



Health
Canada Santé
Canada



Direction des Aliments



Ligne directrice à l'intention de l'industrie :

Prélèvement et analyse de pousses et de l'eau d'irrigation usée

Direction des aliments
Direction générale des produits de santé
et des aliments
Santé Canada

Version : 001
Date d'émission : Décembre 2006

Adapté de : Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.
*Guidance for Industry, Sampling and Microbial Testing of Spent Irrigation Water During Sprout
Production.* Le 27 octobre 1999.

Ce document est disponible à:
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/sprout_water_testing_analyse_pousses_eau_f.html

Introduction

Ce document fait parti de la *Politique sur la gestion du risque pour la santé lié à la consommation de graines et de fèves germées*¹, Santé Canada, et doit être utilisé par les parties intéressées, les producteurs de pousses, les laboratoires privés, ainsi que par le personnel du gouvernement lorsqu'ils réalisent une analyse pour la détection de les espèces de *Salmonella* et *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 dans les pousses et l'eau d'irrigation usée.

Analyse d'échantillon d'eau d'irrigation usée

Des procédures sont fournies pour l'analyse de l'eau d'irrigation usée et des pousses. Santé Canada recommande que les entreprises de traitement analysent régulièrement au moins l'eau d'irrigation usée.

L'eau d'irrigation usée qui a coulé sur et à travers les pousses représente un bon indicateur des types de micro-organismes présents dans les pousses elles-mêmes. On s'attend à ce que les micro-organismes présents dans l'eau d'irrigation usée soient plutôt uniformes. Par conséquent, les procédures d'échantillonnage de l'eau d'irrigation usée sont relativement simples. En outre, l'eau peut être utilisée directement dans les procédures d'analyse décrites dans le présent document. Le seul désavantage possible de l'analyse d'une eau d'irrigation usée réside dans le fait que la concentration de microorganismes récupérés dans l'eau d'irrigation usée est d'environ 1 log (10 fois) inférieure à la concentration de microorganismes retrouvés dans les pousses. Si la concentration de pathogènes dans les pousses est très faible, il est possible qu'ils ne soient pas décelés dans l'eau d'irrigation usée, mais qu'ils le soient dans les échantillons de pousses si ces dernières sont analysées.

Toutefois, l'analyse des pousses elles-mêmes présente plusieurs désavantages importants. Premièrement, il est nécessaire de prélever, à différents endroits du baril ou des plateaux, un certain nombre d'échantillons de pousses pour s'assurer de prélever un échantillon représentatif par lot. Par ailleurs, pour l'analyse des pousses, il faut effectuer une préparation supplémentaire (p. ex. sélectionner des sous-échantillons représentatifs pour les analyses, mélanger au mélangeur ou au stomacher et permettre aux particules de pousses de se déposer). Enfin, le besoin d'attendre les résultats d'analyse des pousses retardera la livraison du produit fini sur le marché. Chaque étape supplémentaire de toute procédure (d'échantillonnage ou d'analyse) peut introduire une contamination.

Par conséquent, il est déconseillé d'analyser les pousses au lieu de l'eau d'irrigation usée, sauf si les méthodes de production font en sorte qu'il est impossible d'analyser l'eau d'irrigation usée.

¹http://web.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/sprouts_pol_pousses_f.html

Nota : La recommandation d'analyser l'eau d'irrigation usée n'écarte pas le besoin d'analyses supplémentaires sur les pousses (prélevées durant la production ou le produit fini.)

Prélèvement des échantillons

Le prélèvement des échantillons doit être effectué sur place par un personnel formé pour prélever des échantillons représentatifs en condition d'asepsie. Les procédures d'échantillonnage en condition d'asepsie sont décrites ci-dessous.

Analyse

Santé Canada recommande que toutes les analyses de dépistage de pathogènes soient effectuées dans un laboratoire externe, certifié et indépendant, qui doit respecter plusieurs critères essentiels. Premièrement, le laboratoire doit occuper des locaux physiquement séparés des installations de production alimentaire, afin d'empêcher toute contamination croisée causée par le matériel d'analyse. Ce point est particulièrement important vu que le matériel utilisé pour l'étape d'enrichissement préalable à l'analyse et les témoins positifs peuvent comprendre des agents pathogènes et qu'ils peuvent contaminer les pousses lors d'une manipulation incorrecte. Deuxièmement, le personnel du laboratoire doit être formé et expérimenté dans les techniques d'analyse microbiologique pour s'assurer que les analyses sont effectuées correctement et que toutes les précautions de sécurité appropriées, y compris les techniques appropriées d'élimination des déchets, sont respectées. Troisièmement, le laboratoire doit posséder les ressources nécessaires et pouvoir démontrer que ces ressources se conforment à un système de gestion de la qualité. Si l'analyse microbienne est effectuée par le producteur de pousses, les installations, le personnel et le système de gestion du laboratoire doivent également respecter tous ces critères pour assurer la fiabilité des analyses et pour ne pas générer des risques d'insalubrité alimentaire.

