) Fiches de documentation.
- g) Rendement et fréquence des inspections.
- h) Mesures correctives et de suivi.

Le manuel AQ devrait contenir un exposé, tant général que spécifique, de la politique d'assurance de la qualité. Par exemple, le manuel d'assurance de la qualité du Bureau des denrées alimentaires de l'Administration des aliments et drogues (FDA) des Etats-Unis (4) comporte une déclaration de politique générale: "Le programme d'assurance de la qualité du Bureau des denrées alimentaires a pour objet de maintenir au plus haut niveau la qualité et l'intégrité des données du Bureau. Les politiques, procédures et instructions du présent manuel instituent un programme d'assurance de la qualité uniformément applicable à tous les services de laboratoire du Bureau. Le manuel couvre les études non cliniques et autres du laboratoire et les échantillons réglementaires. Tout le personnel qui participe à la supervision ou à la conduite des travaux du laboratoire est tenu de suivre les instructions du manuel."

En plus de cette déclaration de politique générale, on trouve dans le manuel précité des informations plus spécifiques, par exemple la définition des responsabilités aux divers niveaux organisationnels pour l'application du programme, la liste des laboratoires (quel que soit leur emplacement) visés par le programme d'assurance de la qualité, des références sur les méthodes de laboratoire recommandées, les droits de propriété des données du laboratoire et les dérogations aux déclarations de politique.

L'Annexe 1 donne un exemple, accompagné de commentaires, de certains des éléments qui pourraient être inclus dans un manuel AQ.

2.4 Application

L'application effective d'un programme d'assurance de la qualité est un effort coopératif auquel participent l'administration, les membres de l'unité AQ et les analystes. L'administration décide du montant des ressources à affecter au programme d'assurance de la qualité. Cette décision délimite la nature et l'ampleur de l'unité AQ. Durant l'élaboration

du plan d'assurance de la qualité, l'unité bénéficie du concours technique des analystes. Une fois formulé par l'unité et approuvé par l'administration, le plan d'assurance de la qualité devient opérationnel. Dès lors, les analystes sont responsables de son application journalière. L'unité AQ vérifie périodiquement le niveau d'observation du plan et transmet ses rapports et recommandations à l'administration qui intervient en conséquence pour faciliter la réalisation du programme.

2.5 Références

1. National Institute of Occupational Safety and Health. 1976. Specification for Industrial Hygiene Laboratory Quality Program Requirements. National Institute for Occupational Safety and Health, Cincinnati, OH.
2. Garfield, F.M. 1984. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. Association of Analytical Chemists, Arlington, VA.
3. U.S. Environmental Protection Agency. 1980. Guidelines and Specifications for Preparing Quality Assurance Project Plans. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
4. U.S. Food and Drug Administration. 1982. Bureau of Foods Laboratory Quality Assurance Manual. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC.

3. LE LABORATOIRE

3.1 Conception du laboratoire

Même si les plans définitifs du laboratoire sont établis par des architectes et des ingénieurs, les analystes devraient être consultés à propos de certaines décisions qui affecteront en fin de compte leur milieu et leurs conditions de travail. On expose ci-après divers points que les analystes devraient examiner au cas où ils seraient appelés à participer à la conception de leur laboratoire.

Weatherwax et Martin (1) ont procédé à un examen complet et détaillé de la création d'un laboratoire de contrôle des aliments. Celui-ci peut avoir plusieurs fonctions: analyser les métaux-traces, les additifs, les nutriments et les substances toxiques, et aussi réaliser des analyses microbiologiques de base. On discutera dans ce chapitre des questions à prendre en considération lors de la conception d'un laboratoire de microbiologie alimentaire.

Généralités

Le plan de masse du laboratoire devrait être préparé en fonction de critères d'efficacité. Par exemple, la distance que le personnel doit parcourir pour effectuer les diverses étapes des activités analytiques devrait être aussi brève que possible.

Il faut aussi prévoir l'emplacement des services auxiliaires, par exemple un atelier, à moins de pouvoir faire appel à des contractants extérieurs pour tout ce qui touche à la maintenance du laboratoire (plomberie, électricité, appareils électroniques et électriques non utilisés pour les analyses).

Il faut aussi prévoir des locaux pour le secrétariat, des toilettes et des lavabos, ainsi qu'une cantine, même simple, sans oublier des magasins pour les échantillons, l'équipement, les produits chimiques et la verrerie. Le lieu de stockage des échantillons doit être protégé contre les parasites.

Le laboratoire de microbiologie

L'idéal serait que le laboratoire de microbiologie soit non pas un local polyvalent, mais comporte une série de salles séparées pour l'entreposage de la verrerie, le stockage des milieux déshydratés, la préparation et la stérilisation des milieux, l'animalerie (éventuellement), la décontamination des substances pathogènes ou dangereuses, ainsi que pour le personnel. Les laboratoires de réglementation ont besoin de locaux distincts pour entreposer les échantillons à analyser et garder des portions d'échantillons déjà analysés. En réalité, cela n'est pas toujours possible et il faut alors parvenir à une solution de compromis. De nombreux laboratoires de microbiologie disposent d'une seule pièce avec une paillasse centrale où sont préparés milieux et réactifs et où sont effectuées les analyses microbiologiques. Dans cette pièce peuvent aussi être aménagés des espaces de grandeurs diverses pour le stockage des milieux et de la verrerie. D'autres opérations, comme la décontamination des matières pathogènes, l'entreposage des échantillons à analyser, le

stockage des échantillons de réserve, le maintien de l'animalerie, etc., ne devraient cependant être conduites dans un seul et même local. Les milieux, les réactifs et la verrerie qu'il faut garder dans le local où sont réalisées les analyses microbiologiques devraient être tenus dans des récipients hermétiquement fermés et tous ces articles devraient être conservés dans des armoires dépourvues de poussière et dotées si possible de portes coulissantes. Sauf en cas d'utilisation, les portes devraient être fermées en permanence.

L'autoclave à chargement latéral représente sans doute l'appareil le plus coûteux de nombreux laboratoires microbiologiques. Il est cependant recommandé d'utiliser des autoclaves différents pour stériliser les milieux et décontaminer les matières pathogènes afin de réduire au minimum le risque de contamination croisée. Idéalement, les deux autoclaves devraient se trouver dans des locaux distincts ou, en tout cas, suffisamment éloignés l'un de l'autre s'ils sont dans la même pièce.

Alors que les grands laboratoires de microbiologie peuvent faire nettoyer leur verrerie par un service centralisé indépendant, le personnel des petits laboratoires devra probablement laver sa propre verrerie. Si tel est le cas, la verrerie peut être lavée dans la pièce contenant l'autoclave de décontamination ou, au besoin, dans celle où se trouvent deux autoclaves (décontamination et stérilisation).

Il convient d'envisager l'aménagement d'un local, même petit, destiné au personnel, non seulement pour assurer un plus grand degré de sécurité aux analystes, mais aussi pour garantir l'intégrité des échantillons. Il sera toujours déconseillé, voire souvent interdit, de manger, de boire et de fumer dans le laboratoire proprement dit; il incombe à l'administration de prévoir une autre pièce à cet effet.

Pour faciliter une évacuation rapide en cas d'incendie, etc., il faut ménager au moins deux issues de secours dans chaque local, si la chose est réalisable. Les entrées devraient être conçues de manière à réduire au minimum le transit des personnes.

Lors de la conception d'un nouveau laboratoire, il faudrait prendre en compte l'expansion possible des effectifs et des activités. Dans la plupart des laboratoires inaugurés depuis peu, dès le début des opérations le personnel semble trouver les locaux trop petits. Les administrateurs devraient donc garder présentes à l'esprit les projections relatives au personnel, au nombre et au type des échantillons, ainsi qu'aux besoins en matériel.

Les murs devraient être revêtus de peinture imperméable et anti-moisissure, laissant une superficie lisse, étanche et facile à nettoyer.

Dans beaucoup de laboratoires microbiologiques, la surface des parois n'est pas suffisamment utilisée. Cet espace devrait si possible servir à l'installation de rayonnages supplémentaires, protégés par des plaques de verre coulissantes pour entreposer des milieux de culture, des produits chimiques et d'autres matières en un lieu exempt de poussière.

Comme les microbiologistes doivent rester debout plusieurs heures pendant une journée de travail normale, les sols devraient être relativement confortables. Il est recommandé d'utiliser des carreaux de céramique résistants, imperméables et faciles à nettoyer. Pour accroître le confort, des tapis de caoutchouc peuvent être disposés en divers points choisis du laboratoire. Il est déconseillé de mettre des plaques de linoléum sur des

dalles de ciment car les interstices entre les plaques ne peuvent être correctement nettoyés. En outre, avec le temps, le linoléum se fendillera, créant ainsi de nouvelles zones propices à la prolifération des bactéries.

Dans la mesure du possible, le laboratoire de microbiologie devrait être éloigné de toute source de gaz et de fumée. Ses problèmes de contamination sont exceptionnels et il convient d'installer un système de climatisation centralisé. La climatisation centralisée présente plusieurs avantages. Tout d'abord, l'air est filtré, ce qui réduit le risque de contamination du laboratoire. Ensuite, comme les fenêtres sont fermées, il y a peu de courants d'air susceptibles de provoquer une contamination croisée. En troisième lieu, la fermeture des fenêtres abaisse la possibilité de contamination des échantillons et des surfaces libres du laboratoire par les mouches et autres insectes volants. Quatrièmement, la climatisation régularise l'hygrométrie (un taux de 50 % est optimal), atténuant ainsi les problèmes posés par les milieux et produits chimiques hygroscopiques, notamment dans les pays tropicaux. En outre, une humidité excessive pendant de longues périodes peut favoriser la prolifération des moisissures dont les spores, en suspension dans l'air, peuvent fausser le résultat des analyses. Enfin, la climatisation stabilise la température ambiante, ce qui permet aux incubateurs de mieux fonctionner. Etant donné que de nombreux incubateurs à air chaud n'ont pas de système de réfrigération incorporé, la température la plus basse qu'ils peuvent maintenir correspond à celle du milieu ambiant, soit 21-23°. Dans les pays tropicaux, la température ambiante peut dépasser 30 ou même 35°, et les incubateurs ne peuvent fonctionner efficacement si la température du local est supérieure à 23°.

L'incapacité de maintenir la température ambiante à une valeur relativement constante peut aussi interférer sur le fonctionnement des pH-mètres. Une température élevée peut aussi dérégler la composition ou l'intégrité des milieux et réactifs thermosensibles ou réduire la viabilité des cultures de base qui sont normalement conservées à 21-23°.

Les ventilateurs ne représentent pas un système de ventilation efficace: ils soulèvent la poussière et peuvent être une importante cause de contamination croisée dans le laboratoire de microbiologie.

Même si la climatisation est centralisée, de la suie et d'autres fines particules passeront à travers les orifices de sortie du réseau de ventilation. Il faudrait donc placer des filtres sur ces orifices et les changer au moins une fois par an, ou plus fréquemment si le besoin s'en fait sentir. Le personnel du laboratoire devrait indiquer par écrit dans un registre la date à laquelle il convient de remplacer les filtres.

Lors de la préparation des plans du laboratoire, les microbiologistes pourraient demander l'installation de hottes d'aération ou d'aspiration. Chaque hotte devrait avoir son propre système d'approvisionnement en gaz, eau, air comprimé et électricité. Les acides forts, les solvants et les substances similaires devraient être utilisés sous ces hottes. Pour assurer le maximum d'efficacité, le châssis des hottes devrait être placé à la hauteur préconisée par le fabricant. Un représentant de l'usine ou le personnel d'entretien des bâtiments devrait vérifier chaque année l'efficacité de la ventilation. Le personnel du laboratoire devrait cependant tenir un registre de ces contrôles. Il ne faut pas utiliser les hottes pour y entreposer du matériel pendant un certain temps. On ne devrait garder sous la hotte qu'une quantité de produits chimiques correspondant à trois jours d'utilisation.

La présence de fenêtres n'est nullement déconseillée; toutefois, les milieux de culture, les produits chimiques et les réactifs devraient être conservés dans des endroits non directement exposés à la lumière solaire qui pourrait les altérer. De même, les analyses ne doivent pas être faites directement à la lumière solaire, car les résultats pourraient être faussés.

Le banc de travail ou paillasse est le centre d'activité du laboratoire de microbiologie. Il doit servir exclusivement aux analyses microbiologiques et ne doit pas être utilisé pour entreposer du matériel, des milieux de culture et d'autres articles. Il ne devrait pas servir de support à des rayonnages. La paillasse devrait être construite en matériaux non poreux, imperméables, exempts de craquelures, de lignes d'assemblage apparentes et d'autres défauts où pourraient se nicher des microorganismes. L'espace situé sous la paillasse peut être utilisé pour y loger de petites armoires ou des meubles à tiroirs, mais il faut prévoir des renforcements d'au moins 90 cm pour que les analystes puissent travailler commodément assis. La paillasse devrait être convenablement approvisionnée en gaz, pompe à vide, air comprimé, électricité, eau distillée et eau courante chaude et froide.

En plus du banc principal ou central, on devrait prévoir une ou plusieurs paillasses auxiliaires. Certains appareils de laboratoire, par exemple les bains-marie, engendrent des vibrations et ne devraient donc pas être placés sur une même paillasse à côté d'instruments délicats tels que microscopes et balances analytiques.

3.2 Surveillance de l'environnement

Généralités

Il importe de surveiller l'environnement où se trouvent les échantillons, leurs extraits, le personnel et l'équipement afin que la qualité des résultats ne soit pas affectée. Les relevés de surveillance devront établir que:

1. les échantillons sont réceptionnés, entreposés, manipulés et analysés dans des conditions environnementales non susceptibles de nuire aux analyses;
2. la température, l'hygrométrie et l'illumination sont convenablement contrôlées dans les zones névralgiques pour protéger les échantillons, leurs extraits, le personnel et l'équipement;
3. les résultats de l'inspection du milieu ambiant du laboratoire sont consignés dans un registre.

Le laboratoire de microbiologie

D'ordinaire la surveillance microbiologique de l'environnement comporte l'examen des surfaces et de l'atmosphère du laboratoire pour rechercher la présence de microorganismes. Le contrôle des surfaces permettra de déterminer la propreté d'une zone de travail au cours d'une période prolongée ou de diverses zones à un moment donné, la fréquence requise des opérations de nettoyage, l'efficacité des désinfectants sur les paillasses, la fréquence nécessaire des opérations de désinfection des paillasses et l'efficacité de la hotte à flux laminaire. Le contrôle de l'atmosphère servira à déterminer l'efficacité

des filtres à air et la fréquence optimale de leur remplacement, ainsi qu'à détecter d'éventuelles sources environnementales de contamination des échantillons.

Le dénombrement des microorganismes sur les superficies du laboratoire peut se faire soit selon la méthode par contact au tampon (Annexe 2), soit selon la méthode RODAC par contact direct à la gélose (Annexe 3). La méthode RODAC est particulièrement indiquée pour les surfaces plates et imperméables. Elle ne devrait pas être utilisée dans le cas des surfaces irrégulières ou crevassées. Elle convient parfaitement pour les surfaces plates qui ont été nettoyées et désinfectées ou stérilisées. Dans le cas des surfaces fortement contaminées, on observera une énorme prolifération dans les boîtes de Petri de la méthode RODAC.

Il faudrait contrôler la qualité microbiologique de l'air du laboratoire au moins deux fois par semaine pour s'assurer que le milieu ambiant ne constitue pas une source de contamination importante. A cet effet, une méthode simple mais efficace est celle de la sédimentation ou des "retombées" sur plaques. On dispose en divers points du laboratoire des boîtes de Petri contenant un milieu non sélectif, par exemple de la gélose; le choix de ces emplacements peut se faire sur la base de facteurs tels que la circulation des personnes ou l'ampleur relative des travaux analytiques. Après une exposition de 15 minutes, les boîtes sont couvertes et mises à incuber à 35° pendant 48 ± 2 heures. Ensuite, les résultats de dénombrement sont consignés dans un registre relié. S'il y a plus de 15 colonies par boîte, cela signifie que la qualité microbiologique de l'atmosphère ne convient pas pour les analyses. Dans ce cas, il faudra interrompre l'activité du laboratoire, désinfecter toutes les superficies et réévaluer la qualité microbiologique de l'air ambiant avant la reprise des opérations normales du laboratoire. Pour les laboratoires qui souhaiteraient recourir à une procédure plus perfectionnée, il existe divers types d'échantillonneurs d'air ambiant, par exemples des échantillonneurs à tamis, des échantillonneurs à fractionnement et des échantillonneurs centrifuges, tous instruments décrits en détail dans un recueil de méthodes pour l'examen microbiologique des aliments publié par l'Association américaine de la santé publique (2).

3.3 Services de nettoyage

Les sols, les paillasses et autres superficies du bâtiment doivent être nettoyés. Il faut aussi nettoyer les sorbonnes, les dépoussiéreurs, le matériel et la verrerie. Les congélateurs et les réfrigérateurs doivent être vidés et nettoyés de temps à autre, sans nuire à l'intégrité de leur contenu. Les préposés au nettoyage dépourvus de formation technique peuvent hésiter quelque peu à nettoyer le matériel analytique de crainte de l'endommager. Inversement, les analystes peuvent redouter leurs interventions. Dans ce cas, l'administration devra décider que les analystes s'occuperont du lavage de leur matériel, tandis que le personnel de nettoyage sera responsable des autres secteurs. Il faudra alors établir des plans de nettoyage diversifiés.

Toutes les superficies devraient être fréquemment nettoyées avec un chiffon humide. L'absence de poussière sur les rayonnages est l'indice d'un nettoyage correct. Les sols devraient être régulièrement passés à la serpillière humide et désinfectés pour empêcher l'accumulation de résidus où les bactéries pourraient survivre et proliférer. L'encausticage fréquent donne lieu à l'accumulation de cire souillée, notamment sur les plinthes, et n'est donc pas conseillé.

Il faudrait tenir des relevés des opérations de nettoyage, qui permettront d'établir que ces dernières ont été effectuées conformément au programme prévu. On devrait aussi s'assurer de temps à autre du degré de propreté du laboratoire.

Si les bancs de travail sont encaustiqués, il convient d'éliminer périodiquement la cire par raclage pour empêcher l'accumulation de saleté.

Il faut établir un programme préventif de désinsectisation pour combattre les mouches, les cafards et d'autres insectes. Ces insectes sont attirés en particulier par les grandes quantités de denrées entreposées. L'emmagasiner prolongé d'aliments en vrac, bien que généralement déconseillé, est parfois inévitable dans les laboratoires de réglementation où les échantillons faisant l'objet d'un contentieux peuvent devoir être gardés pendant de longues périodes. La désinsectisation peut être réalisée par le personnel du laboratoire ou par une entreprise commerciale. On devrait tenir un registre indiquant la date des opérations de désinsectisation.

3.4 Références

1. Weatherwax, J., and P.G. Martin. 1986. Manuals of Food Quality Control. 1. The Food Control Laboratory, 2nd ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
2. American Public Health Association. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd ed., M.L. Speck (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.

4. PERSONNEL

Un laboratoire type de microbiologie alimentaire a généralement deux catégories de techniciens, les analystes qui effectuent les analyses et le personnel auxiliaire qui, formé et supervisé par les analystes, prépare les milieux de culture et les solutions, nettoie la verrerie et les appareils, et pèse les portions à analyser.

Les auxiliaires devraient comprendre l'importance de leurs fonctions et savoir quand signaler à leur chef toute circonstance dépassant leurs connaissances et compétences. On ne discutera pas ici de la formation du personnel auxiliaire puisqu'elle relève directement des cadres et que ses fonctions sont habituellement bien définies. La discussion portera sur l'analyste, lequel peut transmettre une partie de ses connaissances au personnel auxiliaire.

4.1 Sélection et qualifications

La sélection du personnel repose sur un principe simple: choisir le candidat le mieux qualifié pour chaque poste. Les avis de vacance devraient comporter une description détaillée du poste à pourvoir, couvrant au moins trois éléments: 1) un paragraphe introductif résumant les fonctions assignées au poste et indiquant avec exactitude la place de ce dernier dans l'organigramme; 2) description détaillée de toutes les tâches et responsabilités de l'analyste; 3) indication du niveau général de supervision et du degré d'autonomie de l'analyste dans son travail.

Certains postes d'analyste dans un laboratoire de microbiologie n'exigent pas nécessairement une formation universitaire. Lors du choix des candidats, il faudrait alors tenir compte de l'expérience pratique, notamment dans la spécialité du poste à remplir.

Indépendamment de ses études et de son expérience, le candidat doit être physiquement capable d'assumer les fonctions du poste. Le candidat retenu doit être en mesure de manipuler les flacons, tubes à essai, boîtes de Petri et autre verrerie de manière correcte et avec rapidité, d'utiliser et d'entretenir le matériel de laboratoire et de pouvoir travailler debout ou assis pendant de longues périodes.

Il faut aussi prendre en considération la personnalité de l'analyste. Dans certains cas, celui-ci devra faire partie d'une équipe et être capable de collaborer avec ses collègues à la réalisation d'un objectif commun. Dans d'autres, il devra travailler de façon plus indépendante. La description de poste devrait indiquer clairement le type de travail à accomplir afin d'éviter des conflits de personnalité.

Le superviseur immédiat, qui connaît parfaitement la nature du poste et travaillera quotidiennement avec l'analyste, devrait participer à la sélection finale du candidat.

4.2 Formation

La formation devrait être organisée en vue de la réalisation des objectifs du laboratoire en général. Un cadre supérieur devrait être chargé de la formation. Les besoins en matière de formation dépendent des objectifs définis du laboratoire. Il faudra parfois assurer une formation dans des domaines analytiques précis, habituellement sur place car il est peu probable que les écoles avoisinantes délivrent un tel enseignement. Il importe aussi que les analystes connaissent bien les principes scientifiques des méthodes qu'ils utilisent. Cette connaissance devrait avoir été acquise lors des études académiques mais, en cas de lacunes, celles-ci doivent être identifiées et comblées par le biais de cours de brève durée, de séminaires, de lectures ou de formation sur place. C'est l'interprétation des résultats qui exige le plus de compétences. Celles-ci peuvent généralement s'acquérir sur le tas, cas par cas.

Les objectifs généraux de la formation pourraient être définis comme suit:

1. garantir que les analystes connaissent à fond les techniques d'analyse;
2. garantir que les analystes développent leur esprit analytique et perfectionnent leurs compétences interprétatives;
3. garantir que les analystes fournissent des données analytiques d'un degré d'exactitude connu et significatives, et concourent à la réalisation des objectifs du laboratoire.

Chaque nouvel employé devrait recevoir des informations générales sur son milieu de travail: horaire, charge de travail, présentation aux collègues et administrateurs, emplacement de la bibliothèque, repas, congés, rémunération, emplacement des laboratoires, méthodes d'élimination des déchets et des matières contaminées, mesures de sécurité et vêtements de travail.

Le nouvel analyste est alors prêt à suivre un programme de formation scientifique sous la direction du superviseur ou d'un analyste d'encadrement. Cette formation devrait se faire directement entre l'instructeur et l'analyste et être conduite en trois étapes. Durant la première phase, l'analyste se familiarise avec tous les aspects du programme d'assurance de la qualité, notamment le fonctionnement et l'entretien des appareils, l'établissement de la documentation relative aux échantillons, la préparation des fiches de travail des analystes, etc. Selon l'ampleur et/ou les particularités du programme d'assurance de la qualité, cette formation pourra durer deux à quatre semaines.

La deuxième phase de la formation pourrait porter sur l'étude des méthodes d'analyse en général, l'utilisation des appareils et la préparation des solutions, des étalons, des milieux, etc. Cette étape peut durer environ deux semaines.

La troisième phase est la plus longue. Elle concerne les techniques analytiques spécifiques du laboratoire. Dans tous les laboratoires de microbiologie alimentaires, il faut enseigner au minimum les méthodes d'identification et/ou de dénombrement des organismes ou groupes d'organismes ci-après: microflore aérobie totale (dénombrement standard sur plaque, dénombrement des aérobies sur plaque ou dénombrement des mésophiles sur

plaque), coliformes totaux, coliformes fécaux, Escherichia coli, Salmonella, Staphylococcus aureus. Selon le type de produits envoyés au laboratoire pour analyse, une formation complémentaire pourra être nécessaire dans les domaines suivants: Campylobacter (volailles, porc, lait cru), Yersinia enterocolitica (viande réfrigérée, légumes crus, produits de la pêche, produits laitiers), Listeria monocytogenes (viande, produits laitiers, légumes), Vibrio cholerae et Vibrio parahaemolyticus (produits de la pêche), Shigella (légumes crus), levures et moisissures (fruits à coque, épices, céréales, aliments en conserve), Bacillus cereus (riz, blé, autres céréales) et Clostridium perfringens (viande). Si le laboratoire doit analyser des conserves alimentaires, l'analyste devrait être formé aux techniques d'identification des organismes susceptibles de détériorer les aliments en conserve. La durée de cette troisième phase de formation dépend de l'ampleur des sujets à couvrir.

Durant l'enseignement de ces techniques d'analyse, l'instructeur ne devrait pas se borner à démontrer une méthode. Il lui faut expliquer les précautions à prendre lors de l'application de la méthode et la nécessité d'analyser sur le champ certains produits, d'entreposer à une température déterminée les échantillons à analyser, d'utiliser un milieu disponible dans le commerce, de recourir à des températures et/ou des durées d'incubation inhabituelles et de veiller à la présence éventuelle de souches atypiques sur une plaque de gélose.

En plus des précautions à observer, l'instructeur devrait indiquer les limites de telle ou telle méthode. Ainsi, une méthode peut ne pas convenir pour tous les aliments, étant insuffisamment spécifique ou ayant une sensibilité réduite.

Pendant toutes les phases de la formation, l'instructeur et son élève devraient s'entretenir fréquemment chaque jour. Il importe d'expliquer les "comment" et les "pourquoi" de chaque étape analytique. Si l'élève ne pose pas de questions durant la période de formation, l'instructeur pourra encourager la discussion en demandant à l'analyste comment il comprend les diverses phases de sa formation. Il convient de tenir un compte rendu de la formation comme indiqué à l'Annexe 1.

En résumé, la formation permet à l'analyste de fournir des résultats d'une qualité acceptable. La formation est donc une activité très importante du laboratoire, dont l'évaluation est fort utile pour en déterminer l'impact et l'efficacité. Cette évaluation devrait se faire pour chaque stagiaire au moyen de colloques singuliers et par l'examen des comptes rendus de formation. Elle peut être effectuée par un superviseur ou un membre de l'unité d'assurance de la qualité. Une ou deux évaluations par an suffiront normalement, à moins que la formation ait été particulièrement intensive. Les résultats des évaluations devraient être discutés avec l'administration en vue d'identifier éventuellement le besoin de modifier le programme de formation, de faire suivre une nouvelle formation aux analystes et de reconsidérer les procédures d'évaluation.

4.3 Comportement professionnel

Généralités

Le programme d'assurance de la qualité peut être intégré dans le mécanisme d'étude et d'évaluation du personnel (une ou deux fois par an). L'examineur doit faire en sorte que l'analyste ne conçoive l'évaluation comme un acte négatif ou menaçant. La finalité de l'évaluation n'est pas uniquement de tester les connaissances de l'analyste; elle doit aussi servir à établir les besoins à court et à long terme en matière de formation, à donner à l'analyste la possibilité unique d'exposer divers problèmes liés à son travail, à permettre au superviseur de reconnaître, louer et documenter le rendement satisfaisant de l'analyste, et à fournir à l'un et à l'autre l'occasion de proposer des améliorations.

Programmes de contrôle par sondage

Un programme de contrôle par sondage est un type de test interlaboratoires servant à déterminer les aptitudes analytiques des participants. Un laboratoire de référence prépare des échantillons d'épreuve homogènes contenant théoriquement des proportions identiques d'éléments microbiologiques. Ces échantillons sont envoyés aux techniciens qui participent au programme, les analyses devant toutes commencer un jour donné.

Il se peut que, pour faire bonne impression, un directeur de laboratoire charge son "meilleur" analyste d'examiner ces échantillons d'épreuve. Sachant qu'il s'agit d'une vérification, l'analyste fera certainement de son mieux. Pour évaluer avec plus de précision la capacité d'un analyste, le superviseur et/ou le directeur du laboratoire peut décider de cacher à l'analyste que les substances à examiner sont en fait des échantillons d'épreuve. Durant leur période d'instruction initiale, les analystes devraient être informés qu'ils pourront être appelés à analyser de tels échantillons dans le cadre du programme d'assurance de la qualité pour apporter la preuve de leur compétence relativement à certains types d'analyses. Il importe que chaque année le plus grand nombre possible d'analystes aient la possibilité d'examiner des échantillons d'épreuve.

Les résultats de l'analyse (quantitative ou qualitative) des échantillons d'épreuve sont communiqués au laboratoire de référence aux fins d'évaluation statistique.

Le laboratoire de référence établit la moyenne des résultats individuels de chaque laboratoire, puis calcule la moyenne des moyennes obtenues par tous les laboratoires et détermine l'écart type. Sur la base d'une distribution normale, 95 % des moyennes pour chaque série de résultats analytique devraient se situer entre +2 et -2 écarts types de la moyenne des moyennes. Il est admis que 5 % (ou 1/20) des moyennes des laboratoires peuvent se trouver en dehors de ces limites. Si toutes les moyennes sont dans la marge de ± 2 écarts types, il est possible que l'écart type soit trop grand. Une moyenne supérieure à ± 3 écarts types ne devrait être enregistrée qu'exceptionnellement.

Lorsque les analyses de vérification sont uniquement qualitatives, la procédure est quelque peu différente. Le laboratoire de référence envoie à chaque laboratoire participant une série d'échantillons d'épreuve, les uns positifs et les autres négatifs. Chacun des échantillons d'épreuve positifs peut contenir diverses proportions (élevées, moyennes et faibles) de l'élément à déterminer. Toutefois, au moins un échantillon positif devrait

présenter une concentration de l'élément à laquelle l'épreuve doit permettre d'opérer une distinction entre résultats positifs et résultats négatifs (seuil de détermination). Les analystes examinent les échantillons d'épreuve et communiquent leurs résultats au laboratoire de référence en indiquant s'ils sont positifs ou négatifs.

Le laboratoire de référence colationne les résultats de tous les participants et les classe comme suit:

- a. conformes - l'analyste a trouvé l'élément dans les échantillons positifs ou ne l'a pas identifié dans les échantillons négatifs.
- b. faussement positifs - l'analyste a signalé la présence de l'élément dans un échantillon négatif.
- c. faussement négatifs - l'analyste n'a pas indiqué la présence de l'élément dans un échantillon positif.

L'existence de résultats aberrants (faussement positifs et faussement négatifs) est une cause de préoccupation. Par exemple, l'identification microbiologique de pathogènes dans des denrées destinées à la consommation humaine est habituellement qualitative car la présence de ces organismes, même à des niveaux très faibles, pourrait représenter une grave menace pour la santé des consommateurs. En ce cas, un résultat faussement négatif serait beaucoup plus dangereux qu'un résultat faussement positif.

Des circonstances atténuantes, indépendantes de la volonté de l'analyste, peuvent cependant être invoquées pour expliquer l'existence de résultats faussement négatifs. Si un résultat de ce genre a été obtenu avec un échantillon microbiologique contenant très peu de pathogène, il se pourrait que ce dernier n'ait plus été viable au moment de l'analyse. Contrairement aux produits chimiques, les microorganismes sont relativement instables et leur devenir dans un aliment est plus difficile à prévoir.

Un résultat faussement négatif peut aussi s'expliquer par une distribution non uniforme de l'organisme dans l'échantillon. Bien que l'idéal serait d'utiliser des échantillons d'épreuve homogènes, dans bien des cas la réalité est totalement différente. Il est beaucoup plus difficile d'obtenir une répartition uniforme d'un microorganisme dans un milieu solide que dans un milieu liquide. On peut même imaginer qu'un microorganisme soit absent d'un échantillon ayant reçu un inoculum très dilué, ce qui conduira à un résultat faussement négatif.

L'obtention de résultats faussement négatifs avec des échantillons auxquels a été administré un inoculum de concentration moyenne ou élevée devrait en revanche préoccuper aussi bien l'analyste que le superviseur. Si ces résultats n'ont aucune justification logique, l'analyste devrait suivre un cours de formation complémentaire.

Bien que les résultats faussement positifs aient une importance moindre que les résultats faussement négatifs, il ne faut pas en sous-estimer la gravité. Quand la proportion de résultats faussement positifs dépasse 10 %, il est impossible d'interpréter les résultats de l'analyse en ce qui concerne la présence ou l'absence de pathogènes (1).

Un autre type d'évaluation est constitué par les études interlaboratoires qui permettent de tester l'efficacité d'une méthode. Le laboratoire de référence prépare des échantillons d'épreuve homogènes et les envoie aux analystes des laboratoires participants. Travaillant de façon autonome, les analystes examinent les échantillons d'épreuve avec la méthode à valider et transmettent leurs résultats au laboratoire de référence. Celui-ci procède à une analyse statistique et l'efficacité de la méthode est exprimée en termes d'exactitude, de reproductibilité et de répétabilité. Chaque analyste reçoit un exemplaire de cette évaluation, ce qui lui permet de comparer ses aptitudes avec celles des autres participants.

Si l'on observe des manquements dans la participation d'un analyste à un programme de contrôle par sondage ou d'évaluation des compétences, le superviseur devrait prévoir une formation complémentaire pour cette personne.

4.4 Références

1. Committee on Interlaboratory Studies. 1988. Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:160-162.

5. ECHANTILLONS

Il existe divers types d'échantillons, chacun ayant sa propre finalité. Les échantillons d'enquête fournissent des renseignements sur les pratiques industrielles à propos d'un sujet déterminé. On peut procéder à une enquête pour établir s'il existe un risque microbiologique associé à une denrée ou à un groupe d'aliments particuliers. Les échantillons pour normes alimentaires donnent des indications servant à l'élaboration de telles normes. Les échantillons officiels sont ceux qui, en cas d'infraction, déclencheront des poursuites judiciaires. Ce chapitre concerne uniquement les échantillons officiels.

5.1 Responsabilité

D'un point de vue juridique ou réglementaire, il est indispensable de tenir un registre permettant de déterminer qui est responsable des échantillons. Autrement dit, il faut que ce registre réponde de l'intégrité d'un échantillon entre son prélèvement et son utilisation finale. En fait, dans les grands laboratoires, l'échantillon officiel est remis non pas directement à l'analyste mais à un employé chargé de le manipuler et de l'entreposer. Dans les petits laboratoires en revanche, l'analyste peut recevoir directement les échantillons à examiner.

Le type de registre à tenir dépend des circonstances. Il peut s'agir d'un registre relativement complexe comme celui adopté par la FDA (Food and Drug Administration) des Etats-Unis (voir Annexe 4), ou d'un modèle plus simple. Si l'on ne dispose pas d'un système informatique, il est recommandé de recourir à des fiches qui peuvent être plus facilement regroupées, classées et consultées. Les fiches doivent cependant contenir un minimum de données. Celles-ci peuvent ou non se trouver dans d'autres documents d'échantillonnage (par exemple rapport de prélèvement, fiche d'analyse, etc.) et permettent de suivre l'échantillon du moment dès son prélèvement à celui de son élimination. Les données et informations minimales à consigner sur la fiche sont les suivantes:

1. Numéro de l'échantillon.]
] (pour repérer la fiche)
2. Nom du produit.]
3. Date du prélèvement.
4. Date de réception au laboratoire (pour le registre de garde).
5. Méthode d'entreposage (à sec, sous réfrigération, sous congélation, etc.)
6. Lieu d'entreposage (en code pour faciliter le repérage).
7. Date de la remise à l'analyste (si elle diffère de la date de l'analyse).
8. Nom de l'analyste (celui-ci devrait parapher l'accusé de réception).

9. Date à laquelle l'échantillon a été renvoyé.
10. Nom de la personne qui a renvoyé l'échantillon (s'il ne s'agit pas de l'analyste lui-même).
11. Méthode et lieu d'entreposage de l'échantillon de réserve.
12. Utilisation finale ou destruction de l'échantillon, méthode employée et date.

La personne qui réceptionne l'échantillon devrait noter le numéro, le type et l'état du conteneur (sac de papier, sachet de matière plastique, bocal, etc.). Elle devrait signaler immédiatement à l'administration les échantillons endommagés ou les conteneurs ouverts.

Pendant toute la période de présence de l'échantillon dans le laboratoire, il faut en assurer l'intégrité physique, qu'il soit entreposé dans une armoire ou qu'il se trouve entre les mains de l'analyste.

5.2 Identification et intégrité

Chaque échantillon est individuellement identifié par un numéro de divers chiffres qui lui est exclusivement attribué. Le plus souvent, un échantillon est constitué de plusieurs sous-unités qui sont chacune identifiées par un numéro ou une lettre inscrit sur un ruban adhésif imperméable. Cette série de numéros ou de lettres peut servir à identifier les sous-unités d'un échantillon. Quand on prélève des sous-échantillons dans un lot, on peut utiliser une combinaison de chiffres arabes et de lettres pour les reconnaître. Par exemple, si l'on prend deux boîtes (a et b) dans chaque caisse d'un lot, on peut les marquer comme sous-unités 1a, 1b, 2a, 2b, etc. provenant des caisses 1, 2, etc.

L'intégrité de l'échantillon entre le moment de son prélèvement et celui de sa consignation au personnel de garde ou à l'analyste du laboratoire de microbiologie est garantie par un emballage cacheté (voir l'exemple donné à l'Annexe 5). Sur ce type d'emballage, l'inspecteur ou le réceptionniste inscrit le numéro de l'échantillon, la date de réception et appose sa signature. Les emballages de papier sont collés sur les conteneurs des échantillons de manière à ne pouvoir être ouverts sans que cela ne puisse être noté.

Lorsque le paquet cacheté parvient au laboratoire, le réceptionniste contrôle l'état de l'emballage. S'il a été ouvert ou manipulé, il en informe immédiatement l'administration.

Une fois que l'analyste a pris la partie de l'échantillon nécessaire pour l'examen, la portion de réserve devrait être renvoyée à l'entrepôt sous emballage cacheté. Il est possible que l'échantillon de réserve ait besoin de plusieurs emballages cachetés. Si le cachet brisé est toujours en place, l'analyste doit veiller à ce qu'il demeure visible quand il applique le nouveau cachet. Cela garantit l'intégrité permanente de l'échantillon.

5.3 Echantillonnage aux fins d'analyse

Avant de prélever la portion à examiner, l'analyste doit s'assurer que tous les registres sont corrects, que l'intégrité de l'échantillon est préservée, que les conteneurs d'échantillons sont intacts et que l'inspecteur a rassemblé et consigné les résultats du contrôle des échantillons (voir plus bas).

Lors du prélèvement sous asepsie d'échantillons microbiologiques, l'inspecteur ou le préposé au prélèvement devrait soumettre chaque échantillon à cinq types de contrôle:

- a. Stérilité du récipient non ouvert. Un récipient stérile non ouvert, stérilisé comme dans le cas des conteneurs utilisés pour les échantillons, devrait être soumis.
- b. Stérilité du récipient ouvert. Au moins un récipient vide, stérilisé comme dans le cas des conteneurs utilisés pour les échantillons, devrait être ouvert puis fermé dans l'aire d'échantillonnage et soumis en même temps que l'échantillon.
- c. Stérilité des gants à jeter après emploi. Si l'on utilise des gants stérilisés à jeter après emploi pour manipuler l'échantillon, il faudrait soumettre un gant non utilisé dans un conteneur stérile.
- d. Matériel d'échantillonnage stérile en emballage non ouvert. Si des instruments d'échantillonnage prérépétés (cuillères, spatules, ciseaux, couteaux, etc.) ont été utilisés, on devrait soumettre au moins un ustensile de chaque type dans un emballage non ouvert.
- e. Matériel d'échantillonnage stérile en emballage ouvert. Au moins un instrument d'échantillonnage de chaque type, mais non utilisé dans l'aire de prélèvement, devrait être soumis sous emballage stérile.

Ces objets doivent être soumis au même examen microbiologique que les portions à analyser, ce qui démontrera si la méthode d'échantillonnage aseptique a influé sur les résultats de l'analyse.

Pour l'examen, l'analyste commence par extraire une portion de chaque sous-échantillon. Si la denrée se présente sous forme pulvérulente, moulue ou triturée, le sous-échantillon sera brassé convenablement avec un instrument stérile avant le prélèvement de la portion à analyser. Les sous-échantillons d'aliments liquides ou pâteux en récipients entièrement remplis peuvent être secoués rapidement 25 fois avant l'extraction des portions à analyser. Les sous-échantillons de produits liquides ou pâteux en récipients remplis à moitié ou aux trois quarts devront être secoués 25 fois selon un arc de 30 cm en l'espace de 7 secondes. Les portions à analyser devront être prélevées immédiatement après avoir mélangé les sous-échantillons liquides ou pâteux.

Il est préférable de ne pas décongeler avant l'analyse les sous-échantillons congelés. Toutefois, s'il faut décongeler ou tempérer un sous-échantillon pour obtenir des portions à analyser, on pourra effectuer la décongélation pendant 18 heures à une température de 2-5°.

Si la décongélation doit être plus rapide, le sous-échantillon peut être décongelé à une température inférieure à 45° pendant 15 minutes. La décongélation rapide doit se faire sous agitation constante dans un bain-marie à thermostat. Il ne faut pas retirer le produit de son conteneur pour en favoriser la décongélation.

Après avoir prélevé les portions d'essai, mais avant que ne commence l'examen microbiologique, l'analyste doit décider s'il convient d'analyser les portions individuellement ou collectivement. Toutefois, à quelques rares exceptions près, les portions destinées à l'analyse microbiologique sont en général examinées individuellement, surtout s'il faut dénombrer ou quantifier les microorganismes.

5.4 Entreposage et destruction des échantillons

Entre le moment de la réception au laboratoire et le début de l'analyse, les échantillons de denrées périssables non congelées doivent être conservés à une température comprise entre 0 et 4°, et les aliments congelés doivent être maintenus dans cet état. Tous les échantillons périssables et congelés devraient être examinés dans les 36 heures suivant leur arrivée. Les échantillons périssables qui ne peuvent être examinés dans les 36 heures consécutives à leur prélèvement devraient être congelés. Toutefois, la congélation d'échantillons microbiologiques réfrigérés risque de détériorer ou même de tuer les cellules microbiennes. Par conséquent, il ne faudrait recourir à cette pratique qu'en dernier ressort et non de façon systématique.

Dans le cas d'échantillons microbiologiques de produits de la pêche non congelés, des mesures spéciales de conservation sont applicables (1). Ces échantillons devraient être examinés dans les 6 heures qui suivent leur prélèvement. Les échantillons conservés à 0-4° pendant plus de 24 heures ne devraient pas être analysés.

Les denrées non périssables en boîte ou sèches peuvent être entreposées à la température ambiante.

Une fois que les portions d'essai ont été extraites de l'échantillon, la partie restante est à nouveau emmagasinée. Selon le type des denrées, les échantillons devraient être conservés dans les conditions recommandées à l'Annexe 6.

Les portions de réserve des échantillons microbiologiques contenant des microorganismes pathogènes et/ou des toxines microbiennes devraient être étuvées avant leur élimination. Les aliments secs devraient être étuvés en plus faibles quantités (0,5 - 1 kg) pour garantir une pénétration adéquate de la vapeur afin de détruire tous les organismes pathogènes viables. Il convient d'ajouter environ 1 litre d'eau par 500 g d'aliment sec pour permettre une production suffisante de vapeur pendant le cycle de stérilisation. Au besoin, l'échantillon de réserve sec peut être additionné d'eau pour dissoudre ou défaire les gros grumeaux de matière solide.

5.5 Emballage et expédition

En règle générale, l'inspecteur ou le collecteur est responsable de l'emballage et de l'expédition des échantillons de produits alimentaires. A l'occasion, cependant, l'analyste devra envoyer un échantillon à un autre laboratoire pour une analyse de confirmation ou

pour une autre raison. Les échantillons doivent être emballés et expédiés de telle sorte que leur intégrité soit maintenue. Le conteneur où se trouve l'aliment peut être placé dans un sac en matière plastique et fermé hermétiquement au moyen d'un plomb ou d'une agrafe métallique. Les récipients rigides comme les bocaux de verre peuvent être fermés avec de la cire à cacheter qui pourra porter une marque officielle d'identification.

Les échantillons congelés à expédier devraient être conditionnés avec de la neige carbonique dans des cartons isothermes. Des précautions particulières doivent être observées dans ce cas: ne pas manipuler la neige carbonique à mains nues, ne pas la transporter dans un véhicule insuffisamment ventilé, ne pas la mettre dans des conteneurs hermétiquement fermés qui pourraient exploser sous l'effet d'une pression excessive, et indiquer clairement que le paquet contient de la neige carbonique de manière que le transporteur prenne les précautions nécessaires. La congélation à la neige carbonique n'est efficace que pendant 48 heures au maximum. Il ne faut jamais utiliser moins de 15 kg de neige carbonique pour une expédition d'une douzaine d'heures. Avec un échantillon pesant moins de 15 kg, utiliser 15 kg de neige carbonique et en ajouter 1 kg pour chaque portion supplémentaire de 500 g d'échantillon. La quantité de neige carbonique devrait être augmentée si le transport dure longtemps ou lorsque le temps est particulièrement chaud. Dans tous les paquets contenant de la neige carbonique, celle-ci devrait autant que possible être également répartie. Si des sous-échantillons ont été mis dans des sacs en matière plastique, il faut envelopper la neige carbonique de feuilles de papier pour éviter qu'elle ne touche directement les sacs. En effet, le froid intense engendré par la neige carbonique rend les matières plastiques friables.

Pour s'assurer que les échantillons microbiologiques ne se sont pas décongelés durant le transport, on peut placer dans le paquet un conteneur, identique à ceux des échantillons, et le remplir à moitié d'éthylène-glycol. A l'arrivée au laboratoire, on pourra mesurer et noter la température du conteneur témoin. Comme autre indicateur de décongélation, on peut utiliser un sac étanche rempli de glace en écailles.

Pour expédier des échantillons périssables sous réfrigération, il est possible d'employer soit de la glace normale, soit des sachets commerciaux de gel cryogène. Comme ces sachets contiennent un produit chimique, il faudrait les placer dans des sacs en matière plastique hermétiquement fermés pour protéger l'échantillon de toute contamination au cas où le sachet de cryogène se romprait durant le transport. On devrait utiliser des conteneurs ou des caisses isothermes. Pour s'assurer que la température maximale requise n'a pas été dépassée durant le transport, on peut inclure dans le paquet un conteneur d'eau du même type que celui renfermant les échantillons. A l'arrivée, la température de l'eau peut être mesurée et notée.

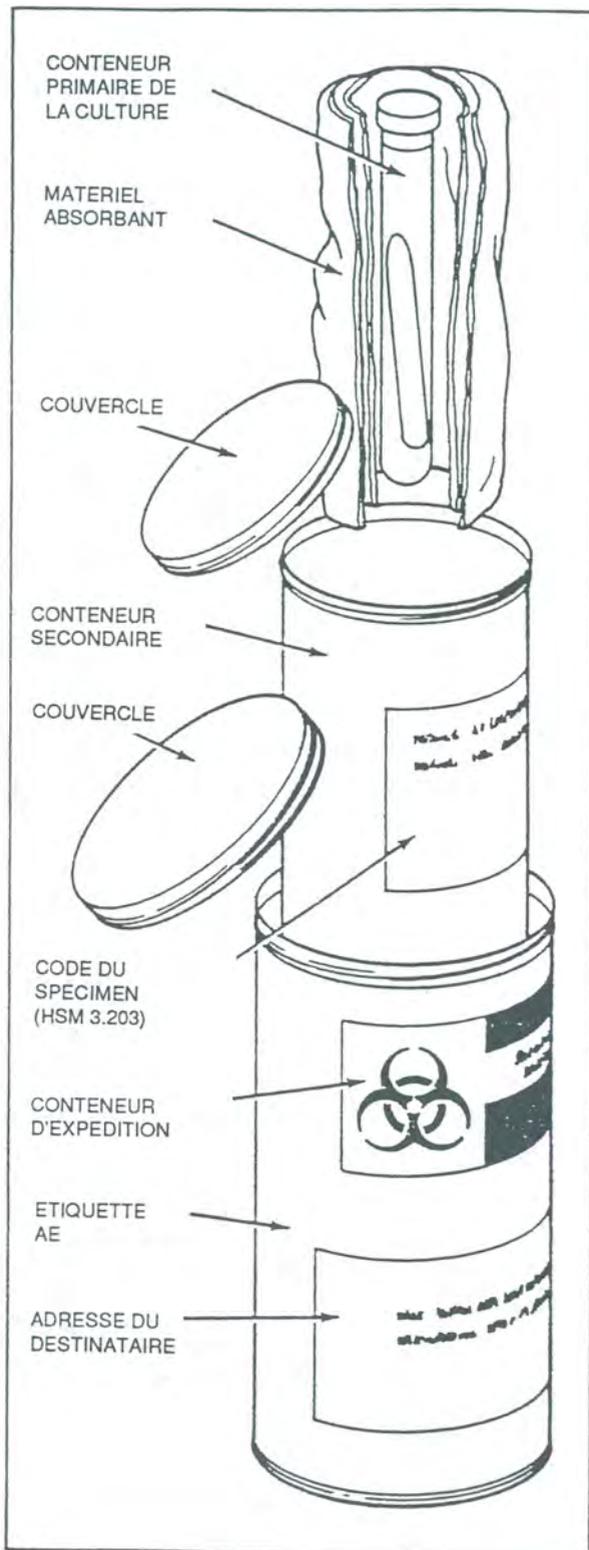
Les échantillons secs non périssables devraient être conditionnés dans des boîtes de carton fort avec des matériaux d'emballage appropriés pour éviter toute rupture pendant le transport.

Les échantillons devraient être acheminés le plus rapidement possible et le transporteur devrait aviser le destinataire du moment où on lui livrera l'échantillon.

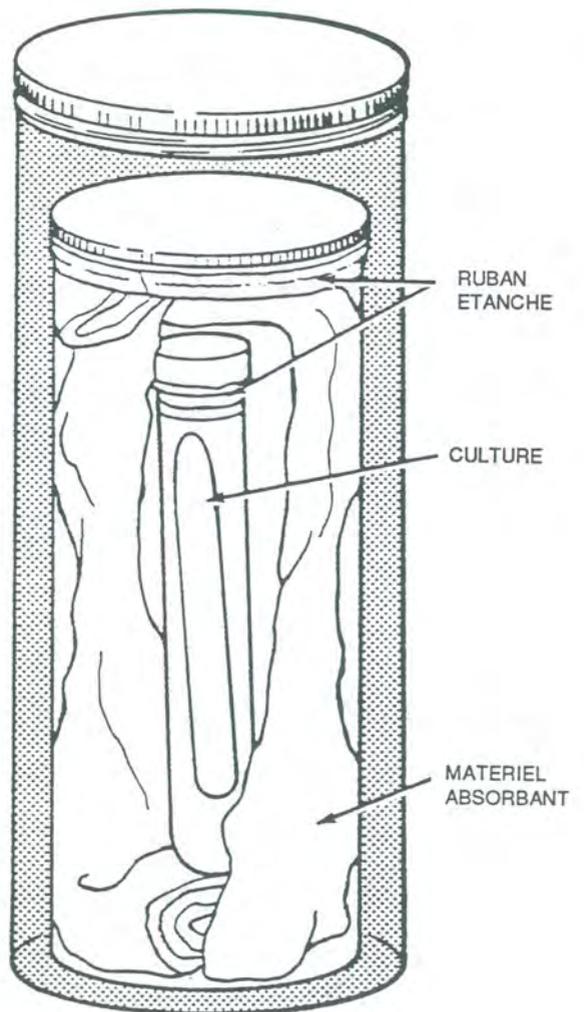
L'emballage et l'expédition d'agents étiologiques ou d'autres produits biologiques requièrent des précautions spéciales. Une solution serait de conditionner ces substances dans des conteneurs étanchéifiés à l'intérieur pour empêcher toute fuite. Pour l'envoi de produits

non secs, le récipient interne devrait être emballé avec suffisamment de matériel amortisseur absorbant capable de s'imprégner du contenu en cas de fuites. Le matériel amortisseur et le récipient interne de produit liquide ou pâteux devraient ensuite être placés dans un conteneur externe imperméable et hermétiquement fermé; ce dernier peut aussi servir de conteneur de transport.

La procédure de transport des cultures recommandée par l'American Type Culture Collection (2) est la suivante (voir figure 1): la culture est sur une lame oblique contenue dans un tube à couvercle à vis (conteneur primaire) hermétiquement fermé avec un ruban adhésif; le tube est bien protégé par du matériel d'emballage absorbant dans le conteneur secondaire, lui aussi à couvercle à vis et hermétiquement fermé avec un ruban adhésif; le conteneur secondaire est placé dans le conteneur d'expédition et protégé avec du matériel absorbant; enfin, le couvercle est vissé et, à l'extérieur du conteneur de transport, sont apposées une étiquette avec l'adresse du destinataire et une autre qui signale la présence d'agents étiologiques.



EMBALLAGE ET ETIQUETAGE DES AGENTS ETIOLOGIQUES



SCHEMA D'UN CONDITIONNEMENT CORRECT

Figure 1

5.6 Références

1. American Public Health Association. 1985. Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish, 5th ed., A.E. Greenberg and D.A. Hunt (Eds.). American Public Health Association, Washington, DC.
2. ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. 1985. R.J. Hay (Ed.). American Type Culture Collection, Rockville, MD.

6. MATERIEL

6.1 Maintenance et réparation

Pour produire des données microbiologiques fiables, il est essentiel d'avoir du matériel qui fonctionne bien. On trouvera ci-après une liste des appareils nécessaires pour réaliser des analyses microbiologiques de base, ainsi que des indications sur la façon correcte de les entretenir et réparer.

Étuves à incubation

L'étuve à circulation d'air est l'appareil le plus couramment utilisé dans tout laboratoire de microbiologie alimentaire. Bien que la plupart des fabricants affirment que la température interne n'est pas affectée par les variations normales de la température ambiante, certains modèles sont au contraire très sensibles à des écarts minimes de cette dernière. Étant donné que le maintien d'une température ambiante stable ne dépend pas toujours de l'analyste, celui-ci devrait être attentif à toute variation importante, notamment lors du passage d'une saison à l'autre, afin de pouvoir appliquer les mesures correctives nécessaires. Le degré de température à maintenir dans les étuves devrait être clairement indiqué à l'extérieur des appareils.

Certaines étuves à circulation d'air sont pourvues d'un dispositif de régulation du degré hygrométrique à l'intérieur de l'enceinte, utilisant de l'eau adoucie ou partiellement déionisée. Même si bon nombre de dispositifs sont construits en acier inoxydable non corrosif, ils demeurent cependant corrodables. Au moins une fois par mois, il faudrait ôter du thermocouple le thermomètre "humide", vider le dispositif et le nettoyer avec de l'eau douce.

En cas de débordement accidentel, il faut immédiatement nettoyer et désinfecter l'étuve pour empêcher toute contamination croisée ultérieure. Au moins une fois par mois, on devrait nettoyer toutes les parois intérieures avec une solution peu concentrée de détergent et les sécher convenablement avec un chiffon souple. Dans les points particulièrement critiques, on pourra utiliser de la paille de fer non pas ordinaire mais inoxydable. Les plaques de graisse ou d'huile peuvent être éliminées avec du toluène, un diluant à base de naphte ou un solvant analogue. Si les parois en acier inoxydable présentent des taches de rouille, on nettoiera les zones atteintes avec une solution d'acide nitrique à 20 % et d'acide fluorhydrique à 1,5 % ou avec une solution chaude d'acide oxalique à 2-5 %. Après 1 ou 2 minutes, la surface sera rincée avec de l'eau propre pour éliminer toute trace d'acide, puis séchée avec soin. Quand il utilise ces solutions acides, l'analyste devrait porter des gants de caoutchouc et bien aérer le local.

Les récipients placés dans les étuves devraient porter clairement le nom de l'analyste, ainsi que le jour et l'heure du début de l'incubation. Au cas où des produits auraient été laissés par inadvertance trop longtemps dans une étuve, il faudra les enlever, les passer à l'autoclave et les détruire.

Bains-marie

Des bains-marie thermostatiques devraient être utilisés chaque fois que la température doit être maintenue à une valeur constante à 0,1° près. Le couvercle devrait être bien ajusté pour éviter une évaporation excessive de l'eau.

Le rôle essentiel de l'entretien est de prévenir ou de retarder les dommages dus à la corrosion. Il faut contrôler souvent les bains-marie, car une corrosion négligée peut finir par détériorer la pompe à eau et d'autres pièces. Un bain-marie qui demeurera inutilisé pendant plus de deux semaines doit être vidé, lavé avec un détergent léger et soigneusement épongé avec un chiffon souple. Lorsque les bains-marie sont en fonction, on peut ajouter à l'eau un inhibiteur de corrosion. Seule de l'eau distillée devrait être employée dans les bains-marie.

Réfrigérateurs et congélateurs

Tout laboratoire de microbiologie alimentaire devrait avoir un réfrigérateur réglé à 4° et un congélateur réglé à -20° pour la conservation des échantillons, spécimens, milieux, sérums, réactifs et cultures. La température à maintenir dans les réfrigérateurs et les congélateurs devrait être indiquée à l'extérieur de ces appareils.

Il faudrait nettoyer les parois externes au moins une fois par mois avec un chiffon humide. Le compartiment de congélation des réfrigérateurs devrait être dégivré tous les 3 mois et toutes les surfaces internes devraient être nettoyées. Le congélateur devrait être dégivré tous les 6 mois et toutes les surfaces internes devraient être nettoyées. Le système d'alarme signalant une température excessivement élevée dans les réfrigérateurs et les congélateurs devrait être maintenu en état de marche. Tous les récipients placés dans ces appareils devraient avoir une étiquette portant les mentions suivantes: identification du produit, nom du responsable et date du dépôt dans le réfrigérateur ou le congélateur.

Autoclaves

L'autoclave est indispensable pour stériliser la plupart des milieux microbiologiques. Il doit être d'une taille suffisante pour stériliser ces milieux sans entassement. Il est généralement déconseillé d'employer des autoclaves verticaux ou à chargement par le haut en raison d'un entassement inévitable et de la difficulté de régler et de maintenir une température de stérilisation adéquate. Il est toujours préférable de recourir à des autoclaves horizontaux à chargement latéral, en particulier dans les laboratoires qui doivent examiner un grand nombre d'échantillons. L'autoclave doit pouvoir maintenir une température interne de 121° sous une pression de 1 bar; il doit être muni d'un thermomètre étalonné pour mesurer la température dans le compartiment de stérilisation, ainsi que d'un manomètre et de soupapes de sûreté en raccordement direct avec l'alimentation en vapeur saturée; il doit aussi être capable d'atteindre en 30 minutes la température souhaitée. L'autoclave devrait aussi être muni d'un thermomètre enregistreur fournissant un relevé permanent du cycle de stérilisation.

L'autoclave devrait servir surtout à la stérilisation des milieux et des solutions. Il n'est pas recommandé de stériliser dans l'autoclave les pipettes et la verrerie graduée, car l'humidité accumulée nuirait à leur débit.

Les interventions ou ajustements faits sur l'autoclave par des personnes inexpertes peuvent donner lieu à de graves lésions et/ou à de coûteuses réparations. Celles-ci devraient être confiées à des spécialistes pleinement familiarisés avec le matériel. L'entretien courant, en revanche, peut et devrait être effectué par le personnel du laboratoire.

Etant donné que les divers types d'autoclaves diffèrent beaucoup les uns des autres, on ne donnera ici que des indications générales pour leur entretien. Les travaux de maintenance peuvent être classés en fonction de leur périodicité: quotidienne, hebdomadaire, mensuelle et trimestrielle.

Deux opérations devraient être faites chaque jour. Tout d'abord, retirer le relevé journalier des températures et le conserver comme il convient. En second lieu, l'intérieur du compartiment de stérilisation doit être nettoyé tous les jours avec une solution peu concentrée de détergent, rincée à l'eau et séchée avec un chiffon non pelucheux. Il faudrait aussi enlever le filtre du tuyau d'évacuation pour le libérer de tous fils et sédiments. Le filtre est ensuite nettoyé au jet et remis en place.

Trois opérations devraient être faites chaque semaine. Premièrement, il faut laver au jet le tuyau d'évacuation, retirer le filtre et rincer le tuyau avec une solution chaude de phosphate trisodique (2 cuillères à soupe pour un quart d'eau). Au bout de 5 minutes, on rincera le tuyau avec un jet d'eau chaude et le filtre sera remis en place. La deuxième opération consiste à contrôler les signaux de commande et l'état de l'appareil. Après avoir vidé le compartiment de stérilisation, les interrupteurs à molette sont mis en fonction pour 1 minute. A mesure que la stérilisation procède, il faut observer attentivement le panneau de commande. Si un témoin demeure éteint, on doit appeler un technicien qualifié. La troisième opération consiste à laver au jet le générateur de vapeur. Cette opération varie selon le modèle utilisé et il faudrait suivre les instructions du fabricant.

Une fois par mois, il faudrait graisser les gonds de la porte du compartiment.

Les opérations à effectuer trimestriellement sont nombreuses. Pour commencer, les graisseurs du montant des portes sont lubrifiés avec de la graisse pour températures élevées. Puis, il convient d'examiner les joints d'étanchéité de la porte: s'ils sont cassants ou crevassés, il faut les changer. En troisième lieu, il convient de contrôler les soupapes de sûreté du compartiment et du générateur de vapeur. On s'assurera qu'il n'y a pas d'accumulation de rouille, d'incrustations ou d'autres substances qui empêcheraient les soupapes de fonctionner. Il est recommandé d'utiliser de l'eau d'une dureté d'au maximum 5 pour les générateurs de vapeur afin de réduire les incrustations. Chaque levier ou anneau de fermeture devrait être actionné à plusieurs reprises. Le levier doit se mouvoir librement et retourner à la position de fermeture après chaque opération. Une fois que le compartiment et le générateur de vapeur ont atteint la pression de service, il faut vérifier que les soupapes de sûreté ne fuient pas. Un technicien qualifié devrait être chargé de remplacer les soupapes défectueuses. Enfin, il faut nettoyer et désincruster le générateur de vapeur conformément aux instructions du fabricant.

Fours à air chaud

Le four à air chaud sert à stériliser une grande partie de la verrerie de laboratoire. Il devrait avoir des dimensions suffisantes pour éviter l'entassement du matériel, pouvoir produire des températures uniformes et être doté d'un thermomètre étalonné enregistrant avec précision les températures comprises entre 160 et 180°. Si possible, il devrait aussi être muni d'un thermographe permettant d'enregistrer en permanence le cycle de stérilisation. L'entretien du four à air chaud est très simple: il suffit de nettoyer une fois par mois l'enceinte interne avec une solution légère de détergent, de la rincer à l'eau courante et de la sécher.

Balances

Le laboratoire de microbiologie devrait posséder deux balances à accès vertical ayant respectivement une portée de 2 000 et 100-200 g et une sensibilité de 0,1 g et 1 mg. L'entretien est réduit: remplacer un poids défectueux, nettoyer la cage et les plateaux. Si l'on nettoie simultanément plus d'une balance, il faut veiller à ne pas intervertir les étriers et les plateaux.

pH-mètres

Sauf indication contraire, le pH des diluants, des milieux réhydratés et autres substances devrait être ajusté à l'aide d'un pH-mètre plutôt que de papiers indicateurs. L'entretien du pH-mètre est minime: il suffit de nettoyer le boîtier et la housse de protection.

Contrairement au pH-mètre, les électrodes ont besoin de soins particuliers. Toutes les électrodes nécessitent une mise en condition initiale. Le bulbe de verre d'une électrode neuve doit être mis à tremper pendant au moins une heure dans de l'eau déminéralisée ou légèrement acide ou dans une solution tampon à pH 4, afin d'hydrater la membrane sensible au pH.

Il faut toujours rincer les électrodes avant de les faire passer de la solution étalon à la solution d'essai. Bien qu'il soit préférable d'utiliser une portion de la solution d'essai, on peut employer pour le rinçage de l'eau déminéralisée. Les électrodes sont placées au-dessus d'un bécher pendant le rinçage, puis séchées avec du papier absorbant.

La garde des électrodes dépend de leur type. Les électrodes de verre sont tenues dans une solution tampon de pH 7 ou dans une solution légèrement acide. Les électrodes de référence sont conservées dans une solution 0,1 M de KCl afin de maintenir le raccord humide et dégagé. Le niveau de la solution de remplissage de l'électrode de référence devrait toujours être maintenu au-dessus du niveau de la solution d'essai ou de trempage afin que la pression frontale soit positive et force la solution de remplissage à travers le raccord. Les électrodes mixtes devraient être maintenues dans un mélange 50-50 % de solution tampon de pH 7 et de solution 0,1 M de KCl.

Mélangeurs

Mélanger est sans doute l'opération la plus courante durant la préparation de l'échantillon. Bien souvent, cette opération entraîne une perte de produit. Dans ce cas, le socle du mélangeur doit être immédiatement désinfecté pour empêcher la contamination d'autres échantillons et du lieu de travail. Une fois désinfecté, le socle devrait être lavé avec une solution chaude de détergent, puis rincé pour éviter l'accumulation de dépôts secs.

Hotte à flux laminaire

Toutes les analyses microbiologiques comportant la présence d'organismes pathogènes, utilisation de milieux stériles ou le contrôle de la stérilité d'aliments en conserve devraient se faire sous des hottes à flux laminaire, si possible du type à courant vertical. Le filtre principal et le filtre aspirateur d'air empoussiéré de grande capacité (HEPA) devraient pouvoir éliminer 99,99 % des particules d'un diamètre minimal de 0,3 micromètre. L'équipement standard devrait comprendre une prise électrique protégée contre les éclaboussures, d'un robinet de gaz à électro-aimant, d'une connexion de régime avec la pompe à vide, d'un adaptateur pour l'installation d'aspiration, d'un compteur d'heures de fonctionnement et d'une lampe fluorescente extérieure. Contrairement à la pratique courante, les hottes ne doivent pas fonctionner en permanence ou pendant de longues périodes, par exemple durant tout le week-end. Elles ne doivent être opérationnelles qu'au moment où l'on doit les utiliser. Il n'est non plus pas conseillé d'utiliser sous la hotte des becs Bunsen, Fisher, etc. L'emploi de ces brûleurs pourrait créer une colonne d'air ascendante plus puissante que le flux d'air stérilisé descendant en provenance du filtre HEPA, ce qui annulerait l'efficacité de la hotte.

Il faut vérifier les filtres une fois par mois, détecter les obturations et les accumulations de poussière, et les remplacer au besoin. Il faut aussi libérer l'installation d'aspiration d'éventuelles obstructions et nettoyer deux fois par mois les lampes fluorescentes avec un chiffon souple imbibé d'éthanol. Tous les trois mois, il faut contrôler les lampes à rayons ultraviolets avec un photomètre. Si la lampe émet moins de 80 % de son débit nominal, elle devrait être remplacée. Comme les rayons ultraviolets ne sont pas pénétrants, la hotte doit être entièrement vidée pour garantir l'efficacité de la lampe. Celle-ci devrait être allumée 10 minutes avant l'utilisation de la hotte et n'être éteinte que 10 minutes après la fin de l'analyse.

L'intérieur de la hotte doit être désinfecté non seulement avec la lampe UV, mais encore avec des solutions appropriées. Il est recommandé d'utiliser des désinfectants différents avant et après l'analyse pour obtenir une action bactéricide optimale. L'efficacité de la désinfection peut être vérifiée à l'aide de plaques RODAC (méthode par contact direct à la gélose, voir Annexe 3). Les résultats de ces vérifications devraient être consignés dans un registre contenant les informations suivantes: date, lieu ou site d'échantillonnage dans la hotte, désinfectant utilisé avant et après l'analyse, dénombrement microbiologique, nom de l'analyste.

Microscopes

La plupart des typages taxonomiques effectués dans un laboratoire de microbiologie reposent sur l'examen microscopique des caractères morphologiques et des réactions de

coloration. Il est recommandé d'utiliser à cet effet un microscope composé et un stéréoscope. Le premier devrait être si possible un microscope binoculaire avec un objectif à immersion à l'huile de 1,8 mm, un condenseur Abbe sur support à crémaillère d'une ouverture numérique d'au moins 1,25, un diaphragme iris, un miroir plan si l'éclairage n'est pas un élément essentiel ou s'il est monté sur le statif, une platine mécanique et des oculaires donnant des grossissements de 100, 400 et 1 000 x. Le stéréoscope devrait de préférence être du type binoculaire, avec sa propre source lumineuse et donner un grossissement de 60 x.

Les microscopes devraient être placés sur un plan antivibrations et maintenus toujours au même endroit. Quand ils ne sont pas utilisés, il faudrait les protéger des poussières avec une housse. Le statif devrait être nettoyé selon les besoins avec un chiffon ou une peau de chamois. Les parties vernissées peuvent être nettoyées avec un chiffon humide. Les petites taches sur la platine peuvent être éliminées avec de la paraffine liquide ou de la vaseline sans acide. Les lentilles doivent être nettoyées après chaque utilisation avec des serviettes et solution spéciales du commerce. Lors du nettoyage, il ne faut pas démonter les objectifs.

Il y a lieu de conclure un contrat d'entretien pour que les microscopes soient contrôlés une fois par an par un représentant du fabricant. Le personnel du laboratoire ne devrait jamais essayer de réparer un microscope.

Programme de maintenance et réparation

Il convient d'élaborer un programme préventif de maintenance et de réparation pour tous les appareils les plus importants du laboratoire. Leur principal utilisateur devrait être chargé de l'entretien et de la réparation de chaque appareil. Le relevé des opérations de service de chaque appareil pourrait constituer un fichier distinct, avec les indications suivantes: date, nom et titre des personnes intervenues, nature de la panne (le cas échéant), brève description des travaux d'entretien ou de réparation et, au besoin, coût de l'intervention. Le mode d'emploi ou le manuel d'utilisation des principaux appareils devrait se trouver en un lieu facilement accessible pour le personnel du laboratoire. Avant d'utiliser un appareil, le personnel doit en connaître à fond le fonctionnement et l'entretien.

6.2 Etalonnage

L'étalonnage consiste à mesurer, comparer et régler le fonctionnement d'un appareil par rapport à une norme acceptée. En général, certaines tolérances sont prévues et le matériel étalonné doit fonctionner compte tenu de celles-ci.

La section suivante traite de l'étalonnage du matériel de base d'un laboratoire de microbiologie alimentaire.

Étuves à incubation

La température interne d'une étuve est réglée par un ou plusieurs thermomètres dont le nombre est fonction des dimensions de l'appareil. Il existe deux grands types de thermomètres: à immersion partielle et à immersion totale. Chaque type doit être utilisé comme il convient et il faut contrôler fréquemment s'il y a ou non rupture de la colonne de

mercure. Un thermomètre à immersion partielle sert à mesurer la température interne des étuves à air chaud. Il devrait être gradué en dixièmes de degrés. Ce thermomètre devrait être placé dans un tube à essai vertical contenant de l'eau au moins jusqu'au trait de graduation. Pour réduire l'évaporation au minimum, on peut garnir l'ouverture du tube de mastic. Il est recommandé, dans les étuves de grandes dimensions, de placer un thermomètre à immersion partielle aux niveaux supérieur, moyen et inférieur de l'appareil.

Avant d'utiliser un thermomètre à immersion partielle, il faut l'étalonner par rapport à un thermomètre certifié par une organisation officielle de normalisation. Un procédé d'étalonnage des thermomètres à immersion partielle est décrit à l'Annexe 7. Tous les thermomètres à immersion partielle devraient être recalibrés chaque année.

Bains-marie

Le second type principal de thermomètre, celui à immersion totale, sert surtout à contrôler la température des bains-marie. Contrairement au thermomètre à immersion partielle, il n'a pas de trait de graduation car il est toujours en position horizontale plongé entièrement dans le bain-marie. Les graduations des thermomètres de ce type ne devraient pas dépasser 0,1°.

La méthode d'étalonnage est plus simple dans le cas des thermomètres à immersion totale que dans celui des thermomètres à immersion partielle. Le thermomètre à étalonner et le thermomètre de référence sont immergés entièrement à proximité l'un de l'autre dans un bain-marie à thermostat. La température du bain-marie est réglée à une valeur égale ou presque à celle à laquelle le thermomètre devra fonctionner. Après une période d'équilibrage d'au moins une heure, on relève la température des deux thermomètres. Pour déterminer la température exacte, on consulte le certificat de correction du thermomètre de référence. On établit le facteur de correction à appliquer (la quantité à ajouter ou à retrancher de la lecture du thermomètre à étalonner pour obtenir la température correcte ou réelle). Ce facteur de correction et un numéro d'identification sont inscrits sur un ruban adhésif appliqué sur le thermomètre à immersion totale qui vient d'être étalonné. Ces données d'étalonnage doivent aussi être consignées dans le registre des températures. Tous les thermomètres à immersion totale devraient être étalonnés une fois par an.

En plus du type et du nombre appropriés de thermomètres pour chaque étuve ou bain-marie, il faudrait disposer d'un thermographe pour enregistrer en continu (24 heures) la température. De même que les thermomètres à colonne de mercure, les thermographes devraient être étalonnés par comparaison avec un thermomètre de référence approprié. Pour cet étalonnage, le thermographe et le thermomètre de référence sont placés côte à côte en un point où la température ne risque pas de fluctuer. Après une période de stabilisation de trois heures, on note la température du thermomètre de référence et celle du thermographe: la différence correspond au facteur de correction. Contrairement à la procédure suivie avec les thermomètres à immersion partielle ou totale où le facteur de correction est inscrit sur un ruban adhésif collé le cas échéant sur le thermomètre, le facteur de correction n'est pas indiqué sur le thermographe: en revanche, celui-ci fait l'objet d'un ajustement manuel. Sur la partie postérieure du thermographe se trouve un dispositif d'ajustement qui est actionné de manière que le thermographe enregistre la même température que le thermomètre de référence. Quand on utilise un thermographe, il faut veiller à changer les fiches d'enregistrement pour éviter toute surimpression.

Réfrigérateurs et congélateurs

La température interne des réfrigérateurs et congélateurs doit être régulée avec des thermomètres à immersion partielle étalonnés par rapport à un thermomètre de référence approprié. Les graduations de ces thermomètres pour basses températures ne devraient pas dépasser 1°. La méthode d'étalonnage est identique à celle qui a été décrite pour les thermomètres à immersion partielle. Les données d'étalonnage doivent être consignées dans le registre des températures. Tous les thermomètres pour basses températures devraient être étalonnés une fois par an.

Autoclaves

En dehors des opérations courantes de nettoyage et d'entretien par les laborantins, tout étalonnage ou ajustement devrait être effectué exclusivement par des spécialistes. Il est recommandé de conclure des contrats d'entretien annuel des autoclaves.

Fours à air chaud

La température interne des fours à air chaud doit être régulée avec des thermomètres capables de mesurer des températures jusqu'à 200°. Leurs graduations ne devraient pas être supérieures à 1°. Ces thermomètres devraient être étalonnés par rapport à un thermomètre de référence approximativement à la température d'utilisation. On peut aussi employer un thermomètre à échelle annulaire, à condition qu'il ait été calibré par rapport à un thermomètre de référence. L'étalonnage devrait être fait une fois par an. Il faut rechercher, par des mesures de température, d'éventuels "points chauds" dans les fours.

Balances

L'exactitude de toutes les balances analytiques de haute précision devrait être vérifiée au moins tous les trois mois avec des poids étalonnés. Une balance ayant une portée d'environ 2 000 g devrait présenter à 200 g une exactitude de 0,1 g et celle d'une balance ayant une portée de 100-200 g devrait être de 1 mg.

Il est en outre recommandé que toutes les balances analytiques de haute précision soient nettoyées et étalonnées chaque année par un agent du fabricant. Les étalonnages annuels sous contrat des balances devraient être consignés dans un registre ou inscrits dans un fichier si le fabricant fournit des certificats d'étalonnage.

pH-mètres

Avant chaque utilisation, les pH-mètres doivent être étalonnés. Des solutions tampons certifiées sont disponibles à cet effet dans le commerce. Bien que celles-ci se trouvent à toutes les valeurs comprises entre 1,00 et 11,00 à intervalles de 1,00, les solutions tampons les plus couramment utilisées en microbiologie alimentaire ont un pH de 4,00, 7,00 et 10,00. On peut faire un étalonnage soit avec une seule solution tampon, quand une précision très élevée n'est pas nécessaire, soit avec deux solutions. Comme les méthodes d'étalonnage varient d'un modèle à l'autre, nous ne pouvons donner ici des instructions détaillées à ce sujet. Toutefois, certaines précautions doivent être observées dans l'étalonnage d'un tampon ou la détermination du pH avec un pH-mètre de quelque type

que ce soit: il faut mettre une quantité adéquate de solution de remplissage dans l'électrode, tous les échantillons et solutions tampons doivent être à la même température (à moins d'utiliser un correcteur de température automatique) avant la lecture des mesures, et les solutions tampons et d'essai doivent être remuées avec un agitateur magnétique pendant la prise des mesures.

Mélangeurs

Il est recommandé d'employer un mélangeur du commerce à vitesse variable. Bien que les vitesses de rotation soient habituellement indiquées en tours par minute (tpm) par le fabricant, il convient d'étalonner les mélangeurs tous les trois mois avec un cinémomètre, de préférence photoélectrique, pour mesurer le nombre effectif de tpm pour chaque vitesse indiquée. Les données d'étalonnage devraient être consignées dans un registre, accompagnées des informations suivantes: date, numéro du mélangeur, nombre de tpm mesurés pour chaque vitesse, et nom de l'analyste.

Hotte à flux laminaire

Il n'est pas nécessaire que l'analyste procède à un étalonnage.

Microscopes

Voir Annexe 8.

6.3 Tests de performance

Étuves à incubation

Pour tester le fonctionnement des étuves à air, on mesure la température et l'humidité. La température intérieure se vérifie avec des thermomètres étalonnés, deux fois par jour: le matin avant de commencer les analyses et l'après-midi à la fin du travail. Si l'on utilise un thermomètre enregistreur, une seule lecture journalière est suffisante. Les températures avant et après correction sont consignées dans un registre où sont en outre indiqués le numéro de l'étuve, la position des étagères, la date, l'heure, le numéro du thermomètre et le nom de l'analyste. En cas d'utilisation d'un thermographe, les enregistrements doivent être conservés à part pendant au moins 3 ans. Les fiches d'enregistrement doivent être paraphées et datées lors de leur insertion dans le thermographe et lors de leur retrait. La température intérieure des étuves à air doit se maintenir à une valeur constante, avec une marge de tolérance de $\pm 2^\circ$ et si possible de $\pm 1^\circ$.

Le taux d'humidité à l'intérieur de l'étuve est déterminé indirectement tous les trois mois par calcul du pourcentage de la perte pondérale de plaques de gélose incubées dans des conditions spécifiées. Une méthode simple consiste à disposer en divers endroits de l'étuve des plaques couvertes de 15 x 100 mm contenant 20 ml de gélose solidifiée. Après incubation à 35° pendant 48 ± 2 heures, on calcule le pourcentage de perte pondérale de la gélose. Les données suivantes devraient être inscrites dans le registre contenant les relevés de température: numéro de l'étuve, position des étagères, date et heure du début de l'incubation, poids de 20 ml de gélose avant incubation, date et heure de la fin de l'incubation, poids de 20 ml de gélose après incubation, quantité et pourcentage de perte

pondérale de la gélose. Si ce pourcentage excède 15 %, il faut augmenter l'humidité. Au cas où l'étuve ne serait pas dotée d'un humidificateur intégré, un plateau rempli d'eau peut être placé dans l'étuve.

Les étuves et cellules anaérobies devraient contenir des indicateurs d'anaérobiose. Il existe dans le commerce des bandes indicatrices qu'il faut renouveler tous les jours.

Bains-marie

La fonction principale d'un bain-marie thermostatique à niveau constant est de maintenir avec précision une température élevée donnée, avec une marge de tolérance relativement faible, en générale $0,1^\circ$. Bien que ce type d'appareil puisse fonctionner à diverses températures, il est le plus souvent utilisé à $44,5$ ou $45,5^\circ$ pour confirmer l'origine fécale des coliformes. Comme le maintien précis de ces températures revêt une importance plus grande que dans le cas des températures habituellement employées dans les étuves à air chaud (25 , 35 ou 37°), il est recommandé d'équiper les bains-marie de thermographes étalonnés pour surveiller en permanence la température. Si cela n'est pas réalisable, on pourra tester le fonctionnement des bains-marie en notant les températures mesurées avec des thermomètres étalonnés à immersion totale, tout d'abord le matin, puis 3 ou 4 fois durant la journée de travail, et en dernier lieu à la fin de l'après-midi. On consignera dans le registre les températures avant et après correction, le numéro du bain-marie, la date, l'heure, le numéro du thermomètre et les initiales de l'analyste.

Si l'on n'utilise pas un thermographe, il est possible de vérifier que la température n'a pas dépassé la tolérance admise pendant les heures de repos en employant des cultures microbiologiques appropriées, par exemple des cultures d'Escherichia coli et d'Enterobacter aerogenes mêlées aux cultures à déterminer. Le bain-marie fonctionne convenablement si les cultures d'E. coli dégagent des gaz et si celles d'E. aerogenes n'en produisent pas dans des tubes inoculés EC incubés à $44,5 \pm 0,1^\circ$ ou à $45,5 \pm 0,1^\circ$ (selon les spécifications de la méthode appliquée) pendant 24 ± 2 heures. Si les cultures d'E. coli ne produisent pas de gaz, cela signifie que la température du bain est montée à un niveau inacceptable. La production de gaz par les cultures d'E. aerogenes indique que la température est demeurée trop basse. Quand les bains-marie sont en fonction, on devra employer une nouvelle série de ces deux cultures à intervalles de 24 heures. Les réactions de ces cultures seront consignées dans le registre des températures.

En plus de contrôler la température, il faut vérifier son uniformité dans l'ensemble du bain-marie. Durant l'utilisation des appareils, il convient de mesurer au moins une fois par jour la température en divers points du bain-marie. Si la température en un ou plusieurs emplacements dépasse la tolérance admise, il importe de contrôler la circulation de l'eau dans le bain. Il arrive que les tuyaux d'arrivée et de sortie de la pompe à eau soient coincés sous l'étagère ou le plateau métallique soutenant les tubes à essai incubés, de sorte que le débit devient insuffisant et que la température n'est plus uniforme. Il faut donc contrôler chaque jour la position des tuyaux d'arrivée et de sortie de la pompe à eau lorsque les bains-marie sont en fonction.

Réfrigérateurs et congélateurs

Bien que le son d'un avertisseur de température élevée puisse signaler une défaillance du réfrigérateur ou du congélateur, il faut surveiller leur température une fois par jour à l'aide de thermomètres étalonnés. Dans les grands réfrigérateurs, il faudrait placer des thermomètres sur les étagères supérieure, médiane et inférieure; un seul thermomètre suffira dans le cas des congélateurs et des réfrigérateurs ménagers. Les températures relevées devraient être consignées dans un registre, en même temps que le numéro de l'appareil, la date, l'heure et les initiales de l'analyste.

Autoclaves

On peut contrôler le fonctionnement des autoclaves par des procédés physiques et microbiologiques. Il est recommandé de charger un spécialiste contractuel d'effectuer une fois par an des vérifications thermoélectriques en divers points de l'enceinte de stérilisation. Les analystes du laboratoire devraient toutefois utiliser un indicateur microbiologique, par exemple une ampoule des spores de *Bacillus stearothermophilus*, ou un thermomètre enregistreur à maximums pour s'assurer de la stérilité de l'autoclave avant chaque utilisation. On peut aussi employer à cet effet des indicateurs de stérilité disponibles sur le marché.

Fours à air chaud

La performance des fours à air chaud s'évalue par la mesure des températures au moyen d'un thermomètre étalonné ou d'un thermographe. Il convient de tenir un registre indiquant la date, l'heure, le numéro du lot, la durée de la stérilisation, la température effective et le nom de l'analyste pour chaque opération. Il est aussi recommandé d'employer des indicateurs disponibles sur le marché.

Balances

L'exactitude des pesées devrait être contrôlée tous les trois mois avec des poids étalonnés. Si une balance ne correspond pas aux spécifications du fabricant, un représentant du constructeur ou un technicien autorisé devrait procéder aux réglages nécessaires.

pH-mètres

A la longue, l'efficacité des électrodes diminue: réponse lente ou électriquement brouillée, ou lectures hors étendue de mesure. Cette baisse d'efficacité peut être due à une contamination ou à des fuites de la membrane, ou encore au colmatage du raccord poreux.

Pour rétablir l'efficacité des électrodes, il faut nettoyer la pointe et les autres surfaces contaminées. Les couches protéiques peuvent être enlevées avec de la pepsine ou de l'acide chlorhydrique 0,1 M. Pour supprimer les concrétions de matières inorganiques, on peut laver la pointe des électrodes avec de l'acide éthylènediaminetétracétique. Dans le cas des pellicules grasses ou huileuses, la pointe des électrodes peut être nettoyée avec de l'acétone, du méthanol ou de l'éther diéthylique.

Si ces procédés simples ne réussissent pas à rendre les électrodes à nouveau fonctionnelles, les réponses aberrantes du pH-mètre peuvent être dues à un blocage ou une obstruction du raccord. Pour désobstruer un raccord, on peut recourir aux méthodes suivantes: remplacer la solution de remplissage, mettre le raccord à tremper pendant une nuit dans une solution de KCl 0,1 M, envoyer de l'air sous pression dans le raccord, faire bouillir le raccord pendant 10 minutes dans une solution diluée de KCl, poncer le raccord avec du papier d'émeri n° 600.

Si l'efficacité demeure toujours faible, il faudrait reconditionner ou régénérer la membrane de détection des électrodes de verre en immergeant la pointe alternativement dans une solution d'HCl 0,1 M (15 secondes) et une solution de KOH 0,1 M (15 secondes) à 3 ou 4 reprises. S'il n'y a encore aucune amélioration, on peut tremper la pointe de l'électrode dans une solution de bifluorure d'ammonium à 20 % pendant 3 minutes ou dans de l'acide fluorhydrique à 10 % pendant 15 secondes au maximum. Avertissement: ces solutions fluorées sont extrêmement dangereuses et des mesures de sécurité doivent être prises avant de les manipuler. Après le traitement fluoré, il faut rincer l'électrode sous un jet d'eau courante, la tremper un bref instant dans de l'HCl 5 N pour éliminer les fluorures, puis la rincer à nouveau sous l'eau du robinet. L'électrode ainsi traitée est ensuite immergée pendant 3 à 4 heures dans une solution tampon de pH 4 avant un nouveau test de performance. Si le pH-mètre ne fonctionne pas bien, mieux vaut remplacer l'électrode.

Mélangeurs

Il est regrettable que les divers manuels de microbiologie recommandent des vitesses de fonctionnement différentes. On note même un manque de concordance au sujet des spécifications pour les mélanges à haute et à faible vitesse. Par exemple, l'American Public Health Association (APHA) recommande de mélanger les aliments à faible vitesse (8 000 tpm) pour un dénombrement standard sur plaque (1). L'Association of Official Analytical Chemists pour sa part estime qu'une faible vitesse se situe entre 10 000 et 12 000 tpm (2). Le Bacteriological Analytical Manual de la Food and Drug Administration des Etats-Unis recommande une vitesse de rotation élevée (18 000 - 21 000 tpm) pour la recherche de Bacillus cereus (3), tandis que de nombreux laboratoires considèrent que 14 000 - 18 000 tpm représentent une haute vitesse de rotation. Si une vitesse de rotation est spécifiée pour une méthode d'analyse déterminée, il faut l'observer. Si aucune vitesse n'est recommandée, la denrée devrait être mélangée à la vitesse la plus faible qui assure une homogénéisation complète en un temps raisonnable (1-2 minutes). Le mélange à des vitesses excessivement élevées et/ou pendant des durées excessivement longues peut être préjudiciable aux microorganismes thermosensibles et pourrait donc fausser les résultats de l'analyse.

Pour déterminer la performance du mélangeur, on procède à une observation visuelle de l'homogénéat après mélange. La présence de morceaux d'aliment non homogénéisés signifie soit qu'il faudra sans doute augmenter la vitesse et/ou la durée du mélange pour la denrée en cause, soit qu'il y aura lieu d'ajuster la position des lames du mélangeur. Toutefois, si la paroi externe du bol du mélangeur est chaude au toucher, la vitesse/durée de rotation a peut-être été excessive et il conviendrait de la réduire pour la denrée en cause.

Hotte à flux laminaire

On contrôle une fois par mois le rendement de la hotte à flux laminaire en exposant des boîtes de gélose au sang au courant d'air pendant 1 heure. Les boîtes sont ensuite incubées à 35° et examinées au bout de 24 et 48 heures. Aucune colonie ne devrait être observée. Au cas où une ou plusieurs boîtes présentent des colonies, il faut répéter le test pour déterminer si la contamination est due à un mauvais fonctionnement de la hotte ou à un défaut de la technique d'analyse. Si trois essais consécutifs indiquent la présence d'une contamination, on en déduit que la hotte fonctionne mal: un technicien devrait être appelé pour vérifier le débit de l'air et rechercher s'il existe des trous dans les filtres ou dans la hotte. Les résultats de la surveillance microbiologique devraient être notés dans un registre avec les informations suivantes: date et heure de l'exposition des boîtes de Petri, emplacement exact des échantillonnages effectués dans la hotte, dénombrements microbiologiques (éventuels) et nom de l'analyste. Le diagnostic du technicien devrait être consigné dans un registre.

Après la mise en place d'une nouvelle lampe à rayons ultraviolets, puis tous les 3 mois, il faudrait en vérifier l'efficacité. La procédure à suivre est décrite à l'Annexe 9.

Microscopes

On considère qu'un microscope fonctionne bien quand l'image focalisée présente une définition dure et est suffisamment contrastée. L'image peut parfois apparaître floue si les lentilles de l'objectif ne sont pas correctement montées ou si elles sont recouvertes de poussière ou d'huile d'immersion. Il faudrait vérifier le montage des lentilles et les nettoyer avec du papier mousseline ou un papier spécial imbibé de produit à nettoyer pour lentilles. Si l'image reste floue, il faudra s'adresser à un représentant autorisé du fabricant.

Les microscopes à fluorescence sont souvent utilisés en microbiologie. La pureté de l'isothiocyanate de fluorescéine, très employé dans les essais aux anticorps fluorescents, varie entre 30 et 100 % dans les produits du commerce (4). L'idéal serait d'avoir des colorants purs à 100 %. Des colorants d'une pureté moindre peuvent être utilisés si le coefficient indiquant la composante protéinique du sérum tient compte des impuretés et si celles-ci n'augmentent pas la coloration non spécifique. Au moyen d'une échelle allant de - à ++++ (voir les spécifications pour la performance des sérums, section 7.4), il faudrait déterminer pour chaque utilisation les réactions de cultures fluo positives et fluo négatives connues. Des réactions inférieures à ++ avec une culture positive indiquent soit un mauvais fonctionnement du microscope à fluorescence, soit la présence d'un lot défectueux d'antisérums marqués avec une substance fluorescente. Des réactions positives de n'importe quelle intensité avec des cultures négatives indiquent des réactions non spécifiques indésirables avec les antisérums.

6.4 Verrerie

La verrerie de laboratoire devrait être fabriquée en verre de borosilicate peu alcalin. Après chaque utilisation, il faudrait examiner la verrerie et éliminer les articles qui présentent des bords ébréchés ou des surfaces internes corrodées. En particulier, la pointe des pipettes devrait être observée de près, car une pointe ébréchée délivrera des volumes inexacts. L'embouchure des flacons pour dilution devrait aussi être examinée attentivement,

car la présence d'ébréchures pourrait provoquer des fuites du contenu du flacon lorsque l'analyste procède aux dilutions.

Les bouchons ou couvercles neufs en matière plastique des flacons pour dilution doivent être traités afin d'éliminer tout résidu toxique. Il faudrait les passer à l'autoclave à deux reprises quand ils sont immergés dans de l'eau distillée ou bien les laver deux fois dans une solution détergente chaude.

Etant donné que des résidus acides ou alcalins peuvent demeurer sur la verrerie après nettoyage, il convient de vérifier le pH de lots aléatoires de verrerie en ajoutant quelques gouttes de bleu de bromothymol à 0,04 % et noter la réaction colorée. Cet indicateur vire au jaune (acide), au bleu-vert (neutre) et au bleu (basique) dans l'intervalle de pH compris entre 6,5 et 7,3. Pour préparer la solution de bleu de bromothymol à 0,04 %, ajouter 16 ml de NaOH 0,01 N à 0,1 g de bleu de bromothymol et diluer à 250 ml avec de l'eau distillée.

En plus du contrôle du pH, il faut vérifier chaque année si les superficies de la verrerie lavée ne présentent pas de dépôts de substances bactériostatiques ou bactéricides. La procédure à suivre est décrite à l'Annexe 10. Les résultats devraient être consignés dans un registre avec les informations suivantes: date, nom du détergent utilisé pour laver la verrerie, provenance et numéro de lot ou numéro de contrôle des boîtes de Petri prêtes à l'emploi, fabricant et numéro de lot de la gélose pour dénombrement sur plaque, dénombrements microbiologiques et nom de l'analyste.

La stérilité de la verrerie de laboratoire devrait être contrôlée systématiquement. On peut vérifier par sondages les boîtes de Petri stérilisées en versant de la gélose dans des boîtes prises au hasard, en incubant les plaques solidifiées et en recherchant la présence de colonies. Il faut contrôler la stérilité des objets tels que le matériel d'échantillonnage, les flacons pour dilution et les pipettes en les rinçant avec du tampon phosphaté de Butterfield et en filtrant les liquides de rinçage à travers une membrane; celle-ci est placée sur un milieu non sélectif et incubée dans les conditions prescrites par la méthode. Pour contrôler les tubes à essai stérilisés, on peut y verser du bouillon liquide au thyoglycolate et observer la présence éventuelle de colonies après incubation.

Toute la verrerie graduée devrait répondre aux spécifications de l'American Public Health Association (5). Les pipettes et les flacons pour dilution devraient satisfaire aux exigences du NBS ou d'un organisme de normalisation équivalent. Les traits de jauge ébréchés des flacons pour dilution et les marques des cylindres gradués devraient être vérifiés par comparaison avec un cylindre certifié par le NBS. On peut utiliser des instruments jetables en matière plastique à condition de contrôler de façon aléatoire mais systématique leur toxicité et l'exactitude des traits de jauge.

6.5 Références

1. American Public Health Association. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd ed., M.L. speck (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.
2. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., K. Helrich (Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
3. U.S. Food and Drug Administration. 1984. Bacteriological Analytical Manual, 6th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
4. Bordner, R., J. Winter, and P. Scarpino. 1978. Microbiological Methods for Monitoring the Environment. U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
5. American Public Health Association. 1985. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15th ed. G.H. Richardson (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.

7. PRODUITS CHIMIQUES/MILIEUX DE CULTURE/REACTIFS

7.1 Spécifications et commandes

Il est préférable d'employer des milieux de culture déshydratés du commerce pour garantir l'uniformité méthodologique et la commodité des analystes. Toutefois, si un milieu n'est pas disponible dans le commerce, il faut le préparer sur place.

Les méthodes sont habituellement décrites en termes généraux, de sorte qu'il est rarement recommandé d'employer telle ou telle marque particulière de milieu. Mais il est parfois bon d'utiliser une marque déterminée lorsque sa supériorité est patente.

Il ne faudrait pas commander en une seule fois une quantité de milieux supérieure à un an d'utilisation. Dans les climats très humides, les milieux déshydratés une fois ouverts peuvent s'agglomérer, ce qui risque de nuire à leur performance. En outre, les milieux alcalins peuvent absorber de l'anhydride carbonique et voir ainsi leur pH se modifier. Dans la mesure du possible, il faudrait exiger que les flacons de milieux de culture du commerce portent une date de péremption. L'étiquette de tous les milieux déshydratés devrait présenter les mentions suivantes: date de réception, date d'ouverture et date limite d'utilisation. Si la date de péremption n'est pas indiquée, le milieu ne devrait plus être utilisé au-delà d'un an après sa réception au laboratoire. Les milieux visiblement altérés (décoloration, agglutination ou humidité excessive) devraient être éliminés.

Divers réactifs sérologiques, comme les sérums de typage, sont souvent employés pour l'identification des microorganismes. Presque toujours, ces sérums ont une date limite de validité. Dans la majorité des laboratoires, les quantités commandées en une seule fois ne devraient pas dépasser les besoins de 6 mois de travail.

Beaucoup de produits chimiques sont utilisés comme constituants de milieux de culture, agents sélectifs, indicateurs et colorants aux fins de diverses recherches microbiologiques. Etant donné que des impuretés chimiques peuvent inhiber ou bien stimuler la prolifération microbienne, ou encore provoquer des réactions indésirables, il ne faudrait employer que les substances répondant aux spécifications de l'American Chemical Society ou d'un organisme équivalent. Les colorants du commerce devraient être examinés avec la plus grande prudence en raison des importantes variations entre un lot et l'autre concernant le pourcentage de colorant, le complexe colorant, les substances insolubles et les matières inertes présentes. On ne devrait utiliser que les colorants certifiés par la Biological Stain Commission ou un organisme équivalent. Contrairement à la plupart des milieux de culture déshydratés, les produits chimiques sont rarement livrés avec une date limite d'utilisation. Aussi est-il recommandé de ne pas commander en une seule fois des quantités supérieures aux besoins de 2 ans de travail.

Il faudrait procéder tous les 3 mois à un inventaire des milieux déshydratés, des sérums lyophilisés et des produits chimiques. Les substances dont la date de péremption est dépassée devraient être éliminées. On ne doit en aucun cas employer des produits périmés

pour des recherches d'importance critiques comme l'analyse d'échantillons à des fins réglementaires, l'analyse d'échantillons pour le contrôle de la qualité ou le rassemblement de données analytiques destinées à la publication.

7.2 Préparation et emploi

Dans la préparation des milieux et réactifs microbiologiques, la qualité de l'eau utilisée revêt une importance capitale (1). Il faudrait toujours se servir d'eau distillée ou si possible déionisée. A titre d'exemple, on peut signaler que les fluorures, parfois ajoutés intentionnellement à l'eau courante, ne sont pas éliminés par la distillation.

L'American Public Health Association (APHA) a publié des directives (2) pour la conduite de tests visant à déterminer l'idoneité de l'eau servant à préparer les milieux et réactifs microbiologiques. Ces directives figurent à l'Annexe 11.

Chaque fois qu'il ouvre un flacon de milieu déshydraté ou de composé chimique ou une ampoule de sérum lyophilisé, l'analyste devrait y apposer ses initiales et la date. Les données relatives à la préparation de tous les milieux réhydratés et des réactifs chimiques devraient être consignées dans un registre. Dans le cas des milieux réhydratés, ces données devraient comprendre le nom du milieu déshydraté, la provenance commerciale, le numéro du lot, le nom du préparateur, la date de la préparation, la quantité du milieu déshydraté prélevée, le volume d'eau ajoutée, le pH ajusté final avant le passage à l'autoclave et la durée de l'incubation. En ce qui concerne la préparation des solutions de réactifs, les renseignements suivants devraient être notés: liste de tous les produits chimiques utilisés, provenance commerciale, numéro des lots, nom du préparateur, date de la préparation, quantité(s) de produit(s) chimique(s) prélevée(s) et volume de l'eau ajoutée.

Lorsqu'il prépare des milieux de culture réhydratés, l'analyste devrait utiliser des récipients d'une capacité équivalant au moins au double du volume final du milieu. Pour empêcher que le milieu déshydraté n'adhère sur le fond du récipient de préparation, il convient de verser dans celui-ci environ un quart du volume total d'eau avant d'introduire le milieu déshydraté. Il faut bien agiter le contenu pour mouiller le milieu et obtenir une pâte. Le restant de l'eau est ajouté à cette pâte en 2 ou 3 portions. La plupart des milieux déshydratés se dissolvent facilement sous l'effet de l'agitation et d'un chauffage modéré; toutefois, certains milieux tels que le bouillon au tétrathionate ou la gélose au sulfite de bismuth contiennent un ou plusieurs ingrédients insolubles. Il faut veiller à ne pas trop chauffer les milieux de culture car ils peuvent s'altérer s'ils sont exposés à une température élevée pendant une période prolongée. Il peut être nécessaire d'agiter fréquemment ou constamment le mélange pour éviter une surchauffe. On peut utiliser à cet effet un agitateur magnétique sur plaque chauffante.

Dans la majorité des cas, le pH final des milieux microbiologiques est spécifié. Il faut les mesurer avec un pH-mètre, et non avec un papier indicateur, aussi bien avant qu'après la stérilisation. Il pourra être nécessaire d'ajuster le pH avec de l'HCl 1 N ou du NaOH 1 N avant le passage à l'autoclave afin d'obtenir le pH final après stérilisation, selon la méthode indiquée par le fabricant.

Lors de la préparation des réactifs chimiques, l'analyste devrait porter le volume de toutes les solutions au trait de jauge des flacons volumétriques. Les réactifs sont ensuite transférés dans des flacons en verre de borosilicate pour y être conservés. Chaque flacon devrait porter une étiquette avec les mentions suivantes: nom de la solution, concentration, nom ou initiales du préparateur, date de la préparation et date de péremption.

La plupart des milieux microbiologiques sont stérilisés à l'autoclave pendant 15 minutes à 121° sous une pression de 1 bar. Certaines substances particulièrement thermosensibles, par exemple les hydrates de carbone ou "sucres", sont autoclavées à une température plus basse et/ou pendant une durée plus courte. Les milieux réhydratés ne devraient normalement pas être stérilisés en quantités supérieures à 1 litre. Avec les milieux conditionnés en tubes, on peut utiliser des couvercles encliquetés. Les récipients de plus grandes dimensions (bouteilles ou flacons) peuvent être fermés avec un bouchon fileté ou avec un tampon de coton qui permet la pénétration de vapeur pendant la stérilisation. Comme précaution supplémentaire contre une contamination possible après la stérilisation, il faudrait recouvrir les tampons de coton avec du papier poreux avant passage à l'autoclave. Les bouchons filetés ne doivent pas être vissés à fond avant la stérilisation de manière que la vapeur puisse pénétrer dans le récipient. Il convient de ne pas trop charger l'autoclave, car cela empêcherait la vapeur de circuler librement en cours de stérilisation. Dès que la pression à l'intérieur de l'autoclave devient nulle après le cycle de stérilisation, il faudrait retirer les milieux et bien visser aussitôt que possible les bouchons filetés des bouteilles et flacons.

Après stérilisation et refroidissement, il faudrait examiner les tubes de milieux avec fioles de fermentation inversées pour vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air faussement positives. Les milieux gélosés stérilisés à utiliser dans les boîtes de Petri doivent être portés à une température de 44-46° avant emploi. Pour mesurer et réguler cette température, on place un thermomètre dans un flacon de gélose exposé aux mêmes conditions de chauffage et de refroidissement que les autres bouteilles contenant le même type de gélose. La gélose fondue maintenue à 44-46° pendant plus de 3 heures ne devrait plus être utilisée.

Il faudrait inscrire les renseignements suivants dans un registre spécial de stérilisation: durée du passage à l'autoclave (avec renvoi à la durée utilisée pour la préparation des milieux), numéro de l'autoclave, durée et température de la stérilisation, nom de l'opérateur et date. Il convient d'utiliser des autoclaves distincts pour stériliser les milieux et pour décontaminer les matières pathogènes.

Certaines substances thermosensibles ne peuvent être stérilisées en autoclave et doivent être filtrées. Les filtres ne doivent contenir aucune matière susceptible d'inhiber ou de stimuler la croissance des micro-organismes, ni aucune matière qui pourrait perturber les systèmes indicateurs bactériologiques dans le milieu. Au moins 70 % de la surface du filtre doit être constituée de pores d'un diamètre moyen de $0,45 \pm 0,04$ micromètre. Le débit à travers le filtre devrait être d'au moins 55 ml/min/cm² à 25°. Les filtres devraient pouvoir être stérilisés en autoclave à 121° pendant 10 minutes. La filtration devrait se faire autant que possible dans une hotte à flux laminaire ou une enceinte de sécurité.

Comme certains réactifs sont autostérilisants, il n'est pas nécessaire de les passer à l'autoclave ni de les filtrer. On prépare quelques solutions colorantes, par exemple, en ajoutant de l'eau stérile au colorant dans un récipient stérile et en laissant la solution s'autostériliser.

7.3 Conservabilité et conditions d'entreposage

La durée de conservation des milieux déshydratés et des sérums lyophilisés est fonction de la date de péremption; celle des produits chimiques organiques est moins facile à déterminer. Il est à la fois scientifiquement valable et économiquement rentable d'éliminer les produits chimiques 2 ans après leur réception au laboratoire. Toutefois, si l'apparence du produit présente des modifications manifestes avant cette date, il faudrait l'éliminer. Les stocks de milieux déshydratés, de sérums lyophilisés et de produits chimiques devraient être soumis à rotation pour réduire au minimum la quantité de matériel caduc dont il faut se débarrasser. Le contenu des flacons ouverts de milieux déshydratés devrait être utilisé dans les 6 mois ou éliminé. Dans les climats humides, il peut être nécessaire de garder dans un exsiccateur les flacons ouverts de milieux déshydratés.

Les milieux déshydratés et les produits chimiques devraient être entreposés dans un lieu frais et sec, protégé contre les rayons solaires ou une lumière artificielle directe. Si l'espace est suffisant, il faudrait conserver les flacons de milieux déshydratés dans leur emballage original pour mieux les protéger contre la lumière et la poussière. Les sérums lyophilisés sont normalement entreposés sous réfrigération comme recommandé par le fabricant.

Les directives servant à déterminer la durée de conservation des milieux réhydratés, des sérums et des réactifs chimiques ne sont pas aussi précises que dans le cas des milieux déshydratés et des réactifs lyophilisés. Plusieurs facteurs influent sur la conservabilité des milieux réhydratés: volume du milieu, température d'entreposage, type de récipient, type de fermeture du récipient et nature propre du milieu de culture. De la gélose ou du bouillon en tubes à bouchon fileté se conservent jusqu'à 3 mois à 4°. Ces mêmes substances en tubes à couvercle encliqueté se conservent pendant une semaine au maximum à 4°. Dans le cas des tubes sous réfrigération contenant des ampoules de fermentation inversée, il faut les examiner à la température ambiante avant utilisation pour s'assurer qu'il n'y a pas de bulles gazeuses faussement positives. Pour déterminer les déperditions d'humidité dans les tubes de bouillon, on marque le niveau initial du liquide dans plusieurs tubes de chaque lot de milieux fraîchement préparés. Si la perte estimative dépasse 10 % du volume initial, les tubes doivent être éliminés. Les boîtes de Petri à couvercle non étanche dans des sachets scellés de matière plastique se conservent jusqu'à 2 semaines à 4°, alors que la gélose en grands flacons à bouchon fileté peut être gardée pendant 3 mois à cette température. Tous les milieux réhydratés sans exception doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Les directives ci-dessus ne sont pas applicables dans tous les cas. Par exemple, certains milieux sélectifs peuvent perdre leur sélectivité avec le temps et doivent être préparés de façon extemporanée, tandis que d'autres milieux doivent être préparés à l'avance. Dans ces cas, les directives générales recommandées plus haut ne sont pas valables.

Les sérums réhydratés ne devraient pas être conservés pendant plus de 30 jours. Parfois, ces milieux deviennent troubles ou contiennent un précipité. Avant d'utiliser ces sérums, il faut les clarifier et vérifier qu'ils réagissent correctement avec des cultures témoins. Les sérums réhydratés ne devraient pas séjourner longtemps à la température ambiante. En cours d'entreposage, il ne faudrait pas les congeler et décongeler à diverses reprises, car cela abaisserait leur teneur en anticorps.

Il n'existe pas de directives uniformes pour la conservation des solutions de réactifs chimiques. Certaines d'entre elles doivent être préparées extemporanément, alors que d'autres peuvent être conservées quelques jours ou même plusieurs semaines avant leur utilisation; certaines solutions doivent être gardées sous réfrigération, tandis que d'autres peuvent être tenues à la température ambiante (24-26°); certaines solutions doivent être conservées dans des flacons étanches bouchés à l'émeri, alors que cette précaution n'est pas nécessaire dans d'autres cas. Il est toutefois une prescription commune pour tous les réactifs: on doit les tenir à l'abri de la chaleur et de la lumière. Cela dit, il faudrait conserver les réactifs dans des conditions conformes à la méthode d'analyse utilisée. Si ces conditions ne sont pas précisées, il faut prévoir des contrôles adéquats pour garantir la bonne performance des solutions de réactifs.

7.4 Spécifications fonctionnelles

Chaque fois qu'un nouveau lot de milieu déshydraté parvient au laboratoire, il faut mesurer sa performance par rapport aux spécifications concernant les normes physiques et la productivité. Pour ce qui est des normes physiques, les milieux déshydratés devraient être secs et non agglutinés. La plupart de ces milieux devraient être totalement solubles dans l'eau distillée; à cet égard, le bouillon au tétrathionate et la gélose en sulfite de bismuth constituent des exceptions notoires. Après réhydratation, la majorité des bouillons devraient être transparents ou translucides, mais, ici encore, il y a des exceptions. Le pH non ajusté devrait être relativement proche ($\pm 0,1$ unité de pH) du pH final indiqué par le fabricant.

Pour contrôler la deuxième spécification fonctionnelle, à savoir la productivité, on compare la performance du nouveau lot avec celle d'un lot de référence. L'American Public Health Association (APHA) fournit de la gélose de référence à cet effet. Le lot testé est acceptable s'il permet d'obtenir des dénombrements semblables à 10 % près à ceux de la gélose de référence (3).

L'APHA ne dispose malheureusement pas de lots de référence pour d'autres types de gélose et le laboratoire devra utiliser une autre approche. Dans le cas des géloses non sélectives, on compare en parallèle les dénombrements obtenus avec la gélose testée et avec la gélose du laboratoire (lot de référence) sur au moins cinq échantillons d'épreuve positifs. Pour réduire au minimum l'influence des variables, il faudrait que l'eau, la verrerie et les appareils utilisés soient tous de la même provenance. Après incubation dans les conditions propres à la méthode employée, on examine les boîtes de Petri pour déterminer l'aspect et la dimension des colonies éventuelles sans procéder à un dénombrement. Toute apparence ou dimension atypique de colonies devrait être notée. On dénombre ensuite les colonies et les valeurs obtenues sont transformées en logarithmes. On calcule la différence d entre les deux valeurs logarithmiques de chaque échantillon, en l'affectant du signe + ou -. On établit ensuite la moyenne d et l'écart type S_d de toutes les différences. La valeur S_d s'obtient

comme suit:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

où x est toute valeur observée, \bar{x} est la moyenne de toutes les valeurs observées et n est le nombre de déterminations. La valeur t du test de Student se calcule avec la formule suivante:

$$t = \frac{\bar{d}}{\frac{S_d}{\sqrt{n}}}$$

Si t ne dépasse pas 2,78 les deux lots ne donnent pas des dénombrements sensiblement différents et le lot testé est acceptable à condition que la dimension et l'aspect des colonies soient typiques. Si t est supérieur à 2,78 les dénombrements obtenus avec le lot testé et le lot de référence sont sensiblement différents et le lot testé n'est pas acceptable. On peut tester de façon semblable les milieux non sélectifs liquides en utilisant des méthodes de dilution-extinction pour comparer les lots nouveaux et les lots standard.

L'acceptabilité des milieux sélectifs est déterminée un peu différemment. On inocule les milieux liquides avec des organismes susceptibles et non susceptibles de se développer. Après incubation selon les conditions prescrites, on dénombre les colonies de chaque organisme. Un lot est acceptable si le nombre d'organismes susceptibles de proliférer est élevé et celui des organismes censés ne pas se développer est faible. L'acceptabilité des milieux sélectifs solides se détermine de manière analogue. Le nombre d'organismes cibles doit être comparable à celui obtenu avec une gélose non sélective appropriée. Les organismes dont la croissance est censée être inhibée doivent être très peu nombreux, sinon absents.

Les filtres à membrane doivent répondre à deux spécifications microbiologiques. Tout d'abord, la moyenne arithmétique de cinq dénombrements obtenus avec la technique de filtration doit correspondre à 10 % près à la moyenne arithmétique des dénombrements obtenus avec cinq plaques de gélose à étalement en utilisant la même quantité d'échantillon testé et de gélose. En second lieu, le filtre doit pouvoir retenir une suspension de 100 ml de *Serratia marcescens* contenant 1×10^3 cellules/ml (2).

Les spécifications pour les sérums du commerce portent sur l'aspect physique du matériel réhydraté et sur l'intensité des réactions d'agglutination avec des cultures témoins connues. Les sérums réhydratés doivent être limpides, de couleur ambre ou paille, et sans précipité. Il peut advenir qu'une fiole de sérum réhydraté dégage une odeur extrêmement désagréable sans autre anomalie. Si ce sérum réagit fortement avec des cultures connues, il peut être utilisé.

Selon l'organisme analysé, les réactions sérologiques peuvent comporter l'emploi d'antigènes flagellaires et/ou d'antigènes somatiques. La sérologie flagellaire s'effectue normalement dans un tube à essai, et le précipité résultant d'une réaction positive est fin, délicat et "neigeux". Pour la sérologie somatique, on utilise généralement des lames de

verre, et le précipité résultant d'une réaction positive est grossier et granuleux. Les réactions flagellaires peuvent prendre jusqu'à 1 heure, tandis que les somatiques sont relativement rapides (1 à 2 minutes, selon l'organisme en cause). Les réactions d'agglutination sont généralement quantifiées comme suit:

+	+	+	+	agglutination totale
+	+	+		agglutination à 75 %
+	+			agglutination à 50 %
+				agglutination à 25 %
±				agglutination à moins de 25 %
-				agglutination nulle

Les sérums réhydratés donnant des réactions d'agglutination inférieures à ++ avec des cultures témoins sont inacceptables.

Les spécifications pour les réactifs chimiques sont applicables aux agents sélectifs et aux colorants utilisés en microbiologie. Des colorants, des produits tensio-actifs, des antibiotiques, des sulfamides et des solutions d'ions métalliques servent couramment d'agents sélectifs dans plusieurs types de milieux. Le degré de pureté et, donc, de toxicité de ces agents sélectifs varie d'une marque à l'autre, voire d'un lot à l'autre d'un même fabricant.

Deux systèmes sont utilisés pour déterminer la toxicité relative de divers agents sélectifs. Le premier consiste à inoculer 1 ml d'une culture préenrichie (dilution 10^{-5}) de l'organisme cible dans des tubes distincts contenant 10 ml d'une solution d'enrichissement sélective préparée avec le lot standard et le lot testé de l'agent sélectif. Après incubation dans les conditions prescrites, le nombre d'organismes cibles dans le milieu d'enrichissement sélectif est déterminé soit par la technique du nombre le plus probable, soit par celle de l'étalement sur plaque. Si les dénombrements obtenus avec le lot testé équivalent à au moins 90 % des numérations fournies par le lot standard, le lot examiné est acceptable.

Le deuxième système est une procédure de dilution-extinction. A partir d'une culture préenrichie de l'organisme cible incubée pendant 18-24 heures, on inocule 1 ml d'une série de dilutions au dixième dans 10 ml de milieux d'enrichissement sélectifs contenant soit le lot standard, soit le lot testé d'agent sélectif. Les tubes inoculés sont incubés dans les conditions prescrites, puis leur contenu est étalé sur des plaques de gélose. Un lot testé est acceptable si l'organisme cible est récupéré dans le milieu d'enrichissement préparé avec l'agent sélectif examiné à un niveau égal ou supérieur à celui obtenu avec le milieu d'enrichissement préparé avec le lot standard de l'agent sélectif.

Des colorants sont utilisés pour colorer des spores bactériennes, des flagellés et des parois cellulaires, ainsi que pour faciliter l'observation de certaines réactions comportant la production d'entérotoxines. A la différence des spécifications pour les agents sélectifs, celles applicables aux colorants sont non pas quantitatives mais plutôt subjectives. Des cultures témoins donnant des réactions de coloration connues sont colorées avec les colorants appropriés. Si les caractères morphologiques à détecter (par exemple spores) sont nettement visibles, le colorant est acceptable. Etant donné que les différences entre diverses

techniques de coloration peuvent donner lieu à des variations dans les réactions colorées, tout colorant qui donne initialement un résultat inacceptable devrait être réexaminé par le même analyste et, si possible, par au moins un autre analyste. Il est aussi recommandé de réexaminer le colorant avec d'autres cultures témoins.

7.5 Références

1. Geldreich, E.E., and H.F. Clark. 1965. Distilled suitability for microbiological applications. *J. Milk Food Technol.* 28:351-355.
2. American Public Health Association. 1985. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16th ed., A.E. Greenberg, R.R. Trussell and L.S. Clesceri (Eds.). American Public Health Association, Washington, DC.
3. American Public Health Association. 1985. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 15th ed., G.H. Richardson (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.

8. SUBSTANCES ETALONS

Les substances étalons fondamentales sont des produits homogènes dont les propriétés - identité, pureté et activité - ont été mesurées et certifiées par le National Institute of Standards and Technology, l'U.S. Pharmacopeial Convention, l'American Society for Testing and Materials ou un autre organisme équivalent. Les chimistes utilisent ces étalons pour préparer des étalons de travail pour l'analyse de produits chimiques et médicamenteux.

Même si la microbiologie est une science relativement moins astreignante que la chimie, le laboratoire de microbiologie alimentaire utilise des étalons de référence. Les microbiologistes emploient des cultures de référence pour déterminer les milieux qui donnent les meilleurs résultats du point de vue qualitatif.

8.1 Spécifications et commandes

Aux Etats-Unis, les principales sources de cultures de références sont les suivantes:

1. American Type Culture Collection
12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
2. U.S. Department of Health and Human Services
Public Health Service
Centers for Disease Control
Atlanta, GA 30333
3. Difco Laboratories
P.O. Box 1058
Detroit, MI 48232
4. BBL Microbiology Systems
P.O. Box 243
Cockeysville, MD 21030

L'American Type Culture Collection (ATCC) est de loin le plus grand producteur de ces cultures. Les Difco Laboratories et les BBL Microbiology Systems sont surtout des distributeurs qui s'approvisionnent essentiellement auprès d'ATCC. Les cultures sont en général lyophilisées et chaque souche de culture ATCC a son propre numéro codé d'identification ou de référence. Le plus souvent, les cultures lyophilisées sont fournies en ampoules de verre et conservées sous réfrigération (4-8°) avant emploi.

En plus des poudres lyophilisées, les distributeurs commerciaux peuvent fournir des cultures ATCC sous forme de disques de papier filtre imprégnés. Aussi bien les cultures lyophilisées que celles sur disques ont une date limite d'utilisation au-delà de laquelle elles ne devraient pas être employées. Lorsqu'il passe commande de ces cultures, l'analyste

devrait procéder à une rotation des stocks. En outre, il devrait effectuer tous les trois mois un inventaire de ces cultures de référence du commerce. Les cultures dont la date limite d'utilisation est dépassée devraient être passées à l'autoclave et détruites.

8.2 Préparation et emploi

Pour réhydrater les cultures lyophilisées, on casse aseptiquement le col de l'ampoule et l'on ajoute la poudre à un milieu non sélectif approprié pour la croissance de l'organisme; la culture réhydratée est ensuite incubée dans les conditions recommandées pour l'organisme en cause. Avec une anse de platine, on étale la culture sur une plaque de gélose pour obtenir des colonies isolées. La plaque est mise à incuber dans les conditions prescrites. L'analyste utilise ensuite les colonies selon les besoins.

Pour réhydrater les cultures sur disques, on retire aseptiquement un disque de la fiole avec des pinces stériles et on le place dans un tube contenant une infusion de cervelle et coeur ou du bouillon de soja-trypticase. Avec une anse de platine, on étale la culture en solution sur une plaque de gélose pour obtenir des colonies isolées. La plaque est mise à incuber dans les conditions prescrites. L'analyste utilise ensuite les colonies selon les besoins.

8.3 Conservabilité et conditions d'entreposage

Après avoir réhydraté les cultures lyophilisées ou sur disques, l'analyste doit conserver les cultures mères. Les conditions de conservation varient d'un microorganisme à l'autre. Les méthodes d'entreposage des organismes les plus utilisés en microbiologie alimentaire sont décrites à l'Annexe 12.

L'analyste devrait aussi tenir un registre contenant les données suivantes: nom de la culture (genre et espèce), désignation de la souche, provenance de la culture (commerciale ou originale, par exemple type d'aliment ou de spécimen clinique à partir duquel la culture a été initialement isolée), date de réception, date de réhydratation, date de préparation en série de toutes les sous-cultures à partir de la culture mère réhydratée, nom de tous les milieux utilisés (prolifération, purification et entreposage), durée et température d'incubation pour la prolifération et la purification, température d'entreposage, localisation de la culture et initiales de l'analyste qui effectue chaque opération d'entreposage.

8.4 Spécifications fonctionnelles

Les cultures bactériennes de référence doivent répondre à des critères de pureté, de morphologie, de réactions biochimiques et de réactions sérologiques.

Pureté

Pour déterminer la pureté d'une culture microbiologique, on procède à un étalement sur une plaque de gélose sélective, non sélective et/ou différentielle. La gélose sélective contient un ou plusieurs ingrédients qui inhibent la croissance des organismes non analysés ou concurrents, ce que ne fait pas la gélose non sélective. La gélose différentielle signale

simplement par un changement de couleur des indications biochimiques sur la culture inoculée. Pour vérifier la pureté d'un organisme, il est préférable d'utiliser en même temps une gélose sélective et une gélose différentielle. Si l'on ne dispose pas d'une gélose différentielle pour un organisme particulier, on peut employer à sa place une gélose non sélective.

L'apparition de plus d'un type morphologique de colonie signifie que la culture est peut-être contaminée. Toutefois, l'existence de différents types morphologiques peut être due à la présence de mutants, d'organismes affaiblis ou détériorés ou de milieux défectueux. Dans ce cas, il faut purifier une ou plusieurs colonies de morphologie typique. Deux méthodes sont applicables:

La première consiste à inoculer les colonies prélevées dans un bouillon approprié, à les incuber dans les conditions prescrites et à les étaler sur des plaques de gélose. L'avantage d'un bouillon, surtout s'il n'est pas sélectif, est qu'il donne à l'organisme la possibilité de ressusciter, ou de revivre, et de parvenir à une forte densité de population. Un inconvénient, en revanche, est que le bouillon peut fournir l'occasion à des organismes concurrents de se développer beaucoup plus que l'organisme cible. Quoi qu'il en soit, si toutes les colonies sur la plaque de gélose sont morphologiquement semblables, on peut raisonnablement en déduire que la culture a été purifiée.

Avec la seconde méthode, les colonies prélevées sont directement étalées sur des plaques de gélose appropriée. L'avantage de cette méthode par rapport à la précédente est qu'elle permet de gagner du temps. Il est cependant plus difficile parfois d'obtenir avec elle des colonies isolées. En outre, prélever les organismes dans une gélose sélective et les étaler directement sur une autre gélose sélective sans phase de ressuscitation risque d'être extrêmement stressant pour eux. Quoi qu'il en soit, si toutes les colonies sur la plaque de gélose sont morphologiquement semblables, on peut raisonnablement en déduire que la culture a été purifiée.

Morphologie

En plus de servir à déterminer la pureté d'une culture, l'examen de la morphologie des colonies permet de s'assurer que les milieux utilisés sont satisfaisants. Les organismes produisent des colonies qui présentent un aspect caractéristique, ou typique, sur diverses géloses. Un aspect atypique peut indiquer un milieu défectueux ou une préparation erronée. L'analyste devrait connaître l'aspect des colonies provenant de l'étalement d'une culture pure susceptible d'avoir subi une ou plusieurs mutations. Ce type de culture peut contenir des organismes qui produiront des colonies très dissemblables. Des organismes très affaiblis ou détériorés dans une culture par ailleurs pure peuvent aussi donner lieu à des colonies morphologiquement différentes.

Réactions biochimiques

On peut exécuter une série de réactions biochimiques pour confirmer l'identité d'un organisme. Plusieurs cultures de référence connues devraient être incluses dans la procédure d'identification afin de garantir que les tests biochimiques sont réalisés correctement. Il existe des manuels traitant des réactions individuelles pour ces cultures de référence (1-3).

Les réactions biochimiques typiques (classiques ou rapides) des cultures de référence montrent que ces dernières sont pures et que les tests biochimiques fonctionnent correctement. Une ou plusieurs réactions biochimiques atypiques d'une culture de référence particulière indiquent que celle-ci a été contaminée ou a subi des mutations et/ou que le test biochimique est défectueux.

L'analyste devrait essayer de déterminer la cause des réactions biochimiques atypiques en obtenant et testant différents doubles des mêmes souches des cultures de référence (par exemple une autre sous-culture de P. vulgaris ATCC 13315), des cultures de référence entièrement différentes (par exemple Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 ou Enterobacter cloacae ATCC 13047 au lieu de Proteus vulgaris ATCC 13315), différents lots de substrats conventionnels pour tests biochimiques, et différents lots ou codes du fabricant de nécessaires pour diagnostic rapide.

Réactions sérologiques

Les réactions sérologiques sont un complément utile et indispensable des réactions biochimiques pour l'identification des organismes. Utilisés pour les sérotypages définitifs, les antigènes somatiques et les antigènes flagellaires sont identifiés sérologiquement. Dans les deux cas, des cultures de référence sont employées pour déterminer l'intensité et la spécificité de la réaction immunologique.

Si l'on se sert d'une échelle allant de 0 à + + + + (voir section 7.4) pour quantifier l'intensité de la réaction d'agglutination entre une culture de référence connue (antigène) et son antisérum homologue (anticorps), des réactions inférieures à + + indiquent soit que la culture est contaminée, soit que la culture est pure mais peut contenir des antigènes flagellaires et/ou somatiques détériorés, ou encore que les antisérums ont un titre insuffisant ou un autre défaut.

En plus de l'intensité d'une réaction entre une culture de référence connue et l'antisérum homologue (par exemple antigène de Salmonella et antisérum de Salmonella), il faut aussi déterminer la spécificité de la réaction. La réactivité d'une culture de référence connue est mesurée avec un antisérum non homologue (par exemple antigène d' Escherichia coli et antisérum de Salmonella). Les réactions d'un quelconque degré d'activité, c'est-à-dire + ou davantage, indiquent que la culture de référence est contaminée, ou est pure mais contient des antigènes "bruts" ou autoagglutinables, ou encore que l'antisérum est défectueux.

Pour garantir que des cultures de référence connues grossières ainsi que des cultures d'essai inconnues ne seront pas utilisées, une culture témoin en solution physiologique devrait accompagner chaque détermination sérologique. Pour ce contrôle, la culture proprement dite est mélangée avec une petite quantité de solution physiologique sur une lame de verre ou dans un tube à essai, selon le type de détermination sérologique effectuée. Une réaction positive de quelque degré que ce soit indique que la culture est grossière et ne peut être typée sans traitement spécial additionnel.

8.5 Références

1. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, NY.
2. Krieg, N.R. 1984. Bergey's Manual of Systematic Microbiology, Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
3. Sneath, P.H.A. 1986. Bergey's Manual of Systematic Microbiology, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

9. METHODOLOGIE

9.1 Choix des méthodes

Les méthodes doivent être choisies en fonction de leurs mérites, dont les plus importants au plan technique sont les suivants:

1. Exactitude, ou absence de déviation ou d'erreur systématique; mesure dans laquelle elles s'approchent de la réponse juste.
2. Précision, ou absence de fluctuation autour de la moyenne.
3. Spécificité et absence de dépendance matricielle.
4. Propriétés pratiques (gamme d'utilisation, pertinence, applicabilité).
5. Fiabilité, résistance, reproductibilité.
6. Sensibilité (réponse par concentration unitaire).
7. Limite de détection.

Il faut aussi tenir compte de considérations pratiques: rapidité, économie et simplicité.

Il n'y a pas pénurie de méthodes pour l'analyse microbiologique des aliments. Du fait de leur abondance, le microbiologiste doit choisir les plus appropriées, car le recours à différentes méthodes pour analyser un aliment déterminé peut conduire, et souvent conduit, à des résultats analytiques différents.

Le microbiologiste devrait connaître les finalités et fonctions des principaux manuels d'analyse microbiologique des aliments. Le plus notoire est sans doute le recueil intitulé Official Methods of Analysis (OMA) de l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1). Il s'agit d'un répertoire de méthodes microbiologiques et chimiques ayant fait l'objet d'études interlaboratoires au cours desquelles plusieurs analystes travaillant indépendamment les uns des autres ont obtenu des résultats équivalents en utilisant une méthode donnée pour doser un élément particulier dans des échantillons d'essai identiques. Les études interlaboratoires sont décrites plus en détail dans la section 9.3. Les méthodes microbiologiques soumises avec succès à des études interlaboratoires figurent dans le chapitre 46 de l'OMA.

Un autre manuel de méthodes microbiologiques, à ne pas confondre avec l'OMA, est le Bacteriological Analytical Manual (BAM) publié par la Food and Drug Administration des Etats-Unis (USFDA) (2). Le BAM a pour principal objectif de "fournir aux laboratoires de terrain de l'USFDA des méthodes qui se sont révélées efficaces pour détecter les microorganismes et leurs dérivés présents dans les aliments". Il n'est pas prétendu que ces méthodes sont les meilleures, mais elles sont appliquées par la FDA pour analyser des échantillons officiels à des fins réglementaires. Dans plusieurs cas, les méthodes OMA et BAM pour doser un élément spécifique dans une denrée donnée sont identiques. Toutefois, ce qui différencie les deux recueils c'est que toutes les méthodes AOAC ont par définition

été soumises à des études interlaboratoires, alors que le BAM contient diverses méthodes qui ne l'ont pas été. En outre, les méthodes BAM sont applicables à une gamme plus étendue d'aliments que ne le sont les méthodes recommandées par l'AOAC.

L'American Public Health Association (APHA) a publié un Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (3) qui est similaire aux recueils de l'AOAC et de l'USFDA. Comme dans le cas du BAM, certaines méthodes de l'APHA ont fait l'objet d'études interlaboratoires, les autres non. Une différence importante entre ces trois répertoires est en rapport avec le mode de présentation. L'OMA et le BAM ne donnent guère ou pas d'explications sur les étapes analytiques de leurs méthodes. En revanche, le manuel de l'APHA fournit des informations générales sur les diverses procédures, indique les précautions à observer, signale les limites de chaque méthode, donne des clés pour l'interprétation des résultats et présente de nombreuses références.

Santé et Bien-Etre Canada (4) a publié également une série de méthodes pour l'analyse microbiologique des aliments; celles-ci servent à identifier et/ou à dénombrer une grande variété de microorganismes dont la présence dans les denrées alimentaires peut avoir de l'importance.

Le quatrième volume d'une série de manuels sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires, publiés par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), est consacré à l'analyse microbiologique des aliments (5). Ce manuel a été préparé "en vue de constituer une source de documentation unique sur les méthodes et informations utiles pour l'examen microbiologique, le contrôle de la qualité et la surveillance des produits alimentaires dans les pays en développement". Il a été conçu en vue d'un emploi quotidien dans les programmes de qualité et de sécurité des aliments et il contient des renseignements pratiques à cette fin. Il est actuellement en cours de révision.

Plusieurs autres organisations internationales s'intéressent aux critères microbiologiques applicables aux aliments, en liaison avec la protection de la santé publique dans le monde entier, ainsi qu'à l'élaboration, à l'étude et à la normalisation des méthodes microbiologiques utilisées par les analystes de divers pays qui participent au commerce international. Parmi ces organisations, on peut citer la Commission internationale sur les spécifications microbiologiques pour les aliments, la Commission du Codex Alimentarius, le Comité du Codex sur l'hygiène alimentaire, le Comité mixte FAO/OMS d'experts de l'hygiène alimentaire, la Fédération internationale de laiterie et l'Association internationale de science et de technologie céréalières.

Les méthodes ne manquent donc pas; le problème est de déterminer celles qu'il convient d'utiliser. La décision est en général prise par l'administration après examen de facteurs tels que la fiabilité, la durée et le coût de l'analyse (voir section 1.1). Les méthodes retenues doivent être pratiques; toutefois, ce qui est jugé pratique dans un laboratoire peut ne pas l'être dans un autre. Il faudra donc se prononcer cas par cas sur l'applicabilité pratique et l'acceptabilité finale de toute méthode.

Les administrateurs des laboratoires chargés de la certification microbiologique des exportations doivent tenir compte des méthodes d'analyse utilisées par le ou les pays importateurs. Il est toujours judicieux d'utiliser les méthodes employées par les autorités

compétentes du pays de destination. Le laboratoire de microbiologie devra donc peut-être appliquer différentes méthodes pour le même type de denrées exportées vers différents pays.

9.2 Témoins

Les laboratoires de microbiologie bien souvent n'accordent pas une attention suffisante à l'utilisation correcte de témoins, qui est cependant indispensable pour étayer la validité des résultats analytiques.

Echantillons témoins

Voir section 5.2.

Témoins analytiques positifs

Il existe deux types de témoins analytiques positifs.

Le premier type, qui comprend les milieux ou cultures témoins, garantit que les milieux sont satisfaisants. On inocule au milieu initial l'élément à analyser et l'on applique le protocole analytique complet utilisé avec les échantillons d'essai. Le milieu témoin devrait aussi permettre le développement typique de l'élément sur toutes les plaques de gélose utilisées.

Le deuxième type de témoin analytique positif, à savoir l'échantillon témoin d'essai (à ne pas confondre avec les échantillons témoins), remplit le même rôle que les milieux ou cultures témoins. Ici, la denrée est inoculée avec l'élément et suit toute la procédure analytique utilisée avec les échantillons d'essai. Les témoins de ce type peuvent comprendre des milieux ou cultures témoins, mais est en fait préférable car il permet de prendre en compte l'effet de la matière matricielle de la denrée sur la performance des milieux.

Il n'est pas nécessaire que le niveau de l'élément dans ces témoins analytiques positifs soit voisin de la limite de sensibilité de la méthode, mais il devrait être suffisamment élevé pour garantir la présence de cellules viables de l'élément le jour où commence l'analyse.

Témoins analytiques négatifs

Il existe trois types de témoins analytiques négatifs; toutefois, le nombre effectif à utiliser dépend du type des analyses microbiologiques.

Le premier - milieu témoin négatif - permet de vérifier que les milieux analytiques ne sont pas contaminés par l'élément à déterminer. Le milieu initial non inoculé passe par tous les stades du protocole analytique, tout comme les échantillons d'essai.

Le deuxième type de témoin analytique négatif - culture témoin - permet le développement d'éléments autres que ceux à déterminer (par exemple des microorganismes concurrents) dans les divers milieux ou indique que ces organismes ne proliféreront pas dans

les milieux utilisés pour les essais. Pour préparer les témoins de ce type, on inocule l'organisme étranger à la recherche dans le milieu initial, qui passe ensuite par toutes les étapes de la procédure à l'instar des échantillons d'essai.

Le troisième type de témoin analytique négatif - témoin environnemental - offre une garantie raisonnable que le milieu ambiant n'est pas une source de l'élément à doser. A quelques exceptions près, on expose à cet effet le milieu initial à l'air libre pendant toutes les opérations analytiques faites le premier jour des analyses. Par exemple, le témoin peut être un flacon ouvert de bouillon lactosé s'il s'agit d'identifier Salmonella dans des oeufs en poudre; un flacon ouvert de bouillon de soja-trypticase pour rechercher Salmonella dans de la levure active déshydratée; un tube ouvert de bouillon au sulfate de lauryle-tryptose pour dénombrer les coliformes; ou une plaque de milieu de Baird-Parker pour le dénombrement de Staphylococcus aureus. Toutefois, si l'on entend dénombrer la microflore aérobie totale dans un produit alimentaire, il ne convient pas d'exposer une boîte de Petri à l'air libre pendant toute la durée de l'analyse. Dans ce cas, il y a lieu d'exposer à l'air libre pendant 15 minutes une boîte de Petri de 15 x 100 mm contenant 20 ml de gélose pour numération. La présence d'au maximum 15 colonies dans la boîte incubée signifie que l'environnement du laboratoire est satisfaisant pour réaliser un dénombrement total (voir section 3.2, Surveillance de l'environnement). Après le premier jour d'analyse, tous les témoins environnementaux négatifs sont traités de la même manière que les échantillons d'essai. Les témoins environnementaux négatifs peuvent comprendre des milieux témoins négatifs.

Stérilité de la verrerie

Voir section 6.4.

Cultures témoins pour les bains-marie

Voir section 6.3.

9.3 Validation des méthodes

Avant d'utiliser systématiquement une méthode dans un laboratoire, il faut qu'elle soit convenablement validée par une organisation extérieure et par le laboratoire lui-même. La plus grande organisation chargée de la validation des méthodes d'analyse est certainement l'AOAC qui a pour fonction essentielle "d'élaborer, améliorer, développer, tester et adopter des méthodes uniformes, précises et exactes pour l'analyse des produits alimentaires" (6). Avant d'être officiellement acceptée par l'AOAC, une méthode doit satisfaire à trois critères.

Tout d'abord, la méthode doit donner des résultats d'un degré prévisible de précision et d'exactitude quand elle est appliquée par des analystes qualifiés. La précision permet d'apprécier la variabilité des résultats obtenus avec la méthode dans un laboratoire et entre différents laboratoires. L'exactitude indique la mesure dans laquelle la méthode donne la proportion réelle de l'élément analysé.

Le deuxième critère de validation est la praticabilité: la méthode doit être aussi simple et rapide que possible, tout en demeurant fiable. Il arrive parfois que la seule méthode fiable disponible soit peu pratique, c'est-à-dire d'exécution coûteuse et longue. Dans ce cas, l'AOAC peut l'accepter au motif qu'elle est nécessaire. Les analystes devraient cependant continuer à rechercher une méthode à la fois fiable et pratique.

Le troisième critère est la "disponibilité" de la méthode: elle ne doit pas être grevée d'un "secret commercial" ni comporter la consultation de documents confidentiels inaccessibles à tous les analystes intéressés. Dans la mesure du possible, l'AOAC encourage la description des méthodes en termes généraux.

Toute méthode répondant à ces critères doit faire l'objet d'une étude interlaboratoires satisfaisante avant d'être reconnue officiellement par l'AOAC. L'étude interlaboratoires est le mécanisme utilisé pour valider une méthode de manière officielle: des analystes compétents et expérimentés, travaillant de façon indépendante dans différents laboratoires, utilisent une méthode donnée pour analyser un organisme déterminé dans des échantillons d'essai homogènes. Il s'agit de démontrer qu'une méthode peut être employée dans plusieurs laboratoires indépendants pour fournir des résultats essentiellement équivalents. Des recommandations pour la conduite des études interlaboratoires figurent dans une autre publication (7).

Un laboratoire peut devoir valider lui-même une méthode à utiliser couramment quand aucune autre n'a encore été validée pour une analyse particulière. Dans d'autres cas, un laboratoire pourra souhaiter revalider une méthode précédemment validée par l'AOAC ou une autre organisation internationale. Plusieurs facteurs peuvent motiver une revalidation. Tout d'abord, le laboratoire peut vouloir s'assurer que la méthode convient pour les denrées spécifiques qu'il examine. En effet, beaucoup de méthodes validées sont applicables à l'analyse d'un seul type ou d'un petit nombre de produits alimentaires précis. Si la méthode n'est pas utilisable avec les denrées analysées par un laboratoire déterminé, celui-ci devrait procéder à la validation d'une méthode d'analyse convenant pour les aliments en question.

En second lieu, un laboratoire peut désirer vérifier la spécificité d'une méthode. Par exemple, si une étude interlaboratoires a évalué une méthode pour identifier trois des plus de 1 700 sérotypes de Salmonella dans divers aliments, un laboratoire peut vouloir s'assurer que la méthode peut servir à identifier d'autres sérotypes ou déterminer le comportement d'organismes autres que Salmonella avec la méthode.

Troisièmement, il peut être bon de savoir que l'utilisation de la méthode dans tel ou tel laboratoire peut donner lieu à des problèmes. Une étude interlaboratoires est alors effectuée dans des conditions strictement contrôlées et, même si la méthode a précédemment été déclarée fiable, rapide et rentable, il se pourrait que pour une raison inconnue elle ne puisse absolument pas être utilisée systématiquement dans un laboratoire particulier.

En quatrième lieu, le laboratoire peut vouloir vérifier les capacités professionnelles d'un analyste dans l'utilisation de la méthode. Si l'on n'obtient pas de résultats satisfaisants, le laboratoire devrait recourir à une autre méthode également acceptable ou envisager de faire suivre à l'analyste un cours de formation complémentaire.

Dans la mesure du possible, la méthode à valider devrait être comparée avec une méthode existante ou standard. Durant la procédure de validation ou de revalidation d'une méthode, l'analyste devrait utiliser des aliments naturellement contaminés par l'organisme à analyser. Si de tels aliments ne sont pas disponibles, l'analyste contaminera artificiellement les produits avec l'organisme cible. En préparant les échantillons d'essai pour une étude de validation, l'analyste devrait envisager la possibilité d'utiliser des cellules cibles affaiblies et normales; le type et le degré de stress (congélation, déshydratation, chauffage, irradiation et chloration); les doses d'inoculation; l'inclusion d'organismes non cibles; l'utilisation d'organismes atypiques; et le nombre d'échantillons d'essai. Andrews (8) a donné des indications relatives à la préparation des échantillons destinés aux études interlaboratoires de l'AOAC sur les méthodes de microbiologie alimentaire. Ces mêmes recommandations peuvent aussi être adaptées aux fins de la préparation des échantillons d'essai pour une étude de validation réalisée par un seul laboratoire.

9.4 Echantillons de référence

Au lieu d'échantillons de référence, les microbiologistes utilisent des échantillons analytiques témoins positifs (voir section 9.2). Ces témoins non seulement garantissent que les milieux sont satisfaisants, mais encore servent de référence, l'analyste pouvant comparer les réactions d'échantillons inconnus avec celles de l'échantillon "de référence".

En analysant l'échantillon "de référence" et les échantillons inconnus ou échantillon d'essai, l'analyste devrait suivre strictement la méthode recommandée. On est souvent tenté d'"améliorer" ou de modifier une méthode officielle ou standard. Toutefois, des modifications à première vue mineures peuvent compromettre l'intégrité des résultats analytiques et contredire ainsi la méthode officielle ou standard.

9.5 Références

1. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed., K. Helrich (Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
2. U.S. Food and Drug Administration. 1984. Bacteriological Analytical Manual, 6th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
3. American Public Health Association. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd ed., M.L. Speck (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.
4. Health Protection Branch. 1989. Compendium of Analytical Methods for the Microbiological Analysis of, and the Detection of, Extraneous Materials in Foods. Poly Science Publications, Inc., Montreal, Canada.
5. Refai, M.K. 1979. Manuels sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires. 4. Analyse microbiologique. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, Italie.
6. Association of Official Analytical Chemists. 1982. Handbook for AOAC Members, 5th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
7. Committee on Interlaboratory Studies. 1988. Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71:160-172.
8. Andrews, W.H. 1987. Recommendations for preparing test samples for AOAC collaborative studies of microbiological procedures for foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70:931-936.

10. UTILISATION D'ANIMAUX DE LABORATOIRE

Plusieurs espèces d'animaux (souris, rats, hamsters, cobayes, lapins, chats, chiens, singes et poulets) sont utilisées dans les laboratoires. La souris est toutefois l'animal le plus employé en raison du coût relativement faible de son achat et de son élevage. Bien que l'on puisse recourir à de plus grands animaux, tels que les lapins, pour produire des anticorps ou mesurer des réactions cutanées ou oculaires toxiques, les souris sont utiles en microbiologie pour déterminer par exemple la présence de toxines de Clostridium botulinum ou de ciguatera. C'est pourquoi ce chapitre traitera exclusivement de l'emploi des souris.

10.1 Hygiène personnelle

Lorsqu'ils travaillent avec des animaux, les analystes doivent observer des précautions spéciales en matière d'hygiène personnelle. Ils devraient se laver soigneusement les mains avant de manipuler les souris, puis avant de quitter l'animalerie. Ils devraient porter des gants jetables en matière plastique, pour éviter tout contact cutané, durant les opérations d'alimentation, d'abreuvement, de manipulation ou d'élimination de souris infectées. Pendant et après la manipulation de souris, l'analyste ne devrait jamais se toucher le visage, le nez, les yeux ou la bouche. Quand il manipule des seringues, l'analyste doit porter des chaussures fermées et non des sandales pour éviter tout accident. Il est interdit de manger, boire, fumer ou conserver des aliments dans l'animalerie. Toute personne qui pénètre dans un local où se trouvent des animaux infectés devrait porter un masque de chirurgien et des survêtements jetables pouvant être ôtés avant que l'analyste quitte le local. Ces articles devraient être déposés dans un sac en matière plastique antirisque biologique, pour être ensuite traités en autoclave.

10.2 Achat et quarantaine

Lors de la commande des souris, l'analyste devrait préciser l'espèce, la souche, le sexe, l'âge, le poids, le type de cage de carton, le nombre des animaux et la date de livraison. La réception des souris devrait se faire durant l'horaire de travail normal.

Dès leur arrivée, les souris devraient être examinées par un inspecteur vétérinaire ou son représentant officiel et tenues en quarantaine pendant au moins une semaine, ou plus selon les indications de l'inspecteur, dans les mêmes conditions environnementales et nutritionnelles qui seront appliquées durant l'étude. La quarantaine s'effectuera dans un local distinct de l'animalerie. Les souris nées au laboratoire ne nécessitent pas de quarantaine. A la fin de la quarantaine, l'inspecteur devrait remettre les animaux au chercheur, avec un certificat sanitaire vétérinaire (voir Annexe 13).

10.3 Animalerie

Des pièces séparées, sous pression négative, devraient être aménagées pour accueillir les animaux. Chacune de ces pièces doit héberger une seule espèce animale. Par exemple, le local destiné aux souris ne doit pas contenir d'autres animaux de laboratoire. Chaque pièce devrait disposer d'un lavabo avec eau chaude et froide. Les sols doivent être balayés et nettoyés tous les jours avec une solution désinfectante; les parois doivent être

dépoussiérées et désinfectées au moins une fois par mois. La partie supérieure des paillasses, les clayettes, les portes vitrées et les lavabos doivent être désinfectés avant chaque expérience.

La température et l'humidité de l'animalerie doivent être contrôlées en permanence par un hygrothermographe. En théorie, la température devrait être maintenue entre 18 et 26°, et l'humidité entre 40 et 70 %.

Pour la température, l'hygrothermographe sera étalonné comme indiqué à la section 6.2. Pour l'humidité, on placera l'hygrothermographe dans un sac en polyéthylène avec une tasse d'eau. Au bout de 6 heures, on admet que l'hygrométrie devrait raisonnablement être de 96 %, c'est-à-dire située dans la gamme de sensibilité de l'instrument. Au besoin, on peut régler le stylet inscripteur pour refléter ce niveau d'humidité sur le diagramme.

Les papiers pour diagrammes circulaires de l'hygrothermographe devraient être remplacés chaque semaine pour éviter les surimpressions. L'analyste qui insère et retire les papiers devrait parapher et dater ces enregistrements. Une fois retirés, les enregistrements devraient être conservés dans un registre.

L'analyste devrait contrôler l'illumination du local. Il faudrait y installer une minuterie électrique pour maintenir des cycles jour/nuit normaux, c'est-à-dire une alternance de 12 heures de lumière et d'obscurité.

10.4 Cages

Les souris devraient être gardées dans des cages en matière plastique ou en acier inoxydable faciles à nettoyer. Il faudrait changer au moins deux fois par semaine les cages, les couvertures des cages et les litières.

Les cages devraient être suffisamment spacieuses pour éviter tout encombrement, et avoir une hauteur de 13 cm. La superficie dont a besoin une souris dépend de son poids: 39 cm²/10 g; 52 cm²/10-15 g; 77 cm²/15-25 g; et 97 cm²/plus de 25 g.

Chaque cage devrait porter une étiquette avec les mentions suivantes: numéro du programme et/ou de l'expérience, type de toxine ou de bactérie inoculée, date de l'inoculation, dose inoculée, nom du chercheur. Ces renseignements devraient aussi figurer dans un registre.

10.5 Soins et alimentation

Il convient de nourrir les souris avec un aliment du commerce nutritionnellement équilibré. Les souris gestantes devraient recevoir un aliment commercial spécialement formulé. Les aliments pour souris devraient être changés deux fois par semaine, et les bouteilles d'eau trois fois. Il faudrait tenir un registre indiquant la fréquence du remplacement des aliments et de l'eau.

Il faudrait contrôler chaque jour la santé et l'aspect général des souris. Parmi les symptômes de maladie chez les souris, on peut citer les suivants: amaigrissement, diminution de l'activité et perte de poils avec zones d'alopecie, notamment autour du cou

et sur le dos. Les souris qui semblent malades devraient être mises en quarantaine jusqu'à disparition des symptômes. Celles qui ne guérissent pas doivent être sacrifiées, passées à l'autoclave et éliminées comme indiqué à la section 10.8.

10.6 Sélection aux fins d'analyse

Pour réduire au minimum le risque d'erreur dans le choix des souris pour les travaux de laboratoire, on peut utiliser la méthode aléatoire ci-après. Toutes les souris d'un même lot qui ont subi la période de quarantaine et se sont acclimatées sont pesées et placées dans des cages séparées en fonction de leur poids.

Voici un exemple de sélection aléatoire: soit un lot de 10 souris, 5 dans la cage de poids "x" et 5 dans la cage de poids "y". Si deux groupes expérimentaux doivent être testés, on met dans chaque groupe une souris de la cage "x". Puis une souris de la cage "y" est jointe à chaque groupe. Et ainsi de suite jusqu'à ce que chaque groupe expérimental compte 5 souris. Il pourra falloir redistribuer quelques souris afin que l'écart des poids moyens de chaque groupe ne dépasse pas 3-6 g.

Une fois que les souris ont été affectées à un groupe expérimental, on peut les munir d'une étiquette ou leur colorer la queue pour les reconnaître. Pour préparer des colorants rouges (safranine O), violets (cristal violet) ou verts (vert brillant), dissoudre 0,1 g de colorant dans 100 ml dans un mélange en quantités égales d'acétone et d'alcool. Ces réactifs devraient être identifiés et étiquetés comme indiqué à la section 7.2. On applique le colorant sur la queue des souris avec un tampon de coton.

10.7 Contention et voies d'injection

Les procédures de contention et d'injection des souris de laboratoire sont décrites à l'Annexe 14. Bien qu'il existe plusieurs voies d'injection (intrapéritonéale, intramusculaire, sous-cutanée, intradermique, intraveineuse, et par sonde), c'est la voie intrapéritonéale qui est la plus utilisée en microbiologie.

10.8 Elimination

Toutes les souris inoculées, même celles qui survivent à l'injection expérimentale, doivent être sacrifiées (Annexe 15), si nécessaire, et passées à l'autoclave. Les souris non inoculées qui sont mortes pour des raisons apparemment naturelles ou inexplicables doivent passer à l'autoclave. En outre, leurs litières et leurs cages doivent être autoclavées. Il est recommandé que tous les matériels soient traités à l'autoclave pendant au moins 30 et si possible 45 minutes, à 121°. Les carcasses des animaux autoclavés doivent être incinérés.

11. DOCUMENTATION

Il faut tenir un registre systématique et documenté de tous les renseignements pratiques intéressant les analyses exécutées. Une documentation peut être nécessaire pour reconstituer une situation analytique beaucoup de temps plus tard. Par exemple, dans le cas d'un échantillon réglementaire, il se peut qu'un laps de temps très long s'écoule entre la communication des résultats analytiques et leur discussion devant un tribunal.

Les registres devraient aussi être tenus de manière que, si une seconde analyse s'impose, celle-ci puisse se faire dans les mêmes conditions et de la même façon que la première. Tous les renseignements et calculs devraient être consignés clairement, si possible à l'encre. Les données erronées devraient être biffées tout en demeurant lisibles, et les indications correctes devraient être inscrites au-dessus.

Les registres doivent être conservés pendant une durée minimale, souvent fixée par la législation nationale, et protégés contre les détournements, les disparitions et les dégâts. Dans le cas de registres informatisés, il faut prévoir des codes de sécurité.

11.1 Repérage

La documentation permet de suivre le sort d'un échantillon de son prélèvement jusqu'à son élimination. On trouvera à l'Annexe 16 un organigramme indiquant les rapports entre les diverses étapes ou démarches documentaires.

Dans la plupart des cas, l'échantillon est prélevé par un inspecteur et non par l'analyste du laboratoire. L'échantillon est scellé et envoyé au laboratoire, avec un compte rendu du prélèvement. Quand un échantillon parvient au laboratoire, le responsable de la garde des échantillons inscrit dans un registre les données permettant de l'identifier et de le retrouver, la date d'arrivée et le nom de la personne chargée de son entreposage. Le chef du laboratoire désigne un ou plusieurs analystes pour analyser l'échantillon. Le registre des échantillons contient aussi la date de consignation et le nom des agents entre les mains desquels est passé l'échantillon.

Tous les résultats de l'analyse de l'échantillon sont notés dans le compte rendu analytique, et un rapport contenant une version abrégée de ce dernier est préparé. Ce rapport et le compte rendu d'analyse sont envoyés aux archives où ils pourront être retrouvés, le cas échéant. Il faut noter le nom des personnes qui retirent et remettent en place ces documents, ainsi que la date des opérations en cause.

Une fois réalisée l'analyse de laboratoire, il peut être nécessaire de conserver l'échantillon pendant une longue période dans l'attente d'une action judiciaire. Le lieu et les conditions de conservation, le nom des responsables de l'entreposage, ainsi que la signature (et la date) des personnes (gardien des échantillons et analystes) qui ont manipulé l'échantillon pendant cette période.

La séquence des annotations (rapport d'échantillonnage, sceau officiel de l'échantillon, registre des échantillons et compte rendu de l'analyste) devrait constituer une ligne documentaire continue illustrant de façon claire, exacte et incontestable du sort de

l'échantillon, tous les éléments de cette documentation devant être cohérents. On devrait pouvoir choisir un échantillon en tout point de son passage dans le laboratoire, retrouver tous les documents y relatifs, reconstruire son histoire du moment de son arrivée au laboratoire et recueillir toute donnée pertinente.

11.2 Fiches d'échantillonnage

La fiche d'échantillonnage est normalement remplie par l'inspecteur. L'analyste doit toutefois veiller à ce que les données de la fiche correspondent exactement à l'identité de l'échantillon envoyé au laboratoire et s'assurer que les renseignements de son compte rendu (section 11.3) correspondent à celles de la fiche d'échantillonnage.

Un exemple de fiche d'échantillonnage figure à l'Annexe 17. Il s'agit du formulaire utilisé par la Food and Drug Administration des Etats-Unis pour ses besoins propres. Etant donné que certains points n'intéressent pas d'autres agences ou organisations, on n'examinera ici que ceux d'application générale.

- a. Point 1, Introduction. Toutes informations spéciales concernant l'état du lot ou la manutention de l'échantillon.
- b. Point 2, Type d'échantillon. On peut distinguer divers types d'échantillons. Les échantillons officiels sont ceux qui, s'ils contreviennent aux normes, servent de base à des actions juridiques. Les échantillons d'investigation sont prélevés pour étayer des observations ou corroborer des conclusions réglementaires ou autres, et comprennent les prélèvements à l'usine (matières premières et produits finis, pour déterminer les conditions de fabrication), les échantillons d'enquête (pour fournir des données sur les pratiques industrielles relatives à une question particulière), et les échantillons d'instance (en cas de lésion et d'intoxication). Les échantillons en rapport avec les normes alimentaires fournissent des données servant à l'élaboration des spécifications microbiologiques pour les aliments.
- c. Point 3, Numéro de l'échantillon. Chaque échantillon porte un numéro non réutilisable.
- d. Point 7, Date du prélèvement. Si le prélèvement a pris plus d'un jour, il faut indiquer l'intervalle de temps (par exemple 1er-3 avril 1989).
- e. Point 12, Echantillons connexes. On indique le numéro des autres échantillons de la même livraison ou d'autres échantillons éventuellement apparentés.
- f. Point 17, Nom et identification du produit. On indique la dénomination précise du produit. A cet effet, il faut signaler le type de conditionnement (vrac, sac de papier, récipient jetable, bocal en matière plastique, etc.), ainsi que les mentions pertinentes de l'étiquette (marque, appellation générique, contenu, nom et adresse du fabricant ou du distributeur, code).

Lorsque le produit est conditionné dans un carton, un conteneur ou un autre récipient similaire, il faudra rapporter les mentions d'étiquetage de l'étiquette.

Quand on reproduit les mentions d'étiquetage, il faut utiliser la même graphie (orthographe, majuscules, ponctuation et disposition) que sur l'étiquette originale.

- g. Point 18, Motif du prélèvement. Il faut indiquer en détail la raison pour laquelle l'échantillon a été prélevé, ainsi que l'infraction suspectée et l'analyse à faire. Les mémorandums, lettres et autres documents d'instructions entre districts ou régions, ou provenant du siège, doivent être suffisamment bien référencés pour faciliter leur recherche.
- h. Point 19, Codes de fabrication. Il faut indiquer tous les codes, numéros des lots et codes de contrôle des lots figurant sur les étiquettes, cartons et emballages.
- i. Point 20, Fabricant. Il faut noter le nom et l'adresse (rue, ville, Etat et code postal) du fabricant.
- j. Point 21, Transporteur. Il faut noter le nom et l'adresse (rue, ville, Etat et code postal) du transporteur.
- k. Point 22, Négociant. Il faut noter le nom et l'adresse (rue, ville, Etat, code postal) et le numéro de téléphone du négociant d'où provient l'échantillon.
- l. Point 23, Taille du lot échantillonné. Il faut indiquer la dimension du lot avant l'échantillonnage, conformément à l'inventaire effectué par l'échantillonneur. On inscrit le nombre de caisses d'expédition et la taille des constituants, par exemple 250 sacs de 50 kg.
- m. Point 27, Description de l'échantillon et de la méthode de prélèvement. Il faut décrire l'échantillon, noter le nombre et la taille des échantillons ou sous-échantillons, et indiquer comment ils ont été prélevés, par exemple "trois boîtes de chaque caisse dans un lot de 20 caisses scellées choisies au hasard".
- n. Point 28, Mode de préparation. On indique comment l'échantillon a été préparé avant d'être envoyé au laboratoire, comment l'échantillon ou les sous-échantillons sont identifiables et comment l'échantillon a été emballé et scellé. On indique aussi sous quelle forme l'échantillon a été envoyé au laboratoire (sac de papier, carton original, etc.).
- o. Point 29, Identification de l'échantillonneur sur le paquet et/ou l'étiquette. L'échantillonneur signale l'identification placée sur les emballages, les étiquettes, etc., par exemple "79-180-121 10-15-78 SHR".

- p. Point 30, Identification de l'échantillonneur sur le cachetage. L'échantillonneur note l'identification utilisée sur le cachetage officiel final appliqué sur l'échantillon, par exemple "79-180-121 10-15-78 Sylvia H. Rogers".
- q. Point 31, Destinataire. On indique le nom de la personne à qui l'échantillon a été livré. Si l'échantillon est remis au gardien des échantillons sous scellés, on pourra écrire par exemple "Remis en personne au gardien John Doe". Si l'échantillon est confié à un analyste, on pourra écrire par exemple "Remis en personne à l'analyste John Doe". Si l'échantillon est expédié, il faudrait indiquer le nom du transporteur et éventuellement le numéro du document d'expédition.
- r. Point 32, Date de livraison. On note la date de livraison ou d'expédition au laboratoire.
- s. Point 33, Laboratoire. On indique le nom du laboratoire auquel l'échantillon a été envoyé.
- t. Point 35, Protocole de prélèvement original. On indique le nom du laboratoire auquel le protocole de prélèvement original a été remis.
- u. Point 36, Documentation rassemblée. Tous les documents réunis par l'inspecteur sont énumérés: type, numéro et date, par exemple numéro et date de la facture, document d'expédition, certificats officiels.
- v. Point 37, Observations. Si cette case est utilisée, il faut indiquer le numéro des cases auxquelles les observations se rapportent.
- w. Point 41, Echantillonneur. L'échantillonneur devra écrire son nom et signer le protocole d'échantillonnage. Le rapport doit être signé uniquement par la personne qui a identifié et scellé l'échantillon, dont les initiales figurent sur les sous-échantillons et dont le nom est indiqué sur le cachetage.

11.3 Comptes rendus d'analyse

Les fiches de l'analyste constituent un compte rendu écrit des résultats analytiques du laboratoire. Bien qu'il existe divers modèles de fiches, celles-ci doivent satisfaire à un certain nombre de critères:

- a. Tous les renseignements de base doivent être transcrits directement sur la fiche avant de commencer l'analyse. Dès que la fiche est établie, l'analyste devrait la parapher. Le plus grand nombre possible de cases de la fiche devraient être remplies dès le début.
- b. Toutes les annotations devraient être clairement lisibles et écrites à l'encre.

- c. Aucune annotation ne devrait être effacée ou surchargée. Dans le cas d'une annotation erronée, l'analyste devrait la biffer, écrire au-dessus la mention juste et apposer ses initiales.
- d. Aucune donnée ne devrait être supprimée sans explication. S'il s'avère nécessaire d'éliminer une annotation, l'analyste devrait la biffer, parapher, dater et donner les raisons de la suppression.
- e. La méthode d'analyse utilisée devrait être indiquée clairement et complètement. Si la méthode est inédite, il faudrait la décrire en détail sur la fiche ou sur un feuillet complémentaire. Nombre de méthodes ne fournissent pas de détails sur la préparation des échantillons. Si la méthode employée est de ce type, l'analyste devrait indiquer en détail comment l'échantillon a été préparé.
- f. Si l'analyse a été exécutée en double, en triple, etc., il importe de consigner le résultat de chaque essai et de résumer l'ensemble des résultats obtenus.
- g. Il faudrait indiquer le nombre approprié de décimales. Un nombre de décimales plus élevé que ne le justifient les limites de la méthode donne une fausse impression de son exactitude.
- h. Si plus d'un analyste ont participé à l'analyse, il faut indiquer clairement sur la fiche qui a brisé le cachetage et qui a effectuée chaque phase de l'analyse.
- i. Les feuillets complémentaires joints à la fiche d'analyse devraient être numérotés de façon consécutive.

Un exemple de compte rendu d'analyse figure à l'Annexe 18. Sur cette fiche, les renseignements à donner sont les suivants:

- a. Point 1, Produit. L'analyste devrait suivre d'aussi près que possible la terminologie du rapport d'échantillonnage (Annexe 17, point 17). Il devrait utiliser autant que possible le nom courant du produit (par exemple mélange de givrage, chocolat au lait ou cuisses de grenouilles congelées). Si le produit n'a pas de dénomination courante, il faudrait employer une expression descriptive telle que "poudre brune dans un sac en matière plastique".
- b. Point 2, Numéro de l'échantillon. L'analyste devrait noter fidèlement le numéro de l'échantillon qui figure dans le rapport d'échantillonnage (Annexe 17, point 2).
- c. Point 3, Cachetage de l'échantillon. Si l'échantillon est cacheté, il faudrait indiquer dans la case appropriée si le cachetage est intact ou brisé. Il faudrait aussi signaler si l'échantillon n'est pas cacheté.
- d. Point 4, Date de réception. On indiquera la date de réception par l'analyste de l'échantillon à analyser.

- e. Point 5, Livreur. On indiquera le nom complet de la personne qui a effectivement livré l'échantillon à l'analyste. Si celui-ci retire l'échantillon de l'entrepôt, il devra en indiquer l'origine, par exemple congélateur.
- f. Point 6, District ou laboratoire. On indiquera le nom du laboratoire chargé de l'analyse.
- g. Point 7, Description de l'échantillon. Il faudrait donner une description complète de l'échantillon, coïncidant autant que possible avec le rapport d'échantillonnage (Annexe 17, point 25). On indiquera le nombre et le type des emballages (par exemple boîte de carton, sac de papier), ainsi que le nombre et le type de chaque récipient dans le paquet. Si ces récipients ne portent pas une mention du poids net, il faudra en décrire la dimension et le type (par exemple "sac de papier contenant 5 livres de produit").

Il faudra reproduire littéralement l'inscription du cachetage et l'identification de l'inspecteur, et indiquer l'emplacement du cachetage, les numéros d'identification et les numéros des sous-échantillons.

Le cas échéant, il faudra déclarer si l'échantillon était entièrement congelé à son arrivée, s'il était décongelé ou s'il semblait avoir été décongelé et recongelé. On devrait signaler toute odeur inhabituelle. Si des portions de l'échantillon sont endommagées, il faudra indiquer l'état de l'échantillon et le nombre des sous-échantillons détériorés.

- h. Point 8, Contenu net. On indiquera le contenu net déclaré sur l'étiquette du produit et le résultat d'un contrôle de routine du contenu net. On cochera la case appropriée.
- i. Point 9, Etiquetage. On indiquera dans les espaces blancs avant les mentions "ORIGINAUX JOINTS" et "COPIES JOINTES" le nombre de chaque type d'étiquette soumise par l'analyste et/ou l'inspecteur dans son rapport. Lorsque l'étiquette est présentée par l'inspecteur, on indiquera dans la case 9, Etiquetage, que l'étiquette était jointe au rapport d'échantillonnage. Si aucune étiquette n'a été fournie avec l'échantillon ou dans le rapport d'échantillonnage, on cochera la case "AUCUNE".
- j. Point 10, Résumé de l'analyse. Les renseignements suivants devraient être fournis:
RECIPIENT - On décrira la taille, le type, la couleur et le mode de fermeture du récipient commercial immédiat du produit et le mode de fermeture des récipients pour la vente au détail. Toute anomalie ou condition insolite relative au récipient (par exemple boîte ouverte, fuites, cachetage commercial rompu) devrait être signalée et il faudrait décrire les récipients utilisés par l'inspecteur.

ETIQUETAGE - On indiquera de quelle manière le récipient est étiqueté (par exemple emballage de papier imprimé, étiquette frontale). L'analyste reportera toutes les mentions d'étiquetage concernant l'échantillon, y compris

celles des cartons d'expédition, des encarts et des emballages des échantillons. Toutes les mentions d'étiquetage transcrites par l'analyste doivent être accompagnées du numéro de l'échantillon, de la date et des initiales figurant sur l'étiquette et sur le papier où elle est apposée.

CODE - On signalera les codes employés, en indiquant leur type et leur emplacement. Si l'échantillon ne porte pas de code mais si le rapport d'échantillonnage en indique un (Annexe 17, point 19), celui-ci doit être mentionné.

PRODUIT - On fera une description complète et exacte du produit, en indiquant le cas échéant sa couleur, son odeur et son aspect général. Il ne faut en aucun cas goûter un échantillon envoyé pour analyse microbiologique. On signalera le nom courant des produits aisément reconnaissables (par exemple cuisses de grenouilles congelées, petits pois en conserve, champignons de couche frais) et toute anomalie observée (par exemple odeur putride, décoloration ou boîtes bombées).

ANALYSE - L'analyste fera un résumé des résultats de l'analyse microbiologique et indiquera la méthode utilisée ou la décrira si elle est inédite. Il indiquera avec exactitude comment l'échantillon d'essai a été prélevé dans l'échantillon total, ainsi que toutes les étapes préparatoires avant la prise d'une portion pour l'analyse (par exemple mélange, formulation, mouture). Il faudra aussi indiquer les substances témoins utilisées et les résultats obtenus avec elles.

- k. Point 11, Echantillon de réserve. Il convient de décrire clairement l'échantillon de réserve et de signaler le cachetage utilisé par l'analyste. Si l'échantillon de réserve n'est pas remis au gardien des échantillons, l'analyste doit indiquer comment et où il est entreposé.
- l. Point 12, Signature de l'analyste. L'analyste signe de son nom complet. Si plusieurs personnes ont participé à l'analyse, celle qui a brisé le cachetage doit apposer sa signature dans le cadre 12a et cocher la case "DECACHETAGE".
- m. Point 13, Vérification du compte rendu d'analyse. L'exactitude, la complétude et la compatibilité des comptes rendus avec d'autres documents doivent être contrôlés par le chef du laboratoire ou son représentant. Le vérificateur signe et date cette section. Si une erreur est décelée, le superviseur ne doit apporter lui-même aucune correction; il signale l'erreur à l'analyste, lequel fera la correction.
- n. Point 14, Date du compte rendu. La date indiquée est celle de la présentation du compte rendu par l'analyste au chef du laboratoire.

Le nombre total de pages, la numérotation de chaque page et le nombre d'annexes sont indiqués en bas de page sur le compte rendu d'analyse.

Le verso du compte rendu est utilisé comme suit:

- a. Le numéro de l'échantillon est inscrit dans l'angle supérieur droit avant que toute autre mention n'y soit portée. Cela donne à l'analyste l'assurance qu'il remplit la fiche juste (sans se rapporter au recto) quand plus d'un échantillon sont analysés en même temps.
- b. La méthode utilisée est indiquée avec exactitude. Si des modifications lui ont été apportées, il faut les signaler et en donner les raisons.
- c. Tous les calculs sont clairement indiqués, avec le nombre approprié de décimales.
- d. En ce qui concerne les pesées, on indique le poids brut, la tare et le poids net.
- e. On explique comment les dilutions ont été faites.
- f. On indique les témoins utilisés et les résultats obtenus avec eux.
- g. Les données et calculs figurant dans les annexes ou les feuillets complémentaires sont résumés sur le verso du compte rendu.

Plusieurs types de feuillets complémentaires peuvent être utilisés pour des analyses microbiologiques particulières. En voici quelques exemples:

- a. Résumé des résultats d'analyse bactériologique (Annexe 19).
- b. Rapport d'analyse bactériologique (Annexe 20).
- c. Rapport sur la recherche de Salmonella (Annexe 21).
- d. Rapport sur la recherche de Shigella (Annexe 22).
- e. Feuillelet complémentaire pour l'analyse d'un aliment en conserve (Annexe 23).
- f. Feuillelet complémentaire pour la recherche de Botulinum (Annexe 24).
- g. Fruits de mer, rapport d'analyse bactériologique (Annexe 25).

En raison de la diversité de ces feuillets complémentaires, il serait peu pratique de les examiner un à un. On les a reproduits en annexe pour donner au lecteur un aperçu des différentes façons de rapporter des données microbiologiques. Sur le verso des feuillets complémentaires appropriés, l'analyste devrait indiquer les milieux, produits chimiques et sérums utilisés, ainsi que leur provenance (fabricant) et numéro de lot.

11.4 Autres documents

Des registres à couverture rigide et aux pages prénumérotées sont utilisés pour consigner des données et observations analytiques distinctes de celles provenant de l'analyse d'un échantillon officiel dont les résultats doivent être inscrits dans le compte rendu d'analyse et non dans des registres.

Comme indiqué plus haut, toutes les données concernant l'assurance de la qualité doivent figurer dans des registres: étalonnage des poids et des appareils, maintenance et réparation de l'équipement, préparation des milieux et des réactifs, surveillance de la qualité microbiologique de l'air du laboratoire, et surveillance de la température des étuves. Il est bon de réserver les premières pages des registres pour la table des matières.

En plus des données sur l'assurance de la qualité, on peut consigner dans les registres des informations sur les recherches. Les directives générales concernant la rédaction des comptes rendus d'analyse valent aussi pour la transcription des informations sur les recherches.

Le contrôle du comportement professionnel des analystes a été discuté dans la section 4.3. Chaque analyse d'un échantillon d'épreuve et ses résultats devraient être enregistrés. Il faudrait encourager les analystes à consulter périodiquement les dossiers pour évaluer leur rendement. Les superviseurs devraient examiner périodiquement ces dossiers pour déterminer s'il convient d'augmenter la fréquence des analyses d'échantillons d'épreuve ou si une formation supplémentaire est nécessaire.

12. INSPECTIONS ET VERIFICATIONS DE L'ASSURANCE DE LA QUALITE

Les inspections et vérifications permettent à l'administration d'évaluer l'efficacité du programme d'assurance de la qualité. Sur la base de leurs résultats, elle prend des décisions concernant par exemple les besoins futurs en matière de formation, la réaffectation du personnel, les ajustements budgétaires, les mesures correctives nécessaires et les recommandations. D'une année à l'autre, les inspections et vérifications devraient révéler une augmentation régulière du niveau d'application du programme d'assurance de la qualité, de la capacité professionnelle des analystes et de la fiabilité des données analytiques, et cela même si la rotation du personnel est importante, à condition que le programme d'assurance de la qualité soit valable et bien géré.

12.1 Examen des activités courantes

Le superviseur devrait contrôler le travail des analystes de façon systématique, voire quotidienne. Il pourra utiliser les comptes rendus d'analyse, principaux produits finals du laboratoire, pour surveiller la qualité du travail analytique. Chaque compte rendu devrait avoir une case pour la signature du superviseur, attestant ainsi qu'il en a vérifié l'exactitude et la complétude. Avant d'apposer sa signature, le superviseur devrait s'assurer que les prescriptions suivantes sont satisfaites:

- a. L'échantillon d'essai et son état lors de sa réception sont décrits de manière claire et exhaustive.
- b. Les données du compte rendu sont comparables à celles du rapport d'échantillonnage. Ces deux documents peuvent servir à prouver l'intégrité de l'échantillon.
- c. Les cultures témoins de référence, les autres témoins, les milieux (et leurs numéros de lot) et les réactifs utilisés sont clairement signalés.
- d. Les calculs mathématiques sont exacts et faciles à comprendre.
- e. Si plusieurs analystes ont participé à l'analyse, chacun d'eux a paraphé la partie dont il était chargé.
- f. Le compte rendu d'analyse indique où se trouve l'échantillon de réserve ou le sort réservé à l'échantillon d'essai.

En plus de l'examen du compte rendu écrit, le superviseur peut demander à l'analyste un rapport oral durant lequel celui-ci expliquera toutes les phases de l'analyse et en discutera les résultats.

Le superviseur devrait en outre vérifier fréquemment divers éléments du contrôle de la qualité, comme l'entretien et l'étalonnage des appareils, les conditions d'entreposage des cultures mères de référence, la préparation des milieux, le soin et l'alimentation des

animaux de laboratoire, etc. Il devrait s'assurer que ces éléments et d'autres facteurs en rapport avec le contrôle de la qualité sont convenablement documentés selon les dispositions du programme approuvé d'assurance de la qualité.

12.2 Etudes rétrospectives

En plus des contrôles quotidiens susmentionnés, les travaux du laboratoire devraient faire l'objet d'études rétrospectives détaillées, conduites par l'unité de l'assurance de la qualité et selon une fréquence fixée par l'administration. La périodicité de ces études varie entre trois mois et un an.

Comme indiqué à la section 1.4, la nature et la dimension de l'unité de l'assurance de la qualité sont déterminées par l'administration. Dans les grands laboratoires, l'unité peut comprendre deux personnes ou plus devant exclusivement contrôler le programme d'assurance de la qualité. Dans les petits laboratoires, un ou plusieurs microbiologistes peuvent être chargés de cette fonction à temps partiel. Dans ce dernier cas, les préposés devraient être aussi objectifs que possible et ne pas contrôler leurs propres travaux ou les activités effectuées sous leur direction. En tout état de cause, les vérificateurs devraient posséder des connaissances scientifiques et une expérience suffisantes pour comprendre la nature des travaux scientifiques inspectés.

Il est d'usage que les vérifications de l'unité de l'assurance de la qualité soient annoncées à l'avance. L'administration et les superviseurs directs sont informés de la date exacte de la vérification pour donner au service le temps de se préparer et de réduire au minimum le dérangement des opérations normales du laboratoire. Toutefois, dans certains cas, il peut être avantageux de procéder à une inspection par surprise qui permettra au contrôleur d'observer le fonctionnement quotidien du laboratoire sans que les analystes aient pu se préparer d'avance à l'inspection. La fréquence de ces contrôles imprévus devrait cependant être aussi faible que possible.

La nature et la durée des inspections varient considérablement. Certaines visites peuvent prendre 15 minutes, d'autres durer toute une journée. On trouvera à l'Annexe 26 une liste des opérations de contrôle à l'usage des analystes et des inspecteurs. L'analyste peut utiliser cette liste pour se préparer à l'inspection, tandis que l'inspecteur l'emploiera pour sa vérification. Si l'on souhaite que l'inspection soit brève tout en étant utile, une possibilité consisterait à utiliser une ou deux sections de la liste pour chaque contrôle. Par exemple, une vérification portera sur l'entretien des appareils, et une autre sur la documentation. Si l'administration décide de débloquer les ressources nécessaires, l'inspection pourra être longue et complète, couvrant tous les points de la liste.

Pour ne pas susciter d'appréhension et faciliter l'obtention de réponses moins réticentes, un membre du personnel devrait accompagner les inspecteurs de l'unité de l'assurance de la qualité. Les inspecteurs devraient poser des questions sur tout point obscur et donner toutes possibilités aux analystes pour dissiper d'éventuels malentendus.

Après la visite d'inspection, les membres de l'unité de l'assurance de la qualité devraient se réunir avec le directeur du laboratoire et le membre du personnel qui les a accompagnés. Les inspecteurs exposeront leurs conclusions et soumettront des recommandations pour améliorer des situations critiques particulières.

Enfin, l'unité de l'assurance de la qualité devrait préparer un rapport écrit. Il importe que ce rapport soit rédigé en temps utile, normalement durant la semaine qui suit l'inspection. Avant de soumettre le rapport à l'administration, le directeur du laboratoire et le personnel devraient avoir l'occasion de l'examiner afin de corriger d'éventuelles erreurs et méprises. Le rapport devrait être rédigé dans un langage objectif, impersonnel et non provocateur.

Le rapport devrait signaler les éventuelles insuffisances et indiquer les locaux où elles ont été observées. Si ces insuffisances se répètent ou n'ont pas été corrigées à la suite de l'inspection précédente, il faudra le noter. Les diverses insuffisances devraient être énumérées par ordre de gravité. Le rapport devrait proposer des recommandations constructives pour remédier aux manquements, notamment les plus importants.

12.3 Accréditation

Il existe à travers le monde de nombreux systèmes d'accréditation appliqués par des services gouvernementaux, des associations professionnelles et d'autres organismes nationaux ou internationaux. Un système, obligatoire ou volontaire, peut être utilisé pour un pays, une région, une industrie ou un secteur technique particulier. Les laboratoires participants doivent avoir atteint un certain niveau qualitatif et l'organe d'accréditation doit s'en assurer. Les évaluations sont faites par des professionnels, habituellement des experts du domaine d'activité du laboratoire, ayant suivi un cours de formation sur l'évaluation des laboratoires.

Il y a deux facteurs critiques pour l'accréditation ou la certification d'un laboratoire: la professionnalité de l'analyste dans un programme d'évaluation des compétences et la visite sur place de l'agent certificateur.

Le programme de contrôle des compétences est réalisé au moins une fois par an et tous les analystes doivent y participer. L'organe certificateur envoie des échantillons "fractionnés" à tous les participants à qui il est demandé d'effectuer certaines analyses, par exemple dénombrement des aérobies ou nombre le plus probable de coliformes totaux. Toutes les analyses sont faites dans des conditions rigoureusement contrôlées: tous les analystes commencent à travailler à la même heure, utilisent la même méthode, préparent les milieux de culture conformément à des directives précises, procèdent aux dénombrements des microorganismes sur plaques ou en tubes ou à leur interprétation de façon similaire, etc. Après avoir terminé les analyses, les analystes participants envoient rapidement leurs résultats au laboratoire ou organe certificateur. Les résultats sont examinés sur une base statistique et les participants sont informés des conclusions.

Le deuxième facteur critique d'accréditation est représenté par les résultats de la visite sur place des agents certificateurs. La forme, le style et la conception de cette visite sont semblables à ceux de l'inspection ou de la vérification de l'assurance de la qualité. L'observation d'un bon programme d'assurance de la qualité est fondamentale pour la visite d'accréditation. Les agents certificateurs utilisent une liste de pointage pour déterminer l'observation d'éléments clés du programme d'assurance de la qualité comme la structure du laboratoire, la formation et les qualifications du personnel, la responsabilité et l'intégrité des échantillons, l'entretien et la réparation des appareils, la préparation des milieux de culture, l'emploi de méthodes appropriées et, point très important, la documentation.

L'Organisation internationale de normalisation (1) et le Department of Trade and Industry du Royaume-Uni (2) ont élaboré des directives pour le contrôle des compétences analytiques des laboratoires investigateurs. L'organisme britannique a préparé un manuel d'assurance de la qualité qui expose clairement les éléments du programme et leur application dans le laboratoire investigateur.

Les programmes d'accréditation des laboratoires présentent divers avantages. Tout d'abord, ils renforcent la fiabilité des résultats analytiques. En second lieu, ils permettent des économies en ce sens que les résultats d'un laboratoire peuvent être acceptés sans qu'il faille répéter l'analyse ailleurs. Troisièmement, l'accréditation accroît la crédibilité, le prestige et le statut des laboratoires homologués. Enfin, ils fournissent des données de rétroaction sur l'idonéité des méthodes d'essai pour les organes de normalisation, ce qui peut conduire à l'amélioration des méthodes d'analyse.

12.4 Activités de suivi

Après l'inspection réalisée par l'unité de l'assurance de la qualité, une étude de suivi devrait déterminer si les insuffisances ont été corrigées, et de quelle manière. Cette étude permettra aux membres de l'unité de savoir dans quelle mesure leurs recommandations ont été appliquées. Par définition, l'étude de suivi devrait être brève (quelques minutes au maximum).

En théorie, l'intervalle entre le contrôle de l'assurance de la qualité et l'étude de suivi ne devrait pas excéder 2-4 semaines. Il ne faut cependant pas oublier que certaines conditions indépendantes de la volonté de l'analyste, par exemple mauvais fonctionnement du système d'aération ou présence d'insectes, peuvent nécessiter plus de temps pour être corrigées.

12.5 Références

1. International Organization for Standardization. 1982. General requirements for the technical competence of testing laboratories, ISO/IEC Guide 25-1982(E). International Organization for Standardization, Switzerland.
2. Anonymous. 1984. Report of Task Force "D" at the International Laboratory Accreditation Conference, London, U.K. Department of Trade and Industry, London, U.K.

Exemple de manuel sur l'assurance de la qualité

**MANUEL SUR L'ASSURANCE DE LA QUALITE
A L'USAGE D'UN LABORATOIRE NATIONAL OU
REGIONAL DE CONTROLE DE L'APPLICATION
DES NORMES ALIMENTAIRES**

**Le présent manuel est publié sous la
responsabilité du Directeur du laboratoire**

.....
(signature)

<p>No. D'EDITION (OU DE PUBLICATION): DATE DE PUBLICATION: EXEMPLAIRE No.: ENVOYE A:</p>
--

TABLE DES MATIERES

Contenu du manuel, par sections et paragraphes.

EXPOSE SUR LA POLITIQUE EN MATIERE DE QUALITE

L'exposé doit être concret et ne pas se limiter à une suite de lieux communs, sans pour autant contenir des déclarations spécifiques. Il devrait être direct et indiquer la personne chargée de la mise en oeuvre de la politique.

ECHANTILLONNAGE DE CONTROLE

Il convient que le laboratoire participe à des programmes extérieurs d'échantillonnage de contrôle. Le manuel AQ devrait fournir les détails de cette activité. Quand il n'existe pas de tels programmes ou lorsqu'ils sont trop dispendieux, et s'il y a plusieurs laboratoires raisonnablement proches géographiquement, il vaut la peine d'effectuer un programme collectif d'échantillonnage de contrôle.

RESPONSABILITE DU MANUEL

La personne (souvent appelée agent d'assurance de la qualité) ou les personnes chargées de rédiger, distribuer, amender et maintenir le manuel sur l'assurance de la qualité devraient être indiquées dans cette section.

PROCEDURE D'AMENDEMENT

Il faudrait établir un système d'enregistrement et de recherche des amendements apportés de temps à autre au manuel. Les possesseurs du manuel disposeront ainsi d'un document actualisable. Ce système peut prendre la forme du formulaire représenté à la figure 1. L'agent AQ peut lui-même insérer les amendements dans le manuel, retirer les pages devenues inutiles, ou envoyer les modifications aux possesseurs du manuel en les priant de les y insérer. Toutes les pages périmées doivent être détruites, sauf une qui sera gardée comme référence. Une partie du processus d'inspection consistera à vérifier que les exemplaires du manuel sont complets et à jour.

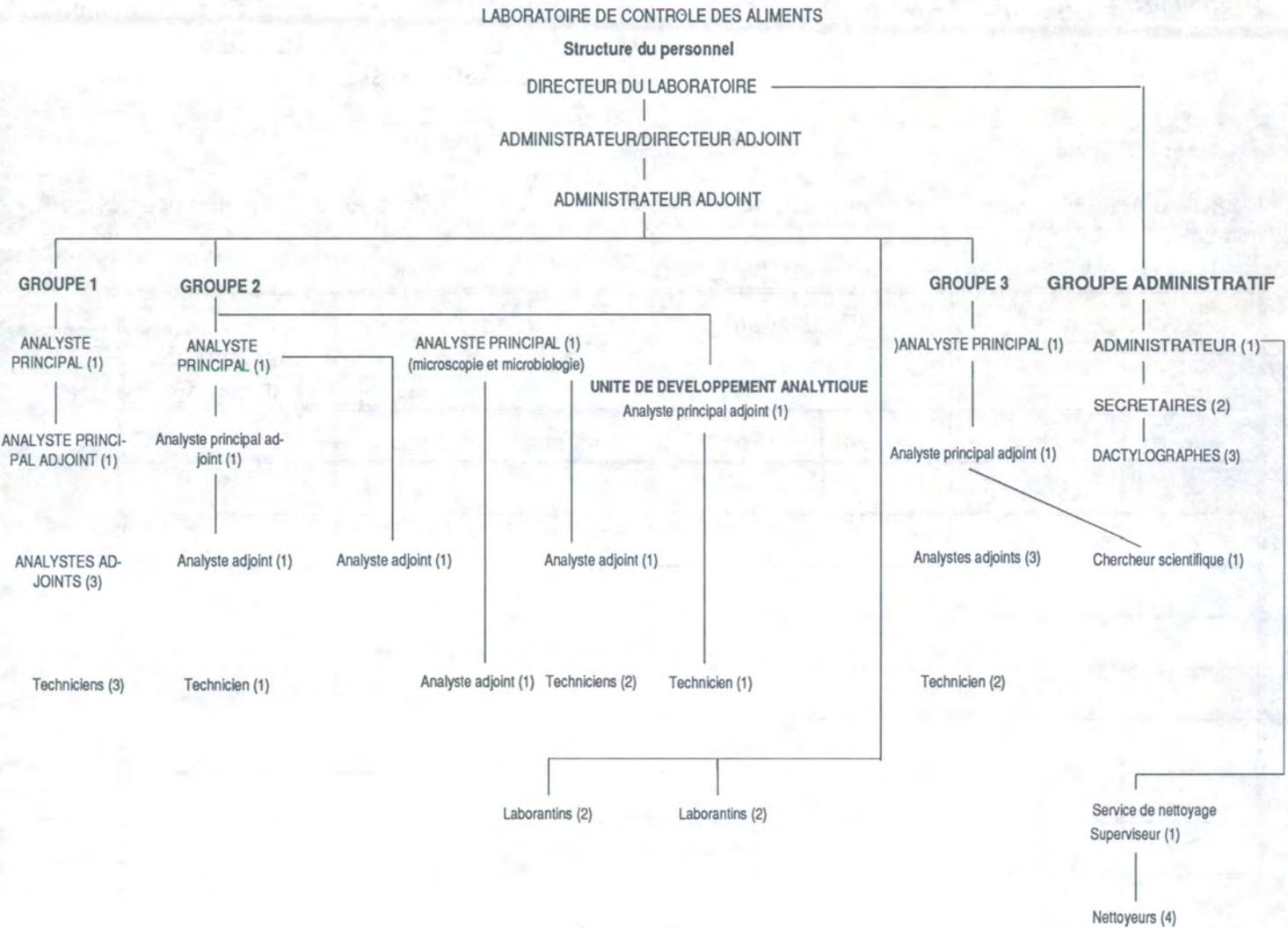
ORGANISATION DU LABORATOIRE

Il faudra préparer un exposé sur l'organisation interne du laboratoire, ainsi que dans un contexte plus étendu. Des organigrammes pourront être insérés (voir figure 2). L'exposé devrait décrire les responsabilités de chacun et les éventuelles délégations de pouvoirs.

MANDAT DE L'UNITE D'ASSURANCE DE LA QUALITE

Dans ce chapitre sera défini le mandat de l'unité AQ. Le cas échéant, on décrira les fonctions de l'agent AQ.

Figure 2
Modèle d'organigramme



Le manuel devrait indiquer les objectifs de la formation et la façon de les réaliser. Le personnel d'un certain niveau devrait suivre des cours sur l'assurance de la qualité. Une fiche de formation, comme celle de la figure 3, devrait être prévue dans le manuel, avec modèle en annexe. Le manuel devrait aussi indiquer comment tenir la fiche et exposer la politique générale en matière de formation.

(La formation est discutée plus en détail au chapitre 4)

Figure 3

LABORATOIRE DE CONTROLE DES ALIMENTS
FICHE DE FORMATION

NOM DE L'ANALYSTE:

Code de la méthode	Méthode	Date fin théorie	Date fin pratique Explication/pratique démonstration		Fin du cours:		Approuvé par l'administrateur du laboratoire signature/date
					Signature stagiaire	Signature instructeur	
	1. Humidité (séchage en étuve)						
	2. Humidité (Dean et Stark)						
	3. Cendres						
	4. Lipides						
	5. Protéines						
	6. Teneur énergétique						
	7. Fibres (Van Soest)						
	8. Sucres						
	9. Amidon						
	10. Sodium						
	11. Acides gras						

PROCEDURES OPERATIONNELLES STANDARD

Tous les travaux réalisés au laboratoire sont des opérations. Celles-ci peuvent toutes être décrites et illustrées dans des Procédures opérationnelles standard (POS). Les procédures administratives devraient être établies sous forme de POS. Dans cette section, le manuel peut renvoyer à un fichier permanent de POS ou à une liste de POS citées en annexe. Cette seconde formule risque de ne pas être satisfaisante si les procédures sont amendées fréquemment ou si de nouvelles procédures sont adoptées.

Il faudrait établir des POS pour les procédures administratives suivantes:

tenue et recherche des dossiers
responsabilité des échantillons
affectation et contrôle des analyses
comptes rendus des résultats

Ces POS et les procédures qui y sont décrites ne constituent pas une partie directe du programme d'assurance de la qualité, mais elles doivent être consignées par écrit afin que l'on puisse les vérifier durant une inspection. L'inspection est une partie intégrante du programme d'assurance de la qualité.

VERIFICATION DE LA QUALITE

Les inspections permettent d'évaluer la performance du programme d'assurance de la qualité. Dans cette section, il faudrait décrire les objectifs des inspections et indiquer comment et par qui elles doivent être effectuées.

Les inspections doivent être:

- 1) planifiées avec un calendrier précis pour garantir leur efficacité;
- 2) pleinement documentées, avec enregistrement officiel de leurs résultats et identification des mesures correctives requises;
- 3) réalisées en conformité d'un programme préétabli et dans un esprit positif.

La personne qui procède à l'inspection ne devrait pas être un membre du laboratoire contrôlé; il pourra s'agir d'un superviseur ou d'un analyste d'une autre section. Dans la mesure du possible, il importe d'éviter les auto-inspections.

Le manuel devrait comprendre le programme d'inspection établi par l'administration.

EXAMEN DES VERIFICATIONS

L'administration et l'équipe d'assurance de la qualité se réunissent et examinent les rapports d'inspection et autres activités touchant à la qualité. Le manuel devrait indiquer en détail les domaines à examiner et le système à utiliser à cette fin.

AUTRES QUESTIONS

Cette section traitera d'autres parties du programme AQ non précédemment abordées, ainsi que des prescriptions en matière de documentation. Un grand nombre de ces points ont été discutés dans les chapitres 5 à 11.

ANNEXE 2

Contrôle des surfaces - Méthode par contact au tampon

1. Découper des éponges de cellulose en morceaux d'environ 5 x 5 cm et les passer à l'autoclave en sacs de papier.
2. Humidifier les morceaux d'éponge stérilisés avec environ 10 ml de bouillon nutritif ou d'eau peptonée à 0,1 %.
3. En opérant sous asepsie, saisir l'éponge stérile humidifiée avec des pinces ou des gants stériles et frotter vigoureusement un mètre carré de la superficie choisie.
4. Placer l'éponge dans un sac stérile en matière plastique et ajouter 100 ml de diluant.
5. Malaxer vigoureusement l'éponge pendant 1 minute pour en extraire les microorganismes.
6. Transférer des fractions de 1 ml sur des plaques de gélose. Faire d'autres dilutions au besoin.
7. Mettre les plaques à incuber à 35° pendant 48 ± 2 heures.
8. Dénombrer les microorganismes compte tenu de la surface tamponnée, de la quantité de diluant utilisée et du volume de l'inoculum déposé sur la plaque. Par exemple, si l'on a dénombré 80 colonies à partir d'un inoculum de 1 ml provenant d'un morceau d'éponge dans 100 ml de diluant ayant servi à tamponner une surface de 1 m², le résultat sera exprimé comme suit: 8 000 unités formatrices de colonies par mètre carré.
9. Noter les résultats dans un registre.

ANNEXE 3

Contrôle des surfaces - Méthode par contact direct sur gélose (méthode RODAC)

1. Acquérir dans le commerce les plaques RODAC ou les préparer dans le laboratoire. Dans ce dernier cas, remplir des boîtes de Petri (15 x 100 mm) avec de la gélose pour dénombrement, de sorte que le ménisque de gélose dépasse le bord de la boîte.
2. Enlever le couvercle de la boîte de Petri et presser la gélose sur la surface à échantillonner. Exercer une pression circulaire sur le fond de la boîte pour garantir que le ménisque de gélose entre bien en contact avec la surface examinée.
3. Remettre le couvercle sur les boîtes et les incuber à 35° pendant 48 ± 2 heures.
4. Compter les colonies et exprimer les résultats en nombre de colonies par centimètre carré.

ANNEXE 4

Exemple de fiche de prise en charge d'un échantillon

A. Sortie et retour - magasin des échantillons

1. STORAGE LOCATION		2. NAME OF PRODUCT		3. SAMPLE NO.	
A. Freezer B	C.	Frozen Raw Shrimp		89-79-880	
B. Freezer A		D.		4. NAME AND ADDRESS OF RESPONSIBLE FIRM	
		Johnson Fish Co. Tampa, Florida		<input type="checkbox"/> CRX/DEA SPL <input type="checkbox"/> SPLIT SAMPLE	
5. DATE SAMPLE RECEIVED		6A. BY WHOM RECEIVED		6B. DIST/DIV	
1/6/89		Joseph P. Smith Joseph P. Smith		DEN-DO	
7. DATE RECORDS REC'D.		8. PERSONALLY FROM		9. SHIPPED FROM	
1/6/89					
B. MET:IOD OF SHIPMENT		A. VIA (Check one)		D. B/L NO.	
		<input type="checkbox"/> PP <input type="checkbox"/> BUS <input type="checkbox"/> FREIGHT <input checked="" type="checkbox"/> AIR		R-001,451-B	
9. DESCRIPTION OF SHIPMENT		A. SHIPPING CONTAINERS		NUMBER	
		1		TYPE	
		Dry Ice Carton		CONDITION	
		B. SAMPLE PACKAGES		NUMBER	
		2		SIZE, TYPE, ETC.	
		Cardboard Carton		CONDITION	
		C. SEAL INSCRIPTION		COPY IN FULL	
		89-79-880		1/5/89 Sidney C. Rogers	
		Intact			
10. SAMPLE DELIVERY			11. SAMPLE RETURNED		
DATE	AMOUNT	FROM	TO	DATE	AMOUNT
1/10/89	2 cartons	JPS	BSW	1/10/89	1 carton
					JPS BSW
12. SAMPLE DISPOSITION		A. DATE SDN		B. DATE DESTROYED	
				C. DESTRUCTION METHOD	
				D. AMOUNT DESTROYED	
				E. BY WHOM	
				F. REASON	

Continue on reverse; also record on reverse details for which space is lacking above

SAMPLE ACCOUNTABILITY RECORD

B. Remise directe de l'inspecteur à l'analyste, retour au magasin des échantillons

1. STORAGE LOCATION		2. NAME OF PRODUCT		3. SAMPLE NO.	
A. JPS	C.	Fresh Spinach		89-01-505	
B. Freezer B		D.		4. NAME AND ADDRESS OF RESPONSIBLE FIRM	
				Southern Vegetable and Fruit Co. Waco, Texas	
5. DATE SAMPLE RECEIVED		6A. BY WHOM RECEIVED		6B. DIST/DIV	
1/19/89		Janet A. Frances Janet A. Frances		CIN-DO	
7. DATE RECORDS REC'D.		8. PERSONALLY FROM		9. SHIPPED FROM	
1/19/89		Dorothy R. Hughes			
B. MET:IOD OF SHIPMENT		A. VIA (Check one)		D. B/L NO.	
		<input type="checkbox"/> PP <input type="checkbox"/> BUS <input type="checkbox"/> FREIGHT <input type="checkbox"/> AIR			
9. DESCRIPTION OF SHIPMENT		A. SHIPPING CONTAINERS		NUMBER	
		None		TYPE	
		B. SAMPLE PACKAGES		NUMBER	
		2		SIZE, TYPE, ETC.	
		Brown paper bag		CONDITION	
		C. SEAL INSCRIPTION		COPY IN FULL	
		89-01-505		1/18/89 Dorothy R. Hughes	
		Intact			
10. SAMPLE DELIVERY			11. SAMPLE RETURNED		
DATE	AMOUNT	FROM	TO	DATE	AMOUNT
				1/19/89	3-1qt. carton
					BSW JPS
12. SAMPLE DISPOSITION		A. DATE SDN		B. DATE DESTROYED	
				C. DESTRUCTION METHOD	
				D. AMOUNT DESTROYED	
				E. BY WHOM	
				F. REASON	

Continue on reverse; also record on reverse details for which space is lacking above

SAMPLE ACCOUNTABILITY RECORD

Exemple de bande de fermeture pour échantillon

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION Dallas 	SAMPLE NO. 89-51-103	DATE 1-12-89	SEAL BROKEN BY DATE	FDA-415a(2/83)	
	SIGNATURE Leon S. Bayer				
	PRINT NAME & TITLE (Investigator, Inspector, Analyst, etc.) Leon S. Bayer, Analyst				

- 1 Noter le numéro de l'échantillon. Le cas échéant, utiliser des abréviations comme "Doc", "ENV", etc.
- 2 Indiquer la date de fermeture du paquet (mois, jour, année) (voir ci dessous lorsque la bande est déchirée).
- 3 Signature habituelle.
- 4 Nom en caractères d'imprimerie (un tampon peut être utilisé, mais éviter les bavures).
- 5 Titre en caractères d'imprimerie.
- 6 District, province (ne pas utiliser d'abréviations ou de symboles) (un tampon peut être employé).

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION Dallas 	SAMPLE NO. 89-46-213	DATE 1-21-89	SEAL BROKEN BY R.C.H.	DATE 1/25/89	FDA-415a(2/83)	
	SIGNATURE Moses R. Walter					
	PRINT NAME & TITLE (Investigator, Inspector, Analyst, etc.) MOSES R. WALTER, Inspector					

- 7 Lorsque la bande a été déchirée pour une raison ou une autre, apposer les initiales et indiquer la date de la déchirure.

ANNEXE 6

Entreposage des échantillons de produits alimentaires

Denrée	Entreposage ^a
<u>Produits de boulangerie</u>	
Pains, petits pains	Congélation
Pains, petits crus réfrigérés ou congelés	Congélation
Pâtisseries congelées	Congélation
Tartes	Congélation
Pâte réfrigérée ou congelée	Congélation
Galettes et biscuits	Congélation
Autres produits de boulangerie	Congélation
Gâteaux fourrés de crème	Congélation
<u>Boissons</u>	
Eau	Réfrigération
Boissons non alcooliques	Réfrigération
Café instantané	Réfrigération
Café en grains	Réfrigération
Thé	Réfrigération
Thé instantané	Réfrigération

Denrée	Entreposage ^a
<u>Produits de pâtisserie</u>	
Chocolat et produits cacaotés	Temp. ambiante
Fruits confits et confiseries	Temp. ambiante
Gomme à mâcher	Temp. ambiante
Sirops et mélasses	Réfrigération
Miel	Réfrigération
Sucres liquides	Congélation
Sucres déshydratés	Congélation
<u>Produits laitiers</u>	
Beurre	Réfrigération
Dérivés du beurre	Réfrigération
Crème	Réfrigération
Fromage	Congélation
Dérivés du fromage	Congélation
Lait entier liquide	Congélation
Produits à base de lait liquide	Congélation
Laits concentrés	Congélation
Succédanés de produits laitiers	Congélation
Lait entier en poudre	Temp. ambiante
Lait écrémé en poudre	Temp. ambiante
Caséine	Temp. ambiante
Glaces à la crème	Congélation

Denrée	Entreposage ^a
Glaces au lait	Congélation
Crèmes glacées et sorbets	Congélation
Mélanges pour glaces à la crème	Congélation
Mélanges pour glaces au lait	Congélation
<u>Oeufs et dérivés</u>	
Oeufs et ovoproduits liquides et congelés	Congélation
Oeufs et ovoproduits en poudre	Temp. ambiante
Oeufs en coquille	Réfrigération
<u>Produits de la mer</u>	
Poisson congelé	Congélation
Poisson frais	Congélation
Poisson en conserve	Réfrigération
Poisson séché	Congélation
Autres produits (pâté, laitance)	Congélation
Coquillages congelés	Congélation
Coquillages frais	Congélation
Coquillages en conserve	Réfrigération
Coquillages déshydratés	Congélation
Fruits de mer (crabes, salades)	Congélation
Cuisses de grenouilles	Congélation
Poisson fumé	Congélation

Denrée	Entreposage ^a
Coquillages fumés	Congélation
Crustacés fumés	Congélation
<u>Farines et dérivés</u>	
Macaronis	Temp. ambiante
Nouilles	Temp. ambiante
Galettes salées, frites et spécialités	Temp. ambiante
Farine	Temp. ambiante
Farine de maïs	Temp. ambiante
Préparations à base de lait en poudre et d'œufs en poudre	Temp. ambiante
<u>Fruits, jus de fruits et dérivés</u>	
Fruits frais	Réfrigération
Fruits congelés	Congélation
Fruits en conserve	Réfrigération
Fruits déshydratés	Réfrigération
Jus de fruits	Réfrigération
Jus de fruits congelés	Congélation
Confitures, gelées et pâtes de fruits	Réfrigération
Pâte de figues	Réfrigération
Olives	Réfrigération

Denrée	Entreposage ^a
--------	--------------------------

Céréales et produits céréaliers

Céréales pour petit déjeuner	Temp. ambiante
Graines et haricots entiers	Réfrigération
Riz	Temp. ambiante
Flocons d'avoine	Temp. ambiante

Aliments pour enfants en bas âge

Céréales	Réfrigération
Aliments lactés déshydratés	Réfrigération
Aliments lactés liquides	Réfrigération
Aliments en conserve pour la première enfance	Réfrigération

Viande et chair de volaille

Viande et produits carnés	Congélation
Volaille et dérivés	Congélation

Sous-produits divers

Sous-produits oléagineux (farine de coton)	Réfrigération
Sous-produits animaux (farine d'os)	Réfrigération
Sous-produits de poisson (farine de poisson)	Réfrigération
Sous-produits de volaille	Réfrigération
Sous-produits de fruits et légumes	Réfrigération

Denrée	Entreposage ^a
Sous-produits laitiers	Réfrigération
Sous-produits céréaliers	Réfrigération
<u>Fruits à coque et dérivés</u>	
Fruits à coque	Réfrigération
Dérivés	Réfrigération
<u>Aliments pour animaux</u>	
Aliments secs	Réfrigération
Aliments humides	Congélation
Aliments en boîte	Réfrigération
Aliments secs pour animaux domestiques	Réfrigération
Aliments humides pour animaux domestiques	Congélation
Aliments en boîte pour animaux domestiques	Réfrigération
<u>Aliments traités et préparés</u>	
Mélanges secs pour desserts	Temp. ambiante
Mélanges secs pour gâteaux	Temp. ambiante
Plats congelés	Congélation
Plats en boîte	Réfrigération
Salades préparées	Congélation
Potages en boîte	Réfrigération
Plats déshydratés	Réfrigération

Denrée	Entreposage ^a
Gélatine (déshydratée)	Temp. ambiante
Levure (déshydratée)	Temp. ambiante
<u>Epices, aromatisants et condiments</u>	
Epices intégrales	Temp. ambiante
Epices moulues	Temp. ambiante
Mélanges d'épices	Temp. ambiante
Extraits et arômes	Réfrigération
Huiles essentielles	Réfrigération
Matières premières pour extraits	Réfrigération
Sauces pour salades	Réfrigération
Mélanges déshydratés de sauces pour salades	Réfrigération
Autres condiments	Réfrigération
<u>Légumes et dérivés</u>	
Légumes frais	Congélation
Légumes congelés	Congélation
Légumes en conserve	Réfrigération
Légumes déshydratés	Temp. ambiante
Légumes en saumure	Réfrigération
Huiles végétales	Réfrigération

^aTempératures d'entreposage: température ambiante (21-23°); réfrigération (4°); congélation (-20°).

Étalonnage d'un thermomètre à immersion partielle

1. Avec une feuille de matière plastique souple, couvrir un bac mesurant environ 13 x 23 x 46 cm. Fixer la feuille avec un ruban adhésif afin que l'étanchéité soit aussi grande que possible.
2. Ménager une ouverture refermable pour introduire et retirer le thermomètre de référence étalonné par un organisme de normalisation approprié.
3. Verser 4 litres d'eau distillée dans le bac.
4. Placer le thermomètre de référence dans le bac, soutenu de manière à ne pas se trouver en contact avec ses parois.
5. Boucher convenablement l'ouverture pour empêcher l'évaporation de l'eau.
6. Mettre le bulbe du thermomètre à étalonner aussi près que possible du bulbe du thermomètre de référence.
7. Sceller le bac et le placer dans une étuve réglée plus ou moins à la température à laquelle le thermomètre sera utilisé.
8. Laisser les thermomètres s'équilibrer pendant au moins 3 heures.
9. Retirer le thermomètre à étalonner et noter sa température à l'aide d'une loupe. Relever la température à un dixième de degré près.
10. Retirer de l'étuve le bac contenant le thermomètre de référence.
11. Aussi rapidement que possible, extraire le thermomètre de référence et noter la température qu'il indique à l'aide d'une loupe. Appliquer le facteur de correction du thermomètre de référence pour obtenir la température exacte.
12. Calculer le facteur de correction (chiffre à ajouter à la lecture du thermomètre à étalonner, ou à soustraire à cette lecture pour obtenir la température correcte ou exacte).
13. Inscire ce facteur de correction et le numéro du thermomètre sur un ruban adhésif qui sera collé sur le thermomètre à immersion partielle qui vient d'être étalonné. Consigner ces données d'étalonnage dans le registre des températures.

Etalonnage d'un microscope

1. Placer un micromètre oculaire - trame de 1 mm avec linéature de 10 micromètres - dans un des oculaires du microscope (grossissement 10 x).
2. Placer un micromètre - trame de 2 mm avec linéature de 10 micromètres - sur la platine du microscope.
3. Avec l'objectif le plus faible du microscope, focaliser le micromètre de l'oculaire sur celui de la platine.
4. Aligner les deux trames de manière que les lignes de gauche se superposent.
5. Compter le nombre de lignes du micromètre de la platine recouvertes par 100 lignes du micromètre de l'oculaire.
6. Avec un grossissement de 10 x, si les 100 lignes du micromètre de l'oculaire recouvrent 60 lignes (600 micromètres) du micromètre de la platine, la distance entre chaque ligne du micromètre de l'oculaire est de 6 micromètres.
7. Avec un grossissement de 40 x, si les 100 lignes du micromètre de l'oculaire recouvrent 15 lignes (150 micromètres) du micromètre de la platine, la distance entre chaque ligne du micromètre de l'oculaire est de 1,5 micromètre.
8. Avec un grossissement de 100 x, si les 100 lignes du micromètre de l'oculaire recouvrent 6,5 lignes (65 micromètres) du micromètre de la platine, la distance entre chaque ligne du micromètre de l'oculaire est de 0,65 micromètre.
9. Si un spécimen microbiologique observé sous un grossissement de 100 x présente une longueur de 4 lignes du micromètre de l'oculaire et une largeur de 2,5 lignes, sa longueur et sa largeur sont égales à 2,6 et 1,63 micromètres respectivement.

**Détermination du pouvoir bactéricide
des lampes à rayons ultraviolets**

1. Verser de la gélose pour dénombrement (20 ml) dans des boîtes de Petri de 15 x 100 mm.
2. Préparer une série de dilutions au dixième d'une culture d'Enterobacter aerogenes de manière que 0,5 ml d'inoculum donne 200-250 colonies par boîte.
3. Pour chaque dilution, déposer avec une pipette un volume de 0,5 ml sur la surface de quatre boîtes de Petri.
4. Avec une baguette de verre stérile, étaler l'inoculum uniformément sur toute la surface de la gélose.
5. Répéter cette opération sur les autres boîtes. Utiliser une baguette de verre différente pour chaque dilution.
6. Pour chaque dilution, ôter le couvercle des quatre boîtes de Petri. Exposer deux boîtes à la lampe à rayons ultraviolets pendant 2 minutes aux endroits que l'on désire stériliser. En outre, exposer deux boîtes à la lumière ordinaire pendant 2 minutes.
7. Recouvrir les boîtes et les incuber à 35° pendant 24-48 heures.
8. Retirer les boîtes de l'étuve et dénombrer les colonies. Les boîtes exposées à la lumière du laboratoire devraient contenir 200-250 colonies. Les boîtes ayant reçu un inoculum de dilution identique et exposées aux rayons ultraviolets devraient présenter un nombre de colonies inférieur de 99 %. Si la réduction est de moins de 80 %, la lampe doit être remplacée. Inscrire les résultats dans un registre.

**Détermination des résidus de substances
bactériostatiques/bactéricides à la surface
de la verrerie de laboratoire**

1. Laver six boîtes de Petri selon la procédure habituelle - il s'agira du groupe A.
2. Laver de la même manière six autres boîtes de Petri et les rincer 12 fois avec de l'eau distillée - il s'agira du groupe B.
3. Laver de la même manière six autres boîtes de Petri et les sécher sans les rincer - il s'agira du groupe C.
4. Stériliser les boîtes des groupes A, B et C selon la procédure normale.
5. Si l'on souhaite tester des boîtes de Petri en matière plastique préstérilisées, prendre six boîtes qui constitueront le groupe D.
6. Dans chaque boîte, verser 1 ml d'une culture pure d'Enterobacter aerogenes qui donnera 50-150 colonies par boîte.
7. Dans chaque boîte, ajouter 20 ml de gélose et mélanger soigneusement avec l'inoculum.
8. Après solidification, incuber les boîtes à 35° pendant 48 ± 2 heures, puis dénombrer les colonies.
9. Interpréter les résultats comme suit:
 - a. Une différence inférieure à 15 % entre les numérations des boîtes des groupes A, B, C et D indique qu'il n'y a pas de résidu de détergent à propriété bactériostatique ou bactéricide ou que les boîtes préstérilisées sont acceptables.
 - b. Une différence supérieure à 15 % entre les groupes A et B ou D et B indique la présence d'un résidu de détergent inhibiteur.
 - c. Une différence inférieure à 15 % entre les groupes A et B et supérieure à 15 % entre les groupes A et C indique que le détergent a des propriétés inhibitrices qui disparaissent au cours du lavage.

Détermination de la qualité de l'eau servant à préparer les milieux et réactifs microbiologiques

Principe

Cette procédure se fonde sur la prolifération d'une culture de 24 heures d'Enterobacter aerogenes dans un milieu chimiquement défini de croissance minimale. Si la prolifération de cette culture est inférieure ou supérieure à 20 % au moins de celle d'une culture témoin, la conclusion est que l'eau contient un agent stimulateur ou inhibiteur.

Verrerie

Il faudrait utiliser uniquement de la verrerie de borosilicate soigneusement rincée avec de l'eau distillée avant stérilisation à la chaleur sèche.

Réactifs

Il faut utiliser des produits chimiques du plus haut degré de pureté. Les réactifs sont préparés avec de l'eau fraîchement distillée dans un alambic de verre. Les réactifs nécessaires sont les suivants:

- a) Solution de citrate de sodium. Dissoudre 0,29 g de citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans 500 ml d'eau.
- b) Solution de sulfate d'ammonium. Dissoudre 0,60 g de sulfate d'ammonium [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] dans 500 ml d'eau.
- c) Solution d'un mélange de sels. Dissoudre 0,26 g de sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,17 g de chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,23 g de sulfate ferreux ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et 2,50 g de chlorure de sodium (NaCl) dans 500 ml d'eau.
- d) Solution mère de tampon phosphaté. Dissoudre 34,0 g de phosphate dihydropotassique (KH_2PO_4) dans 500 ml d'eau distillée, ajuster le pH à $7,2 \pm 0,5$ avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) 1 N et porter le volume de la solution à 1 litre avec de l'eau distillée.
- e) Solution tampon phosphatée. Diluer à 1:25 la solution mère de tampon phosphaté avec de l'eau distillée.

Faire bouillir les solutions mères pendant 1 à 2 minutes pour détruire les cellules bactériennes végétatives; les conserver dans des flacons stériles bouchés à l'émeri à 5° dans l'obscurité pendant 3 mois au maximum. Avant d'utiliser

ces solutions entreposées, il convient d'en vérifier la stérilité. La solution de mélange de sels devient trouble au bout de 3 à 5 jours car le sel ferreux se transforme en sel ferrique. Si l'on envisage un entreposage de longue durée, préparer la solution de mélange de sels sans le sulfate ferreux; juste avant l'emploi ajouter la quantité voulue de sulfate ferreux pour compléter la composition de la solution. Ne jamais utiliser une solution trouble.

Echantillons

Verser environ 200 ml d'eau de qualité inconnue et 200 ml d'eau témoin dans des flacons de verre de borosilicate et faire bouillir pendant seulement 1-2 minutes pour éviter toute modification chimique de l'eau. Redistiller l'eau témoin de manière qu'elle réponde aux spécifications suivantes: conductivité supérieure à 0,5 mégaohms de résistance ou inférieure à 2 micromhos/cm à 25°, pH 5,5-7,5, carbone organique total inférieur à 1,0 mg/litre, métaux lourds individuels (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) inférieurs à 0,5 mg/litre, métaux lourds totaux inférieurs ou égaux à 1,0 mg/litre, azote ammoniacal/organique inférieur à 0,1 mg/litre, chlore résiduel total inférieur au seuil de détection et dénombrement des organismes hétérotrophes inférieur à 1 000 colonies/ml.

Préparation des constituants des fioles

Préparer cinq fioles contenant les constituants indiqués au tableau 1.

Préparation de l'inoculum d'E. aerogenes

Un jour avant de commencer le test d'identité, inoculer une souche d'E. aerogenes sur la gélose nutritive ayant une inclinaison d'environ 6,3 cm et contenue dans un tube de 16 x 125 mm à bouchon fileté. Etaler l'inoculum uniformément sur toute la surface et incubé à 35° pendant 18-24 heures. Avec une pipette, introduire dans la culture 1-2 ml d'eau stérile prélevée 99 ml d'eau témoin et émulsifier doucement avec la pipette. Au moyen d'une pipette, remettre la suspension dans les 99 ml d'eau témoin. Procéder à une dilution 1:100 du flacon original dans un second flacon d'eau témoin, à une autre dilution 1:100 du second flacon dans un troisième, puis à une autre dilutions 1:10 dans un quatrième flacon d'eau témoin. Cette procédure devrait permettre d'obtenir une suspension contenant 30-80 cellules viables par ml. Pipeter 1,0 ml de la quatrième dilution (1:10⁵) dans chacune des fioles comme indiqué au tableau 1.

Vérifier la densité cellulaire avec une série de numérations sur plaques au moyen de la troisième dilution. Prendre une quantité appropriée de celle-ci qui, une fois diluée avec les 30 ml des fioles A, B, C, D et E, contiendra 30-80 cellules viables par ml.

Calculs

Pour déterminer la présence d'une substance inhibant la croissance des organismes, on utilise le coefficient ci-après:

$$\text{Coefficient} = \frac{\text{nombre de colonies/ml, fiole B}}{\text{nombre de colonies/ml, fiole A}}$$

Un coefficient de 0,8-1,2 indique l'absence de substances inhibitrices dans l'eau. Un coefficient inférieur à 0,8 indique la présence de telles substances, alors qu'un coefficient supérieur à 1,2 indique la présence dans l'eau de sources stimulant la croissance des microorganismes.

Pour déterminer la présence de substances azotées et carbonées favorisant le développement des organismes, on utilise le coefficient ci-après:

$$\text{Coefficient} = \frac{\text{nombre de colonies/ml, fiole C}}{\text{nombre de colonies/ml, fiole A}}$$

Pour déterminer la présence de substances azotées favorables à la croissance des organismes, on utilise le coefficient ci-après:

$$\text{Coefficient} = \frac{\text{nombre de colonies/ml, fiole D}}{\text{nombre de colonies/ml, fiole A}}$$

Pour déterminer la présence de substances carbonées facilitant la prolifération des organismes, on utilise le coefficient ci-après:

$$\text{Coefficient} = \frac{\text{nombre de colonies/ml, fiole E}}{\text{nombre de colonies/ml, fiole A}}$$

Interprétation des résultats

Quand le rapport entre les nombres de colonies dans les fioles B/A dépasse 1,2, on peut supposer qu'il se trouve des substances stimulatrices. Cette procédure est toutefois très délicate et, dans la pratique, des coefficients allant jusqu'à 3,0 revêtent peu d'importance. Ainsi, dans le cas de coefficients compris entre 1,2 et 3,0, les tests C, D et E (tableau 1) ne sont pas effectués.

Lorsque le rapport entre les nombres de colonies dans les fioles B/A est inférieur à 0,8, on peut présumer que l'eau contient des substances toxiques. Ce test comporte toutes les tolérances admissibles, et des mesures correctives doivent être prises sur le champ quand le coefficient est inférieur à 0,8. Ces mesures comprennent l'inspection de l'équipement de distillation et un contrôle minutieux de la production et de la manutention de l'eau distillée.

Tableau 1. Constituants des fioles pour le test d'idonéité de l'eau*

Constituant	Test de contrôle (ml)		Tests facultatifs (ml)		
	Témoin A	Eau distillée inconnue B	Aliment disponible C	Source d'azote D	Source de carbone E
Solution de citrate de sodium	2,5	2,5	-	2,5	-
Solution de sulfate d'ammonium	2,5	2,5	-	-	2,5
Solution de mélange de sels	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Tampon phosphaté (pH 7,3 ± 0,1)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Echantillon d'eau inconnue	-	21,0	21,0	21,0	21,0
Eau redistillée témoin	21,0	-	5,0	2,5	2,5
Volume total par fiole	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0

* Extrait de la référence 3, Geldreich, E.E., and H.F. Clark, 1965. J. Milk Food Technol. 28:351-355. Avec l'autorisation de l'éditeur.

Conservation des cultures-mères microbiologiques

Bacillus cereus

A. Brève durée

1. Inoculer un tube de gélose incliné et incubé à 30-35° pendant 24 ± 2 heures.
2. Maintenir à température ambiante (21-23°) pendant 1-2 jours pour que la sporulation soit complète.
3. Réfrigérer le bouillon de culture à 4°.
4. Faire des sous-cultures tous les 6 mois.

B. Longue durée

1. Inoculer un tube de gélose incliné et incubé à 30-35° pendant 24 ± 2 heures.
2. Maintenir à température ambiante (21-23°) pendant 1-2 jours pour que la sporulation soit complète.
3. Mettre en suspension avec de l'eau distillée les organismes qui se sont développés sur la gélose et mélanger 1:1 avec une solution salée de glycérine à 20 %. Pour préparer cette solution, dissoudre 4,2 g de NaCl et porter le volume à 800 ml avec de l'eau distillée. Ajouter 12,4 g de K₂HPO₄ (anhydre), 4,0 g de KH₂PO₄ (anhydre) et 200 ml de glycérine (qualité analytique). Ajuster le pH à 7,2 et passer à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°.
4. Congeler immédiatement des quantités de 3 ml du mélange 1:1 dans du CO₂ solide ou dans un congélateur à température ultra-basse et conserver à une température comprise entre -55 et -90°.
5. Faire des sous-cultures tous les 2 ans.

Campylobacter jejuni

Pour toutes les incubations, il faut utiliser une atmosphère modifiée: 85 % de N₂, 10 % de CO₂ et 5 % de O₂.

A. Brève durée

1. Inoculer un tube contenant 10 ml d'un bouillon d'acides casaminés, d'extrait de levure et de sels. Pour préparer ce bouillon, dissoudre les ingrédients suivants dans 1 litre d'eau distillée: 20 g d'acides casaminés, 6 g d'extrait de levure, 2,5 g de NaCl et 8,71 g de K₂HPO₄ (anhydre). Ajuster le pH de sorte qu'après le passage à l'autoclave, sa valeur atteigne 8,5 ± 0,2. Autoclaver pendant 15 minutes à 121°.
2. Incuber le milieu inoculé pendant 48 ± 2 heures à 41-44°.

3. Etaler la culture sur de la gélose au chocolat ou de la gélose au sang dans des tubes inclinés et incuber à 41-44° pendant 48 ± 2 heures.
4. Faire des sous-cultures chaque semaine.

B. Longue durée

1. Inoculer un tube contenant 10 ml d'un bouillon d'acides casaminés, d'extrait de levure et de sels, et incuber à 41-44° pendant 48 ± 2 heures.
2. A la culture, ajouter du glycérol jusqu'à une concentration finale de 10-20 %.
3. Congeler des portions de 2-3 ml à -70° ou moins.
4. Faire des sous-cultures tous les 6 mois.

Clostridium botulinum

A. Brève durée

1. Inoculer un bouillon de viande cuite désaéré ou un bouillon à base de trypticase-peptone-glucose-extrait de levure avec de la trypsine (TPGYT) et incuber à 26 ou 35° selon le type de souche utilisée. Le bouillon de viande cuite, incubé à 35°, est préférable pour les souches protéolytiques des types A, B, F et G. Le TPGYT, incubé à 26°, est préférable pour les types non protéolytiques B, E et F.

Pour préparer le bouillon de viande cuite, ajouter 12,5 g de milieu commercial à 100 ml d'eau distillée froide. Mélanger et laisser reposer 15 minutes pour que les particules s'imbibent bien. Autre procédé: distribuer 1,25 g de milieu commercial dans des tubes de 20 x 150 mm, ajouter 10 ml d'eau distillée froide et mélanger soigneusement pour que toutes les particules s'imbibent. Passer à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°. La valeur du pH final devrait être de 7,2 ± 0,2.

Le TPGYT ne se trouve pas dans le commerce et doit être préparé extemporanément. Pour faire la base, dissoudre les ingrédients suivants dans 1 litre d'eau distillée: 50 g de trypticase, 5 g de peptone, 20 g d'extrait de levure, 4 g de glucose et 1 g de thioglycolate de sodium. Répartir des portions de 15 ml dans des tubes de 20 x 150 mm et les autoclaver pendant 10 minutes à 121°. La valeur du pH final devrait être de 7,0 ± 0,2. Réfrigérer les milieux stérilisés et ajouter la trypsine immédiatement avant leur utilisation.

Pour préparer la solution de trypsine, ajouter 1,5 g de trypsine (1:250, Difco) à 100 ml d'eau distillée. Agiter le mélange pour obtenir une suspension. Laisser les particules décanter et filtrer/stériliser le liquide surnageant à travers une membrane de 0,45 micromètre.

Avant l'emploi, faire bouillir ou traiter à la vapeur la préparation de base pendant 10 minutes pour éliminer l'oxygène dissous. Ajouter 1 ml de solution de trypsine à chaque portion de 15 ml de base.

2. Incuber les milieux inoculés pendant 5 jours ou plus aux températures indiquées.
3. Conserver à 4° pendant 6 mois au maximum.

B. Longue durée

1. Cultiver la souche dans le bouillon comme indiqué plus haut.
2. Centrifuger une portion de la culture TPGYT dans des tubes stériles pour faire sédimenter les spores.
3. Laver à deux reprises la suspension de spores avec 10-20 ml d'eau distillée stérile.
4. Remettre en suspension les spores lavées dans de l'eau distillée stérile et conserver à 4°.
5. La suspension de spores devrait demeurer stable pendant 10-20 ans.

Clostridium perfringens

A. Brève durée

1. Inoculer un tube contenant 10 ml de bouillon liquide au thioglycolate fraîchement désaéré et incuber en aérobie à 35-37° pendant 18-20 heures.
2. Faire une sous-culture du bouillon désaéré de viande cuite et incuber en aérobie à 35-37° pendant 24 ± 2 heures.
3. Maintenir à température ambiante (21-23°) pendant 1-2 jours pour que la sporulation soit complète.
4. Réfrigérer le bouillon de culture à 4°.
5. Faire des sous-cultures tous les 30 jours.

B. Longue durée

1. Inoculer un tube contenant du bouillon (tamponné) à base de trypticase-peptone-glucose-extrait de levure. Pour préparer ce milieu, dissoudre les ingrédients ci-après dans 1 litre d'eau distillée: 50,0 g de trypticase, 5,0 g de peptone, 20,0 g d'extrait de levure, 4,0 g de glucose, 5,0 g de Na₂HPO₄ et 1,0 g de thioglycolate de sodium. Ajuster le milieu à pH 7,3 ± 0,2; verser des portions de 15 ml dans des tubes de 20 x 150 mm et passer à l'autoclave pendant 8 minutes à 121°. Conserver le milieu autoclavé sous réfrigération jusqu'au moment de son utilisation.
2. Incuber le milieu inoculé pendant 18 heures à 35-37°.
3. Ajouter 1 portion de bouillon de culture à 1 portion de lait écrémé stérile et lyophiliser des portions de 1-2 ml. Ou bien ajouter 1 portion de bouillon de culture à 1 portion de solution salée de glycérine à 10 %. Pour préparer cette solution, dissoudre 4,2 g de NaCl et porter le volume à 900 ml avec de l'eau distillée. Ajouter 12,2 g de K₂HPO₄ (anhydre), 4,0 g de KH₂PO₄ (anhydre) et 100 ml de glycérine (qualité analytique). Ajuster le pH à 7,2 ± 0,2 et passer à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°.

4. Congeler des portions de 1-3 ml du mélange 1:1 de bouillon de culture et de solution salée de glycérine avec du CO₂ solide et un congélateur à ultra-basse température. Conserver à une température comprise entre -55 et -90°.
5. Faire des sous-cultures tous les 2 ans.

Escherichia coli

A. Brève durée

1. Inoculer une gélose inclinée (infusion de cervelle et de coeur) et incubé à 35° pendant 2 heures.
2. Réfrigérer la culture à 4°.
3. Faire chaque mois des sous-cultures.

B. Longue durée

1. Inoculer une gélose inclinée (infusion de cervelle et coeur) et incubé à 35° pendant 24 ± 2 heures.
2. Faire une sous-culture dans un tube contenant 10 ml d'infusion de cervelle et coeur.
3. Incuber à 35° pendant 24 ± 2 heures.
4. Centrifuger la suspension cellulaire et laver les cellules à deux reprises avec 10 ml de tampon phosphaté de Butterfield.
5. Mettre les cellules lavées en suspension dans 10 ml de tampon phosphaté de Butterfield.
6. A 1 portion de suspension de cellules lavées, ajouter 1 portion de lait écrémé en poudre reconstitué (double concentration) que l'on prépare en dissolvant 200 g de lait écrémé en poudre dans 1 litre d'eau distillée, le tout passant à l'autoclave à 121° pendant 15 minutes.
7. Surgeler et lyophiliser des portions de 1-2 ml de ce mélange 1:1.
8. La culture est stable pendant 4-5 ans à la température ambiante (21-23°).

Listeria monocytogenes

A. Brève durée

1. Inoculer un tube contenant 10 ml de bouillon trypticase-soja avec 0,6 % d'extrait de levure ou 10 ml de bouillon phosphaté et tryptosé.
2. Incuber à 30-35° pendant 48 ± 2 heures.
3. Faire des sous-cultures sur gélose inclinée (trypticase-soja) avec 0,6 % d'extrait de levure ou sur gélose nutritive inclinée.
4. Incuber à 30-35° pendant 48 ± 2 heures.
5. Réfrigérer les cultures à 4°.
6. Faire chaque mois des sous-cultures.

B. Longue durée

1. Inoculer un tube contenant 10 ml de bouillon trypticase-soja avec 0,6 % d'extrait de levure ou 10 ml de bouillon phosphaté tryptosé.
2. Incuber à 30-35° pendant 48 ± 2 heures.
3. A la culture, ajouter du glycérol (concentration finale 10 %).
4. Congeler à -70° ou moins des portions de 2-3 ml.
5. Faire des sous-cultures tous les 6 mois.

Salmonella

A. Brève durée

1. Inoculer de la gélose inclinée (infusion de cervelle et coeur) et incuber à 35° pendant 24 ± 2 heures.
2. Maintenir la culture à température ambiante (21-23°) à l'obscurité.
3. Faire des sous-cultures tous les 15 jours.

B. Longue durée

La lyophilisation n'est pas recommandée pour la conservation à long terme des cultures de salmonelles car les antigènes flagellaires et somatiques peuvent s'altérer.

1. Inoculer une gélose au sang inclinée pour obtenir une prolifération sur la plus grande partie de la surface et incuber à 35° pendant 24 ± 2 heures.
2. Prélever les organismes avec une anse stérile.
3. Inoculer la culture dans un tube contenant de la gélose semi-solide à base de trypticase (sans rouge de phénol). Pour préparer ce milieu, dissoudre 20,0 g de trypticase et 3,5 g de gélose dans 1 litre d'eau. Introduire 1-2 ml dans des tubes de 10 x 75 mm qui seront bouchés avec une feuille d'aluminium. Stériliser les tubes à 116-118° (sous une pression non supérieure à 12 livres) pendant 15 minutes. Après refroidissement, boucher aseptiquement les tubes avec des bouchons de liège macérés pendant 5 minutes dans de la paraffine bouillante.
4. Incuber les tubes inoculés pendant 24 ± 2 heures à 35°.
5. Conserver les cultures à température ambiante (21-23°) à l'obscurité.
6. Faire des sous-cultures tous les 3 ans.

Shigella

A. Brève durée

Comme pour E. coli.

B. Longue durée

Comme pour E. coli.

Staphylococcus aureus

A. Brève durée

1. Inoculer un tube de 10 ml de bouillon trypticase-soja et incuber à 35° pendant 24 ± 2 heures.
2. Etaler la culture sur une gélose inclinée de trypticase-soja et incuber à 35° pendant 24 ± 2 heures.
3. Conserver à température ambiante (21-23°).
4. Faire des sous-cultures chaque semaine.

B. Longue durée

1. Inoculer un tube de 10 ml de bouillon trypticase-soja et incuber à 35° pendant 24 ± 2 heures.
2. Ajouter du glycérol (concentration finale 20 %) et congeler des portions de 2-3 ml à -80°. Autre formule: ajouter suffisamment d'huile minérale stérile pour recouvrir la culture sur gélose inclinée de trypticase-soja.
3. Avec les deux types de conservation de longue durée, faire chaque année des sous-cultures.
4. Autre méthode: ajouter 2 ml de culture de 6-12 heures sur bouillon de trypticase-soja à 2 ml de glycérol stérile à 80 % dans un cryotube et congeler immédiatement à -70°. Faire des sous-cultures tous les 6 mois.

Vibrio cholerae

A. Brève durée

1. Inoculer un tube de milieu T₁N₁ par grattage profond du milieu. Préparation du milieu: dissoudre les ingrédients ci-après dans 1 litre d'eau distillée: 10 g de trypticase, 10 g de NaCl et 20 g de gélose. Répartir des portions de 4 ml dans des tubes à bouchon fileté de 13 x 100 mm. Passer à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°. Il n'est pas nécessaire d'ajuster le pH.
2. Dévisser légèrement les bouchons et incuber les tubes inoculés à 35° pendant 24 ± 2 heures.
3. Revisser les bouchons et conserver à 4°.
4. Faire des sous-cultures chaque semaine.

B. Longue durée

1. Inoculer un tube de 10 ml de bouillon T₁N₁ et incuber à 35° pendant 6-12 heures.
2. Ajouter 2 ml de culture de 6-12 heures sur bouillon T₁N₁ à 2 ml de glycérol stérile à 80 % dans un cryotube et congeler immédiatement à -70°.
3. Faire des sous-cultures tous les 6 mois.

Vibrio parahaemolyticus

A. Brève durée

1. Inoculer un tube de milieu de conservation par grattage profond du milieu semi-solide. Préparation du milieu: dissoudre les ingrédients ci-après dans 1 litre d'eau distillée: 3 g d'extrait de levure, 10 g de peptone, 30 g de NaCl et 3 g de gélose. Répartir des portions de 4 ml dans des tubes à bouchon fileté de 13 x 100 mm. Passer à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°. Il n'est pas nécessaire d'ajuster le pH.
2. Dévisser légèrement les bouchons et incuber les tubes inoculés à 35° pendant 24 ± 2 heures.
3. Revisser les bouchons et conserver uniquement à température ambiante (21-23°). Ne pas réfrigérer.
4. Faire des sous-cultures chaque semaine.

B. Longue durée

1. Inoculer un tube de 10 ml de bouillon trypticase-soja avec 3 % de NaCl (concentration finale) et incuber à 35° pendant 6-12 heures.
2. Mélanger 0,09 ml de sulfoxyde diméthylque stérile avec 1 ml de la culture dans des cryotubes stériles et congeler immédiatement à -70°.
3. Faire des sous-cultures tous les 6 mois.

Vibrio vulnificus

A. Brève durée

Comme pour V. parahaemolyticus.

Levures et moisissures

A. Brève durée

Avant de faire les sous-cultures, observer les cultures à l'oeil nu pour déceler la présence éventuelle de contamination par d'autres levures et moisissures. Utiliser un microscope de dissection pour déterminer la présence d'acariens.

1. Faire un étalement sur une plaque de 30 ml de gélose au dextrose de pomme de terre additionnée d'acide tartrique ou d'antibiotiques, comme indiqué ci-dessous. Les antibiotiques sont préférables à l'acide tartrique car les solutions mères sont d'une préparation relativement facile et n'ont pas un pH faible qui inhiberait certaines espèces de levures et de moisissures.

Utiliser une solution à 10 % d'acide tartrique pour ajuster le pH de la gélose à $3,5 \pm 0,1$. Stériliser la solution par filtration sur une membrane de 0,45 micromètre. Titrer pour déterminer la quantité de solution nécessaire pour ajuster le pH à 3,5. Après avoir ajouter la solution au milieu, vérifier la valeur du pH en faisant solidifier une portion du milieu et en contrôlant avec un pH-mètre.

L'antibiotique préféré est la chlortétracycline-HCl à la concentration de 40 ppm. On peut utiliser d'autres antibiotiques, comme le chloranphénicol ou la streptomycine, mais toujours à la même concentration de 40 ppm et en plus de la chlortétracycline-HCl. Préparation de la solution mère d'antibiotique: dissoudre 1 g d'antibiotique dans 100 ml d'eau distillée stérile et filtrer sur une membrane de 0,45 micromètre. Conserver les solutions mères à l'obscurité à 4-8°. Leur conservabilité ne dépasse pas 1 mois. Porter les solutions mères à la température ambiante (21-23°) immédiatement avant leur emploi. Si le milieu gélosé est réparti en portions de 250 ml, ajouter 1 ml de la solution mère (100 ml) pour obtenir une concentration de 40 ppm. Avec d'autres quantités de gélose au dextrose de pomme de terre, ajouter le volume approprié de la solution d'antibiotique.

2. Incuber la plaque de gélose à 22-25° jusqu'à l'apparition de colonies de 3-5 cm (environ 1 semaine pour les moisissures et 2 semaines pour les levures).
3. Prélever une colonie bien isolée sur la gélose inclinée au dextrose de pomme de terre additionnée d'acide tartrique ou d'un antibiotique (voir plus haut).
4. Incuber les tubes à 22-25° pendant 1 (moisissures) ou 2 (levures) semaines.
5. Réfrigérer les cultures à 4°.
6. Faire des sous-cultures tous les 2 mois.

B. Longue durée

1. Inoculer une gélose inclinée de dextrose de pomme de terre additionnée d'acide tartrique ou d'antibiotiques (voir plus haut).
2. Incuber les tubes à 22-25° pendant 1 (moisissures) ou 2 (levures) semaines.
3. Recouvrir la culture sur gélose inclinée avec de l'huile minérale stérile ou du glycérol.
4. Conserver à 4°.
5. Faire des sous-cultures tous les 6 mois.
6. Autre méthode: submerger la culture en prolifération sur la gélose inclinée avec de l'eau distillée stérile. Agiter pour que les spores/cellules viennent en suspension.
7. Transférer 1 ml de suspension dans un tube à essai contenant 5 g de boue argilleuse (autoclavée pendant 1 heure à 121°).
8. Conserver à 4°.
9. Faire des sous-cultures une fois par an.

Yersinia enterocolitica

Les plasmides servant à la détermination de la pathogénicité peuvent être détruits si les cultures sont incubées au-dessus de 30° ou si les sous-cultures sont trop fréquentes.

A. Brève durée

1. Inoculer un tube contenant 10 ml d'infusion de veau ou d'infusion de cervelle et coeur, et incuber à 26° pendant 48 ± 2 heures.
2. Etaler la culture sur de la gélose inclinée de trypticase-soja et incuber à 26° pendant 48 ± 2 heures.
3. Conserver à température ambiante à l'obscurité.
4. Faire des sous-cultures chaque mois.

B. Longue durée

1. Inoculer un tube contenant 10 ml d'infusion de veau ou d'infusion de cervelle et coeur, et incuber à 26° pendant 48 ± 2 heures.
2. Ajouter du glycérol (concentration finale 10-20 %).
3. Congeler des portions de 2-3 ml à -70° ou moins.
4. Faire des sous-cultures tous les 4-6 mois.

Exemple de certificat sanitaire vétérinaire

CERTIFICAT SANITAIRE VETERINAIRE

Transport:

Date: _____ Vendeur _____ Bon d'achat No. _____

Réception:

Date: _____ Heure _____ Pièce No. _____

Réceptionnaire _____

Description:

Espèce _____ Souche _____ Nombre _____

Poids _____ Sexe _____

Etat des animaux: _____

Quarantaine:

Date d'entrée _____ Date de sortie _____ Pièce No. _____

Observations _____

Test(s) diagnostique(s) réalisé(s): _____

Elimination: _____

Directeur de l'étude: _____ Projet No. _____

Vétérinaire officiel

Date _____

ANNEXE 14

Procédure d'immobilisation des souris pour pratiquer une injection intrapéritonéale

1. Remplir la seringue avec la quantité appropriée d'inoculum à injecter. La mettre de côté.
2. Saisir la souris près de la racine de la queue. Ne pas tenir trop longtemps la souris par la queue, car cela provoquerait chez elle une situation de stress.
3. Retirer la souris de sa cage et la poser sur une surface dure.
4. Tout en continuant de tenir la souris par la racine de la queue, avec l'autre main la saisir par la peau de la nuque.
5. Avec la même main qui tient la souris par la nuque, placer la queue de l'animal entre les doigts de l'analyste pour immobiliser et contrôler la souris.
6. Une main immobilisant complètement l'animal, utiliser l'autre main pour frotter la zone à injecter avec de l'éthanol à 70 %.
7. Introduire l'aiguille dans le quadrant inférieur gauche ou droit de l'abdomen selon un angle de 30°. Il n'y a pas d'organes vitaux dans ce secteur.
8. Procéder à une aspiration légère avec la seringue pour s'assurer que l'aiguille se trouve à l'endroit juste. Tout signe de sang ou de liquide indique que l'aiguille est mal placée; dans ce cas, la retirer puis l'introduire à nouveau.
9. Injecter l'inoculum de façon régulière et continue.
10. Une fois l'injection faite, placer rapidement la seringue et l'aiguille dans un bac non perforable, autoclaver et jeter.
11. Après l'injection, tamponner le site de l'inoculation avec de l'éthanol à 70 %.

Méthodes de sacrifice euthanasique des souris

A. Dislocation cervicale

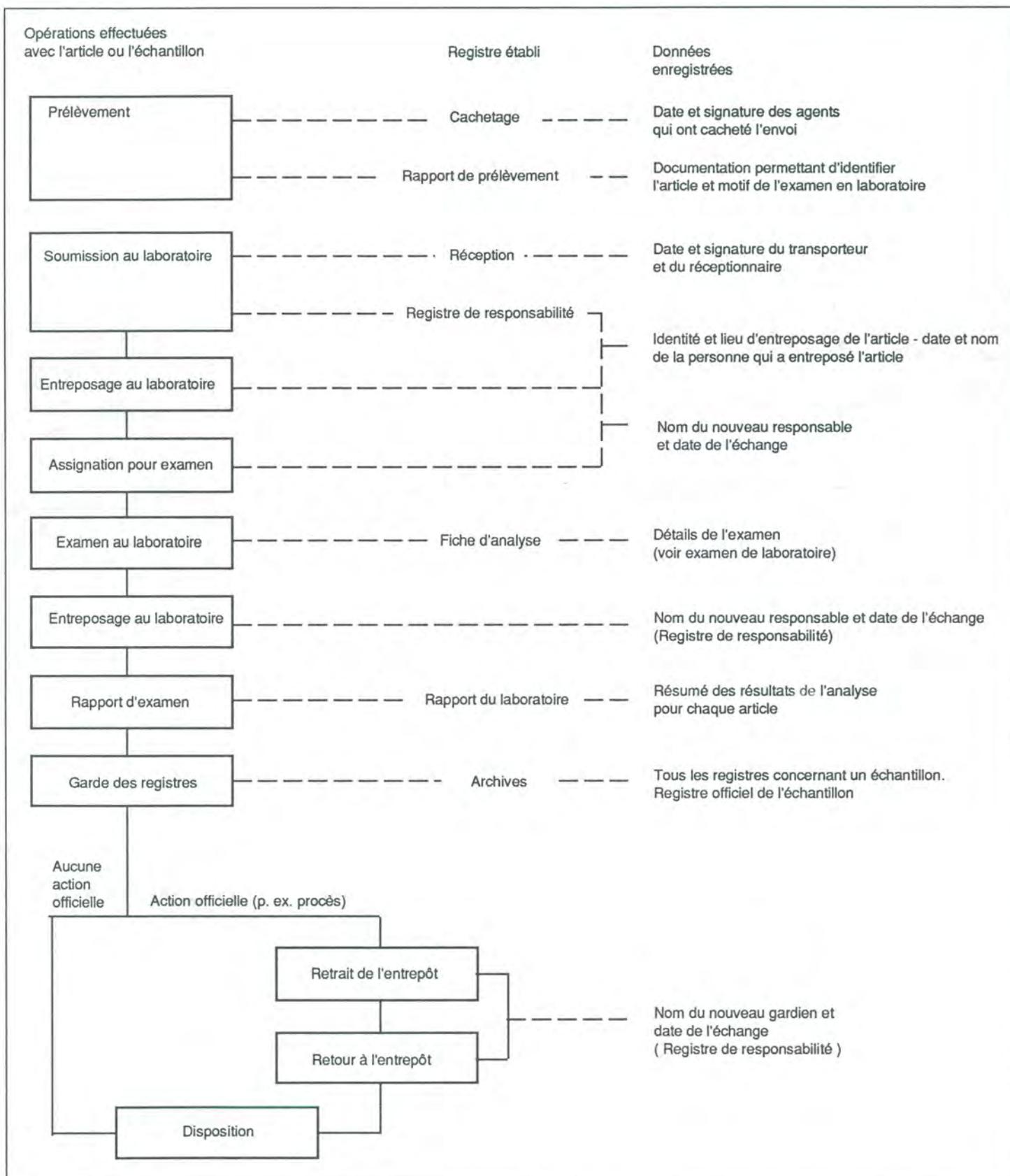
1. Saisir la souris près de la racine de la queue.
2. Retirer la souris de sa cage et la poser sur une surface dure.
3. Tirer lentement mais fermement la queue jusqu'à ce que la souris se trouve étendue.
4. Appuyer fermement une pièce métallique, par exemple des ciseaux ou une pince, sur la nuque de la souris.
5. Tirer brusquement la queue vers le haut pour disloquer la nuque et provoquer une mort instantanée.

B. Gazage à l'anhydride carbonique

1. On peut utiliser un exsiccateur de laboratoire comme chambre à gaz. Placer de la neige carbonique sous le plateau de l'exsiccateur. La neige carbonique ne doit pas entrer en contact direct avec la souris.
2. Verser suffisamment d'eau chaude sur la neige carbonique pour provoquer un dégagement d'anhydride carbonique.
3. Remettre en place le couvercle de l'exsiccateur de manière à former une enceinte étanche.
4. Laisser l'anhydride carbonique saturer l'intérieur de l'exsiccateur.
5. Déplacer légèrement le couvercle, introduire la souris dans l'enceinte saturée d'anhydride carbonique et refermer immédiatement l'exsiccateur.

ANNEXE 16

Exemple d'ordinogramme pour les échantillons à analyser en laboratoire



Exemple de fiche d'échantillonnage

1. FLAG SURVEILLANCE <input type="checkbox"/> COMPLIANCE <input type="checkbox"/> Dealer voluntarily holding thru 10-30-89				2. TYPE SAMPLE		3. SAMPLE NUMBER 8 9 — 180-121	
4. CF NO. 2289653		5. DATE COLLECTED 10-15-89		6. PRODUCT CODE 54AFA03		7. RESP FIRM M	8. PROGRAM ASSIGN CODE 1. 56008A
10. RELATED SPL None		11. PC 2	12. COLL NO. 057	13. SPLING DIST BOS		14. COLL DIST BOS	9. HOURS 1. 5 2. 3.
15. PRODUCT NAME AND IDENTIFICATION (Quote pertinent labeling including firm name and address) Vitamin B ₂ Human Non-Rx. Glass bottle lhd in part with sticker label "Bolton's 500 CT Riboflavin tablets 5 milligram***** Distributed by Bolton Pharmaceuticals, Inc., Portland, Maine 04111** Bottles in cardboard case, case labeled in part "12-500 bottles** Bolton Riboflavin**"							
16. REASON FOR COLLECTION (Indicate analysis needed & document assignment. Include CP No. and/or Assignment No. if applicable.) NYK/BOS memo 10-10-89, Label mix-up. Check identity.						17. MFG CODES (Labels, pkg, shipping containers) Bottle label "71921" Shipping carton "71921-4"	
18. MANUFACTURER (Name, address & ZIP) Margo Drug Co. 2747 Pine St. Yonkers, New York 10701			19. SHIPPER (Name, address & ZIP) same as #18			20. DEALER (Name, address, ZIP & telephone) Mercy Hospital Pharmacy 1500 Quincey Avenue Portland, Maine 04111 207-632-5687	
21. SIZE OF LOT FROM WHICH SAMPLED 2 cases/12/500 tab bottles & 3/500 tab bottles. Stock from same *				22. EST VALUE \$32.00		23. RECEIPT ISSUED FDA472 FDA484 NONE XXX	24. DATE SHIPPED & DOC REF 10/9/89 F/B
25. DESCRIPTION OF SAMPLE AND METHOD OF COLLECTION (Number and size of units, etc.) Three 500 tablet bottles, taken at random from shelf stock, all of same code.							
26. HOW PREPARED Each bottle label identified as on line #27. All three bottles wrapped together in brown paper bag with padding and bag off. Sealed as on line #28. Packed to ship.							
27. COLL IDENT ON PKG AND/OR LABEL "89-180-121 10-15-89 SR"			28. COLLECTOR'S IDENTIFICATION ON SEAL "89-180-121 10-15-89 Sylvia H. Rogers"				
29. SAMPLE DELIVERED TO P.P. Portland, Maine				30. DATE DELIVERED 10-15-89		31. LAB NYK	
				32. LAB W/SPLIT SAMPLE		33. ORIG C/R & RECORDS TO NYK	
34. RCDS OBTAINED	a. INVOICE NO. AND DATE #4789 10-8-89			b. SHIPPING RECORD (B/L, F/B, Waybill, Affidavit, etc.) NO. AND DATE F/B # 09012 - 10-9-89			
	c. OTHER DOCUMENTS (Affidavits from dealers, etc.) SIGNER'S NAME AND DATE Mr. Iam Wright, Reg. Pharm., Dealer Firm, dtd. 10-15-89						
	35. REMARKS (If additional space is needed, attach Form FDA 464a, C/R Continuation Sheets) * #21. Shipment also on hand consists of: 2/100 tablet bottles & 3/1000 tablet bottles labeled as on line #15 above, except for quantity of contents statement. All 27/500 tab. btl.s. examined visually and each contained approx. 80% brown tablets & approx. 20% dark red tablets. All 100 & 1000 tablet btl.s. examined visually contained uniform brown tablets.						
36. CONSUMER COMPLAINT NO. OR RECALL NO. N/A		37. AMT. \$ 4.25 CRED. CD. <input type="checkbox"/> C <input checked="" type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/>			38. 704(d) SPL YES <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>		39. COLLECTOR (Typed name and signature) Sylvia H. Rogers

COLLECTION REPORT

Exemple de compte rendu d'analyse

ANALYST WORKSHEET		1. PRODUCT Frozen Breaded Shrimp	2. SAMPLE NUMBER 89-12-123
3. SEALS <input type="checkbox"/> NONE <input checked="" type="checkbox"/> INTACT <input type="checkbox"/> BROKEN	4. DATE REC'D 4-4-89	5. RECEIVED FROM Philip W. Owen	6. DISTRICT OR LABORATORY DEN-DO
7. DESCRIPTION OF SAMPLE Two cardboard cartons each sealed "89-12-123 4-3-89 James P. Landry" and identified "89-12-123 4-3-89 JPL". Case #1 contains 23 plastic bottles and Case #2 contains 20 10 oz packages. Each bottle and package identified with sub nos and "89-12-123 4-3-89 JPL". All subs received hard frozen. Chipped ice control indicates sample received frozen.			
8. NET CONTENTS <input type="checkbox"/> NOT APPLICABLE <input checked="" type="checkbox"/> NOT DETERMINED <input type="checkbox"/> UNITS EXAMINED	DECLARE/UNIT: 10 oz AMOUNT FOUND % OF DECLARED	9. LABELING 3 ORIGINAL(S) SUBMITTED COPIES SUBMITTED <input type="checkbox"/> NONE Attached to CR	
10. SUMMARY OF ANALYSIS Container: (a) Subs 1-23: 8 oz wide mouth plastic bottle with screw-cap. (b) Subs 24-43: 10 oz waxed paper carton. Labeling: No labeling on bottles except inspector's identification. Package label submitted with collection report. Code: (a) Subs 24-33 coded "XL-4-3" stamped on top of cartons. (b) Subs 34-43 coded "XL-3-27" stamped on top of cartons. Product: Frozen, raw peeled shrimp, coated with breading material. Raw material and in-line subs. Analysis: Subs 1-43 examined for coliforms, <u>E. coli</u> , and <u>Staphylococcus aureus</u> MPN's and aerobic plate count. Method: AOAC XIV, 46.013-46.016. Results: (1) See <u>Summary of Bacteriological Results</u> , pages 2 and 3. (2) APC geometric average 10 subs finished product coded "XL-4-3" 1,600,000/g. APC geometric average finished product coded "XL-3-27" 2,100,000/g. See Attachment A. (3) Positive controls positive, and negative controls negative. See pages 13 and 14.			
11. RESERVE SAMPLE Case #1 containing subs 1-23 each with approximately 200 g (Subs 3, 4, and 5 with 300 g). Case #2 containing subs 24-33 each with approximately 250 g in original cartons. Each original case sealed "89-12-123 4-5-89 Brian L. Smith".			
12. a. ANALYST SIGNATURE (Break Seal <input checked="" type="checkbox"/> Brian L. Smith		13. WORK-SHEET CHECK	a. BY C.T. Rouse
b. Alice E. Williams			b. DATE 4-14-89
c.		14. DATE REPORTED 4-14-89	

Résumé des résultats de l'analyse bactériologique

SUMMARY OF BACTERIOLOGICAL RESULTS			ISL. BACTERIOLOGICAL DEFINITION Page 2 of 14 Pages		
1. PRODUCT Frozen Breaded Shrimp		2. SAMPLE NUMBER 89-12-123			
3. MANUFACTURER Le Blanc Shrimp Co., Grand Isle, La.		4. DATE COLLECTED 4-3-89			
SUBSAMPLE A	DESCRIPTION B	COLIFORMS MPN PER GRAM C	E. COLI MPN PER GRAM D	COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI MPN PER GRAM E	AEROBIC PLATE COUNT ORGANISMS PER GRAM F
1	Breading from previously unopened bag	15	<3	<3	8,000
2	Dry batter from previously unopened bag	7.3	<3	<3	12,000
3	Frozen, peeled shrimp from unopened bag	7.3	<3	<3	45,000
4	Frozen, peeled shrimp from 2nd unopened bag	23	3.6	3.6	60,000
5	Frozen, peeled shrimp from 3rd unopened bag	15	<3	<3	33,000
1st In-line sampling					
6	Shrimp after thawing in ben overnight (55°F)	460	<3	<3	450,000
7	Liquid batter freshly mixed from pot (56°F) 8:18 A.M.	15	3.6	3.6	5,000
8	Breader from machine 8:22 A.M.	11	<3	<3	560
9	Shrimp from trays at table 8:25 A.M.	1,100	<3	<3	550,000
10	Shrimp after 1st batter 8:30 A.M.	460	3.6	3.6	700,000
11	Shrimp after 1st breading 8:34 A.M.	210	<3	3.6	790,000
12	Shrimp after 2nd batter 8:39 A.M.	240	7.3	7.3	850,000
13	Shrimp after 2nd breading 8:43 A.M.	240	9.3	15	600,000
14	Shrimp from packing table 8:48 A.M.	460	9.1	11	740,000
2nd In-line sampling					
15	Shrimp from thawing bin (iced) 50°F 1:35 P.M.	1,100	<3	<3	950,000
16	Liquid batter from pot, 66°F 1:40 P.M.	>1,100	75	240	2,300,000
17	Breader from machine 1:44 P.M.	460	23	11	250,000
18	Shrimp from trays at table 1:50 P.M.	>1,100	<3	3.6	790,000
19	Shrimp after 1st batter 1:54 P.M.	>1,100	28	150	1,800,000
20	Shrimp after 1st breader 1:59 P.M.	>1,100	43	210	2,400,000
21	Shrimp after 2nd batter 2:04 P.M.	>1,100	93	93	1,900,000
22	Shrimp after 2nd breader 2:08 P.M.	>1,100	150	240	1,500,000
23	Shrimp from packing line 2:13 P.M.	>1,100	75	93	1,800,000

1 "<3" means "not found in 1/10 gm. portion"

SUMMARY OF BACTERIOLOGICAL RESULTS		SEE BACTERIOLOGICAL DEFINITIONS Page 3 of 14 Pages			
1. PRODUCT Frozen Breaded Shrimp		2. SAMPLE NUMBER 89-12-123			
3. MANUFACTURER Le Blanc Shrimp Co., Grand Isle, La.		4. DATE COLLECTED 4-3-89			
SUBSAMPLE A	DESCRIPTION B	COLIFORMS SPN PER GRAM C	E. COLI SPN PER GRAM D	COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI SPN PER GRAM E	AEROBIC PLATE COUNT ORGANISMS PER GRAM F
	(CODE XL-4-3)				
24	Finished breaded shrimp, produced 4-3-89	>1,100	150	240	1,200,000
25		>1,100	75	93	1,400,000
26		>1,100	93	210	1,800,000
27		>1,100	240	1,100	2,600,000
28		>1,100	43	240	1,100,000
29		>1,100	460	>1,100	3,700,000
30		>1,100	23	93	950,000
31		>1,100	93	75	900,000
32		>1,100	150	460	2,100,000
33		>1,100	75	210	1,600,000
	(CODE XL-3-27)				
34	Finished breaded shrimp, produced 3-27-89	>1,100	210	>1,100	3,600,000
35		>1,100	150	1,100	2,900,000
36		>1,100	93	460	2,700,000
37		>1,100	43	93	1,400,000
38		>1,100	75	75	1,300,000
39		>1,100	93	1,100	2,700,000
40		460	15	75	1,200,000
41		>1,100	43	210	2,500,000
42		>1,100	28	240	1,800,000
43		>1,100	75	460	1,800,000
Bruce L. Smith 102					

1 "<3" means "not found in 1/10 gm. portion"

Rapport sur la recherche de Salmonella

PRODUCT		PAGE		OF		PAGES		SAMPLE NUMBER			
Active Dry Yeast		2		4		4		89-01-345			
MANUFACTURER (Name and Address)											
SUMMARY	SUB NO.	1		2		3		4		5	
	SPECIES OR GROUP FOUND	Salmonella E ₄									
OTHER TESTS											
16-17. SINE IRON											
GAS											
H ₂ S											
BUTT		K									
SLANT		K									
18-21. H ANTIGENS											
SPICEII-EDWARDS											
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22-24. O ANTIGENS											
GROUP		E ₄									
POLY		+									
FACTORS											
25-28. LYSINE DEC											
MALONATE		-									
SUCROSE		-									
DULCITOL		-									
LACTOSE		-									
29-31. KCN											
I		-									
M		-									
V		-									
C		-									
32-34. UREA											
D		+									
S		+									
2		+									
B		+									
C		+									
SLANT		+									
2		+									
3		+									
4		+									
5		+									
6		+									
7		+									
8		+									
9		+									
10		+									
11		+									
12		+									
13		+									
14		+									
15		+									
16		+									
17		+									
18		+									
19		+									
20		+									
21		+									
22		+									
23		+									
24		+									
25		+									
26		+									
27		+									
28		+									
29		+									
30		+									
31		+									
32		+									
33		+									
34		+									
35		+									
36		+									
37		+									
38		+									
39		+									
40		+									
41		+									
42		+									
43		+									
44		+									
45		+									
46		+									
47		+									
48		+									
49		+									
50		+									
51		+									
52		+									
53		+									
54		+									
55		+									
56		+									
57		+									
58		+									
59		+									
60		+									
61		+									
62		+									
63		+									
64		+									
65		+									
66		+									
67		+									
68		+									
69		+									
70		+									
71		+									
72		+									
73		+									
74		+									
75		+									
76		+									
77		+									
78		+									
79		+									
80		+									
81		+									
82		+									
83		+									
84		+									
85		+									
86		+									
87		+									
88		+									
89		+									
90		+									
91		+									
92		+									
93		+									
94		+									
95		+									
96		+									
97		+									
98		+									
99		+									
100		+									
101		+									
102		+									
103		+									
104		+									
105		+									
106		+									
107		+									
108		+									
109		+									
110		+									
111		+									
112		+									
113		+									
114		+									
115		+									
116		+									
117		+									
118		+									
119		+									
120		+									
121		+									
122		+									
123		+									
124		+									
125		+									
126		+									
127		+									
128		+									
129		+									
130		+									
131		+									
132		+									
133		+									
134		+									
135		+									
136		+									
137		+									
138		+									
139		+									
140		+									
141		+									
142		+									
143		+									
144		+									
145		+									
146		+									
147		+									
148		+									
149		+									
150		+									
151		+									
152		+									
153		+									
154		+									
155		+									
156		+									
157		+									
158		+									
159		+									
160		+									
161		+									
162		+									
163		+									
164		+									
165		+									
166		+									
167		+									
168		+									
169		+									
170		+									
171		+									
172		+									
173		+									
174		+									
175		+									
176		+									
177		+									
178		+									
179		+									
180		+									
181		+									
182		+									
183		+									
184		+									
185		+									
186		+									
187		+									
188		+									
189		+									
190		+									
191		+									
192		+									
193		+									
194		+									
195		+									
196		+									
197		+									
198		+									
199		+									
200		+									

+A - Acid, AC - Acid and Gas, K - Alkaline, (-) -

Rapport sur la recherche de Shigella

SHIGELLA RECORD			PRODUCT				I NUMBER				SAMPLE NUMBER							
DISTRICT OR DIVISION			ANALYST				DATE				PAGE 2 OF 4 PAGES							
CIN-DO			Nancy Ellen Cook				3/20/89				89-23-169							
1. ENRICHMENT			GN (A)				SELENITE-CYSTINE (B)											
2. TIME			24 HOURS (C)				48 HOURS (D)				24 HOURS (E)				48 HOURS (F)			
3. SELECTIVE AGARS 3/21-22			XLD (O)	DC (P)	EMB (Q)	XLD (R)	DC (S)	EMB (T)	XLD (U)	DC (V)	EMB (W)	XLD (X)	DC (Y)	EMB (Z)				
4. COLONY			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
5. SLANT			K	A	K				K	A	K	K						
6. BUTT			A	A	A				A	A	A	A						
7. GAS			-	+	-				-	+	-	-						
8. H ₂ S			-	+	-				-	+	-	-						
9. UREASE			-	+	-				-	+	-	-						
10. MOTILITY			-	+	-				-	+	-	-						
11. MORPHOLOGY			+	+	+				+	+	+	+						
12. KFN			-	+	-				-	+	-	-						
13. MALONATE			-	-	-				-	-	-	-						
14. I			-	+	+				-	-	+	+						
15. U			+	+	+				+	+	+	+						
16. V			-	-	-				-	-	-	-						
17. C			-	-	-				-	+	+	-						
18. LACTOSE			-	-	-				-	AG	-	-						
19. SUCROSE			-	AG	-				-	-	A	-						
20. SALICIN			-	-	-				-	-	-	-						
21. INOSITOL			-	-	-				-	-	A	-						
22. ADONITOL			-	-	-				-	-	-	-						
23. GLUCOSE			A	AG	A				A	AG	A	A						
24. MALTOSE			A	AG	-				-	AG	-	A						
25. ARABINOSE			A	-	-				A	AG	-	A						
26. XYLOSE			-	AG	-				-	AG	-	A						
27. MANNITOL			A	-	A				A	AG	-	A						
28. SEROLOGY			UNBOILED		A		B		C		D		AD		BOILED		A	
29. PRESUMPTIVE IDENTIFICATION GENERA/GROUP			Shigella Group D		Shigella Group B		Shigella Group C ₁		Shigella Group C ₂		Providencia stuartii		Alkaligenes - Dispar					
30. POSITIVE SHIGELLA ISOLATE			S. Sonnei		S. flexneri		S. boydii		Citrobacter		Providencia stuartii		Alkaligenes - Dispar					
31. NEGATIVE ISOLATE (Leaker)			Proteus															
32. ADDITIONAL TESTS			Dulcitol		Sorbitol		Rhamnose		Raffinose									
33. DULCITOL			-		-		-		-									
34. SORBITOL			-		-		-		-									
35. RHAMNOSE			A		AG		-		-									
36. RAFFINOSE			-		-		-		-									

Analyse d'un aliment en conserve - Feuillet complémentaire

SUBSAMPLE NUMBER		1	2	3	4	5	6
CODE		W1/50/TW					
C/R DESCRIPTION		Normal					
BEFORE INCUBATION		Normal					
AFTER INCUBATION		Normal	Springer				
NO. DAYS INCUBATED		14					
INTERNAL		Normal	Dark discoloration around can seam	Normal			
SEAM EXAMINATION		Normal	Leakage along seam	Normal			
MICRO-LEAK		None	Several pin holes along seam	None			
pH		4.4	4.9	4.5	4.4	4.3	4.4
ODOR AND APPEARANCE		Normal	Dark discoloration, sour smell	Normal			
SMEAR		3-7 rods and 1-3 cocci/field	2-4 rods and 1-6 cocci/field	3-5 rods and 3-4 cocci/field	1-5 rods and 2-3 cocci/field	1-4 rods and 6-12 cocci/field	9-15 rods and 5-7 cocci/field
GAS		No H ₂ or CO ₂	H ₂ and CO ₂	No H ₂ / slight CO ₂	No H ₂ or CO ₂	No H ₂ or CO ₂	No H ₂ / slight CO ₂
COOKED LIVER (Cooked meat)		ND	ND				
55°C		ND	ND				
BROM-CRESOL PURPLE BROTH		ND	ND				
55°C		ND	ND				
ACID BROTH		-	+	-	-	-	-
85°C		-	+	-	-	-	-
30°C		-	-	-	-	-	-
MALT EXTRACT		-	-	-	-	-	-
30°C		-	-	-	-	-	-
MICROSCOPIC EXAMINATION		No microorganisms observed	Acid broth, 30°C - both tubes with bacilli; 55°C - both tubes with cocci	No microorganisms observed			
SUMMARY		Normal can and product	Can with decomposing product and microleaks around can seam closure	Normal can and product			

CANNED FOOD CONTINUATION SHEET

Recherche de Botulinum - Feuillet complémentaire

PRODUCT		Smoked Salmon			PAGE 2 OF 5 PAGES	SAMPLE NUMBER 89-11-110		
METHOD OF PREPARATION								
200 gms fish + 200 ml sterile gel phosphate buffer + approx. 10 gms sterile sand ground in a sterile mortar with a sterile pestle. Mixture centrifuged and filtered through Millipore filter. Filtrate adjusted to pH 6.1. Half of the filtrate used for toxicity screening test; remainder stored at 0°C for confirmation test.								
A sub = filtrate heated 10 min at 100°C (undiluted) B sub = filtrate non-trypsinized C sub = filtrate trypsinized. All injections 0.5 ml intraperitoneally.								
ANALYST(S) Edward H. Loinski						DATE 5/8/89		
SUB NO.	TOXICITY SCREENING TEST	NEUTRALIZATION						SUMMARY
		UNPROTECTED		PROTECTED				
1A	0							
1B	0-1-2 0 0 0							
1C	0-1-2 0 0 0							
2A	0							
2B	0-1-2 2 1 1							
2C	0-1-2 2 2 2	2 2 2	2 2 2	Protected A 2 2 2	Protected B 2 2 2	Protected E 0 0 0	Mice protected by E antitoxin; not by A or B	
3A	0-1-2 0 2 0	0 0 0	0 1 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	See page 5 for repeat analysis on filtrate. No toxicity.	
3B	0							
3C	0-1-2 0 0 0							
4A	0							
* NUMBER OF DEAD MICE OUT OF 2 INOCULATED								

**Liste des opérations de contrôle
pour l'assurance de la qualité**

A. Environnement

1. Les canalisations, le chauffage, l'éclairage, l'aération, etc. sont vérifiés régulièrement de manière qualitative par le personnel du laboratoire qui en contrôle l'adéquation pour les activités qui y sont effectuées
 Oui Non
2. L'état des locaux est satisfaisant: encombrement, accès, sécurité, nettoyage régulier. Un préposé contrôle ces conditions en l'absence des principaux usagers des locaux.
 Oui Non
3. Les paillasses sont maintenues propres en vue des analyses.
 Oui Non
4. Les hottes ne servent pas à l'entreposage de longue durée des produits chimiques ou des réactifs.
 Oui Non
5. Les portes coulissantes des armoires contenant la verrerie ou les milieux de culture sont toujours fermées.
 Oui Non
6. La qualité microbiologique de l'atmosphère est mesurée tous les 15 jours et les résultats sont consignés. A cet effet, on peut exposer à l'air une plaque de gélose pendant 15 minutes. Le nombre de colonies après incubation ne devrait pas dépasser 15. Dans le cas contraire, les activités du laboratoire sont suspendues et les locaux sont désinfectés.
 Oui Non
7. Il n'y a pas de ventilateurs.
 Oui Non

8. Des désinfectants ininflammables sont utilisés pour nettoyer les paillasses avant et après l'analyse des échantillons.

Oui Non

9. Le système d'élimination des substances pathogènes est satisfaisant.

Oui Non

10. Des mesures sont prises pour prévenir, supprimer ou réduire l'infestation par les insectes et les rongeurs.

Oui Non

11. Quand le laboratoire recourt aux services d'une entreprise commerciale de désinfestation, il tient un registre indiquant les dates des pulvérisations de pesticides.

Oui Non

12. Des normes sont applicables quant à l'intégrité des échantillons et aux conditions du milieu ambiant (fumer, manger et boire dans le laboratoire). Il est interdit de fumer, de manger et de boire sur les lieux de travail.

Oui Non

13. Les carences environnementales indépendantes de la volonté du personnel du laboratoire sont rapidement signalées à l'administration.

Oui Non

B. Echantillonnage

1. Avant d'examiner un échantillon, l'analyste s'assure que l'on a appliqué un plan d'échantillonnage correct.

Oui Non

2. Si l'échantillon a été mal prélevé, l'échantillonneur en est avisé et est prié de prélever un échantillon valable.

Oui Non

3. Il existe un système permettant d'établir qui est responsable des échantillons.

Oui Non

4. Il existe un système permettant d'établir qui est responsable des échantillons (cultures mères) de référence.
- Oui Non
5. Si l'échantillon comporte plusieurs sous-unités, chacune de celles-ci est étiquetée de manière à conserver son individualité au cours de l'analyse.
- Oui Non
6. Si l'échantillon comporte plusieurs sous-unités, chacune de celles-ci est analysée individuellement, sauf indication contraire.
- Oui Non
7. L'analyste s'assure que chaque échantillon est accompagné d'une fiche de prélèvement contenant les renseignements suivants: type de denrée ou d'échantillon, numéro de l'échantillon, date de prélèvement, nom ou numéro d'identification de l'échantillonneur, motif du prélèvement, nom et adresse du fabricant, code du fabricant, taille du lot échantillonné, description de l'échantillon, méthode de prélèvement et destination de l'échantillon.
- Oui Non
8. Si les échantillons sont prélevés sous asepsie, les instruments utilisés (récipient, gants et ustensiles stériles) sont joints aux échantillons.
- Oui Non
9. L'analyste s'assure que l'intégrité microbiologique de l'échantillon a été préservée durant le transport en relevant la température du thermomètre à maxima.
- Oui Non
10. Si l'échantillon ne peut être analysé dès son arrivée au laboratoire, l'analyste s'assure qu'il est entreposé dans des conditions propres à en maintenir l'intégrité microbiologique.
- Oui Non
11. Avant de procéder à l'analyse, l'analyste contrôle l'état physique du récipient de l'échantillon pour vérifier l'absence de déchirures, de piqûres, etc.
- Oui Non

C. Appareils

1. Généralités

- a. Tous les appareils se trouvent dans un milieu qui en garantit le bon fonctionnement.

Oui Non

- b. Tous les appareils sont utilisés conformément aux recommandations du fabricant.

Oui Non

- c. Les appareils sont étalonnés/normalisés avant emploi et selon les besoins.

Oui Non

- d. Les manuels concernant les appareils se trouvent en un lieu facilement accessible par le personnel du laboratoire.

Oui Non

- e. Le laboratoire dispose d'un programme de maintenance préventive des appareils qui peut être appliqué par son propre personnel. Toute irrégularité dans le fonctionnement des appareils est immédiatement signalée au superviseur.

Oui Non

- f. Tout appareil non utilisé régulièrement ou ne fonctionnant pas correctement est immédiatement individualisé.

Oui Non

- g. On tient un registre de la maintenance des appareils du laboratoire.

Oui Non

- h. On connaît les principaux utilisateurs des appareils délicats.

Oui Non

- i. Le personnel sait quoi faire pour la réparation des appareils.

Oui Non

2. Points spécifiques

a. Etuves

(1) L'enceinte interne est propre et ne présente aucune infiltration.

Oui Non

(2) La température interne est contrôlée par un ou plusieurs thermomètres à immersion partielle, dont le nombre dépend de la dimension de l'étuve. Les relevés sont faits au début et à la fin de la journée de travail et transcrits dans un registre.

Oui Non

(3) Les étuves thermostatées à 35° maintiennent cette température, avec une tolérance de 2°.

Oui Non

(4) On procède une fois par an à l'étalonnage des thermomètres à immersion partielle, et les résultats sont enregistrés.

Oui Non

(5) Les graduations des thermomètres à immersion partielle ne dépassent pas 0,1°.

Oui Non

(6) On contrôle quotidiennement les colonnes de mercure liquide des thermomètres à immersion partielle pour vérifier qu'il n'y a pas d'interruption.

Oui Non

(7) Les thermogrammes sont signés et datés lors de leur insertion et de leur retrait.

Oui Non

(8) Les thermogrammes sont changés pour éviter toute surimpression.

Oui Non

(9) Les thermogrammes sont conservés pendant trois ans.

Oui Non

- (10) On détermine indirectement le niveau d'humidité de l'étuve tous les trois mois en calculant le pourcentage de perte pondérale de plaques de gélose incubées à 35° pendant 48 ± 2 heures, et cette donnée est consignée dans le registre des températures.

Oui Non

- (11) Le pourcentage de perte pondérale des plaques de gélose incubée à 35° pendant 48 ± 2 heures ne dépasse pas 15 %.

Oui Non

b. Bains-marie

- (1) Les bains-marie sont propres et exempts de rouille.

Oui Non

- (2) Les couvercles s'adaptent bien.

Oui Non

- (3) La température des bains-marie est contrôlée par un thermomètre à immersion totale étalonné. Les relevés se font au début et à la fin de la journée de travail et de 3 à 4 fois pendant l'horaire normal de travail. Ces relevés sont consignés dans le registre des températures.

Oui Non

- (4) Les thermomètres à immersion totale sont étalonnés une fois par an et les lectures sont enregistrées.

Oui Non

- (5) Les graduations des thermomètres à immersion totale ne dépassent pas 0,1°.

Oui Non

- (6) On contrôle quotidiennement les colonnes de mercure liquide des thermomètres à immersion totale pour vérifier qu'il n'y a pas d'interruption.

Oui Non

- (7) Les thermogrammes sont signés et datés lors de leur insertion et de leur retrait.
 Oui Non
- (8) Les thermogrammes sont changés pour éviter toute surimpression.
 Oui Non
- (9) Les thermogrammes sont conservés pendant trois ans.
 Oui Non
- (10) Faute de thermomètre enregistreur, on utilise des cultures d'Escherichia coli et d'Enterobacter aerogenes pour s'assurer que la température n'a pas dépassé la tolérance admissible pendant les heures non ouvrables.
 Oui Non

c. Réfrigérateurs et congélateurs

- (1) L'intérieur est propre et ne présente aucune infiltration.
 Oui Non
- (2) La température interne des réfrigérateurs (4°) et des congélateurs (-20°) est contrôlée par un ou plusieurs thermomètres à immersion partielle étalonnés. Les relevés quotidiens sont transcrits dans le registre des températures.
 Oui Non
- (3) On procède une fois par an à l'étalonnage des thermomètres à immersion partielle, et les résultats sont enregistrés.
 Oui Non
- (4) Les graduations des thermomètres à immersion partielle ne dépassent pas 1°.
 Oui Non
- (5) On contrôle quotidiennement les colonnes de mercure liquide des thermomètres à immersion partielle pour vérifier qu'il n'y a pas d'interruption.
 Oui Non

d. Autoclaves

- (1) L'autoclave peut maintenir une température interne de 121° sous une pression de 15 psi.
 Oui Non
- (2) Un cycle complet ne demande pas plus de 45 minutes.
 Oui Non
- (3) L'autoclave a un manomètre et un thermomètre du côté de l'évacuation et une soupape de sécurité.
 Oui Non
- (4) L'autoclave a un thermographe qui donne un relevé permanent du cycle de stérilisation.
 Oui Non
- (5) Les thermogrammes de l'autoclave sont conservés pendant au moins 3 ans.
 Oui Non
- (6) Il n'y a pas de bulles d'air produites dans les fioles de fermentation pendant la dépressurisation.
 Oui Non
- (7) On utilise avec chaque chargement un indicateur microbiologique, comme Bacillus stearothermophilus (spores), un thermomètre enregistreur à maxima ou un bouchon indicateur de stérilité.
 Oui Non
- (8) Pour chaque chargement, on note la durée et la température.
 Oui Non
- (9) L'autoclave est révisé chaque année et les résultats sont consignés dans un registre.
 Oui Non

e. Etuves à air chaud

- (1) L'étuve dispose d'un thermomètre étalonné pouvant enregistrer les températures entre 160 et 180°.
- Oui Non
- (2) Le thermomètre est étalonné chaque année et les résultats sont notés.
- Oui Non
- (3) Les graduations des thermomètres ne dépassent pas 1°.
- Oui Non
- (4) On note la durée et la température de chaque cycle de stérilisation.
- Oui Non
- (5) Avec chaque chargement, on utilise une bande indicatrice commerciale de stérilité.
- Oui Non

f. Balances

- (1) Les plateaux de la balance sont propres.
- Oui Non
- (2) Toutes les balances de haute précision sont nettoyées et calibrées une fois par an.
- Oui Non
- (3) Les résultats des étalonnages annuels sont consignés dans un registre ou conservés dans les archives.
- Oui Non

g. pH-mètres

- (1) L'étui du pH-mètre est propre et exempt de poussière.
- Oui Non

(2) Hors emploi, les électrodes de verre sont maintenues dans une solution tampon à pH 7.

Oui Non

(3) Hors emploi, les électrodes de référence sont maintenues dans une solution de KCl 0,1 M.

Oui Non

(4) Les pH-mètres sont étalonnés avant chaque utilisation.

Oui Non

(5) On n'utilise que des solutions tampons valides.

Oui Non

(6) Les portions de solutions tampons ne sont pas réutilisées.

Oui Non

h. Mélangeurs

(1) Le socle du mélangeur est propre.

Oui Non

(2) La vitesse de rotation du mélangeur a été étalonnée avec un tachymètre, avec annotation dans un registre.

Oui Non

i. Hotte à flux laminaire

(1) Toutes les procédures comportant la présence d'organismes pathogènes, l'emploi de milieux stériles ou la détermination de la stérilité de conserves alimentaires s'effectuent sous une hotte à flux laminaire.

Oui Non

(2) Avant chaque utilisation, les surfaces internes de la hotte sont nettoyées avec un désinfectant liquide.

Oui Non

- (3) Dans la hotte, on utilise des becs Bunsen, Fischer, etc.
 Oui Non
- (4) On vérifie chaque mois le fonctionnement de la hotte en exposant pendant 1 heure au courant d'air des plaques de gélose au sang. Après incubation à 35° pendant 24 et 48 heures, aucune colonie n'est observée. Ces résultats sont notés.
 Oui Non
- (5) La hotte est révisée chaque année par un technicien qualifié, et les résultats sont consignés dans un registre.
 Oui Non

j. Microscopes

- (1) Les microscopes ne se déplacent pas.
 Oui Non
- (2) Hors emploi, les microscopes sont protégés de la poussière par une housse.
 Oui Non
- (3) Le statif des microscopes est propre.
 Oui Non
- (4) Les objectifs sont propres.
 Oui Non
- (5) Les microscopes sont révisés chaque année, et les résultats sont notés.
 Oui Non

k. Verrerie

- (1) La verrerie du laboratoire est en verre de borosilicate.
 Oui Non
- (2) La verrerie est exempte de craquelures et d'ébréchures.
 Oui Non

- (3) Les extrémités des pipettes de verre ne sont pas ébréchées.
 Oui Non
- (4) Les cols des flacons de dilution ne sont pas ébréchés.
 Oui Non
- (5) La verrerie est propre et exempte de résidus ou de milieu desséché.
 Oui Non
- (6) Les flacons à bouchon fileté ont des chemisages étanches, non toxiques, pouvant supporter des passages répétés à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°.
 Oui Non
- (7) La verrerie calibrée a des traits de jauge clairement visibles.
 Oui Non

D. Produits chimiques, milieux de culture et réactifs

1. On tient un inventaire de tous les produits chimiques et des milieux déshydratés.
 Oui Non
2. Seuls des colorants certifiés pour usage bactériologique sont utilisés.
 Oui Non
3. Les flacons de milieux et de produits chimiques sont datés et paraphés quand ils sont réceptionnés et ouverts.
 Oui Non
4. Les milieux, sérums et réactifs expirés sont éliminés.
 Oui Non
5. Les milieux déshydratés coagulés ou décolorés ne sont pas utilisés.
 Oui Non

6. Les milieux déshydratés et les produits chimiques sont conservés dans des flacons étanches à l'abri de la poussière, de l'humidité excessive et de la lumière solaire directe.

Oui

Non

7. Tous les milieux sont préparés avec de l'eau pure.

Oui

Non

8. Les milieux déshydratés sont entièrement dissous avant utilisation.

Oui

Non

9. On tient un registre de la préparation de tous les milieux réhydratés et réactifs chimiques.

Oui

Non

10. On vérifie le pH de chaque lot de milieu après préparation et autoclavage.

Oui

Non

11. Les milieux sont autoclavés conformément aux recommandations précises (durée, température et pression) de la méthode utilisée.

Oui

Non

12. Les milieux en tubes de fermentation sont examinés à leur sortie de l'autoclave. Les tubes de fermentation présentant des bulles d'air sont éliminés.

Oui

Non

13. On tient un registre d'autoclave pour pouvoir déterminer les conditions de stérilisation de chaque lot de milieu de culture.

Oui

Non

E. Etalons

1. On contrôle la pureté et l'authenticité des souches bactériennes mères avant leur utilisation. Les résultats sont consignés dans un registre.

Oui

Non

2. Les cultures de référence sont gardées à long et à court terme pour garantir la viabilité et la stabilité de leurs caractéristiques biochimiques, sérologiques et pathogéniques.

Oui

Non

F. Méthodes

1. On applique la méthode d'analyse appropriée. Dans la mesure du possible, il s'agit d'une méthode officiellement approuvée par une organisation comme l'Association of Official Analytical Chemists, le Comité nordique d'analyse des aliments, la Commission internationale des spécifications microbiologiques pour les aliments, etc.

Oui

Non

2. Toutes les méthodes utilisées sont appliquées au pied de la lettre.

Oui

Non

3. Si des circonstances spéciales exigent la modification d'une méthode officielle, tous les changements sont notés dans le compte rendu d'analyse.

Oui

Non

4. Quand il faut utiliser une méthode non officielle, celle-ci est validée dans le laboratoire de l'analyste.

Oui

Non

5. Des témoins appropriés (voir section 9.2) sont utilisés dans chaque analyse d'échantillons.

Oui

Non

G. Tests avec animaux

1. Les souris sont placées en quarantaine au moins 1 semaine avant le test.

Oui

Non

2. Le sol de l'animalerie est balayé et nettoyé chaque jour avec un désinfectant.

Oui

Non

3. Les murs de l'animalerie sont désinfectés au moins une fois par mois.

Oui

Non

4. La température et l'humidité de l'animalerie sont surveillées à l'aide d'un hygrothermographe.
 Oui Non
5. Les bandes d'enregistrement de l'hygrothermographe sont changées chaque semaine pour éviter toute surimpression.
 Oui Non
6. L'analyste qui insère la bande de l'hygrothermographe et celui qui la retire y apposent leurs initiales et inscrivent la date de l'opération.
 Oui Non
7. Après utilisation, les bandes d'enregistrement de l'hygrothermographe sont conservées dans un registre.
 Oui Non
8. L'animalerie est pourvue d'un compteur de temps pour assurer l'alternance toutes les 12 heures de la lumière et de l'obscurité.
 Oui Non
9. Les cages sont suffisamment spacieuses pour éviter tout encombrement.
 Oui Non
10. Les cages portent des étiquettes ou d'autres formes d'identification complète.
 Oui Non
11. La nourriture des animaux est changée 2 fois par semaine.
 Oui Non
12. L'eau est changée 3 fois par semaine.
 Oui Non
13. On note dans un registre la fréquence du renouvellement de la nourriture et de l'eau des souris.
 Oui Non

14. On applique les procédures appropriées (voir section 10.7) pour immobiliser et injecter les souris.

Oui

Non

15. On applique les procédures appropriées (voir section 10.8) pour supprimer les souris.

Oui

Non

H. Documentation

1. Les données du compte rendu d'analyse sont compatibles avec celles de la fiche d'échantillonnage.

Oui

Non

2. Le compte rendu d'analyse décrit complètement l'aspect de l'échantillon et son état lors de sa réception par l'analyste.

Oui

Non

3. Le compte rendu d'analyse reflète de manière complète et exacte la continuité et l'intégrité de l'échantillon.

Oui

Non

4. Tous les types de milieux et de produits chimiques utilisés, ainsi que leurs numéros de lot, sont indiqués dans le compte rendu d'analyse.

Oui

Non

5. Toutes les cultures de référence utilisées sont indiquées dans le compte rendu d'analyse.

Oui

Non

6. Tous les calculs indiqués dans le compte rendu d'analyse ont subi une vérification de leur exactitude et sont faciles à comprendre.

Oui

Non

7. Quand plusieurs personnes ont participé à l'analyse, leurs noms sont clairement indiqués dans le compte rendu d'analyse.

Oui

Non

8. Le compte rendu d'analyse indique clairement si l'échantillon a été envoyé à la réserve ou a été éliminé.

Oui

Non

9. Tous les résultats reportés dans le compte rendu d'analyse sont écrits à l'encre.

Oui

Non

10. Toute erreur dans le compte rendu d'analyse est biffée d'un seul trait. La donnée correcte est inscrite au-dessus, paraphée et datée.

Oui

Non

11. Les données figurant sur la fiche de prise en charge de l'échantillon sont exactes, complètes et compatibles avec celles de la fiche d'échantillonnage et du compte rendu d'analyse.

Oui

Non

12. La fiche de prise en charge de l'échantillon rend correctement compte de sa manutention et de son entreposage.

Oui

Non

13. Les fiches d'échantillonnage sont convenablement conservées.

Oui

Non

14. Les échantillons sont entreposés dans un local propre et bien fermé dans des conditions appropriées de température et d'humidité.

Oui

Non

ISBN 92-5-203053-0 ISSN 1014-2908



9 789252 030539

M-62

T0451F/1/11.92/1200