Il faut tenir compte des facteurs suivants pour déterminer la période et la technique d'échantillonnage.

Période d'échantillonnage

Il est probable que des agents pathogènes seront présents à des niveaux décelables 48 heures après le début du processus de germination. Ces niveaux n'augmenteront pas nécessairement après 48 heures et pourraient même diminuer quelque peu. Il est donc possible de prélever des échantillons à des fins d'analyse aussi tôt que 48 heures après le début de la germination. Si les graines sont prétrempées (p. ex. trempées dans l'eau pour une courte période, puis transférées dans des unités de culture à des fins de germination), le temps de prétrempage doit être inclus.

Des résultats précoces permettront au producteur de pousses de prendre plus rapidement des mesures correctives, minimisant ainsi la possibilité qu'un lot de pousses contaminées

compromette d'autres lots de production. L'échantillonnage et l'analyse 48 heures après le début de la germination réduiront également le temps et les ressources consacrés à un lot de pousses si on obtient un résultat présumé positif. Si le plan d'action d'un producteur comprend d'effectuer des analyses de confirmation sur un lot présumé positif avant d'éliminer le produit, l'analyse précoce, plutôt que tardive, accorde plus de temps pour effectuer des analyses supplémentaires.

Technique d'échantillonnage

Il est crucial d'utiliser des procédures aseptiques afin d'éviter toute contamination de l'échantillon durant les étapes de prélèvement, d'entreposage et de transport des échantillons vers le laboratoire. Les techniques d'échantillonnage aseptiques décrites ci-dessous doivent faire partie du plan d'échantillonnage d'un producteur.

Le matériel servant au prélèvement d'échantillons doit être propre et stérile. Les instruments et les contenants d'échantillonnage peuvent également être achetés préréprouvés. En variante, les instruments et les contenants peuvent être stérilisés à 121 °C (250 °F) pendant 30 minutes dans un autoclave avant utilisation. Le matériel sec et thermorésistant peut être stérilisé dans un four à chaleur sèche à 140 °C (284 °F) pendant trois heures.

Le type de contenant d'échantillonnage utilisé variera selon le genre d'échantillon prélevé, mais peut comprendre des sacs en plastique, des tubes, des tasses et des flacons préréprouvés. Les contenants doivent être secs, étanches, à large ouverture et d'une dimension convenable pour les échantillons. Les contenants doivent également pouvoir se fermer hermétiquement de façon à assurer l'intégrité de l'échantillon. Les contenants d'échantillonnage doivent être correctement étiquetés avant d'amorcer le prélèvement d'échantillons.

Les responsables du prélèvement des échantillons doivent porter un sarrau de laboratoire propre, des gants stériles et un filet à cheveux pour éviter qu'ils contaminent des échantillons. Ils doivent se laver les mains immédiatement avant l'échantillonnage et avant de mettre des gants stériles. Les gants doivent être mis de façon à ne pas contaminer la partie extérieure des gants. Les gants utilisés doivent être jetés de manière correcte après utilisation.

Il faut éviter de se toucher la bouche, le nez, les yeux et le visage pendant le prélèvement des échantillons.

Les instruments servant à l'échantillonnage doivent être protégés de toute contamination possible avant et pendant leur utilisation. Les instruments servant à l'échantillonnage et les échantillons déplacés entre le site d'échantillonnage et le contenant d'échantillonnage ne doivent pas approcher les autres instruments préréprouvés.

Le contenant d'échantillon stérile doit être ouvert seulement suffisamment afin de permettre d'y

déposer directement l'échantillon, et être ensuite immédiatement refermé et scellé. Si les échantillons sont prélevés dans un contenant muni d'un couvercle, le contenant et le couvercle doivent être manipulés à l'aide d'une seule main durant le prélèvement. Le couvercle NE doit PAS être complètement retiré. (Le couvercle ne doit pas être tenu séparément ou déposé sur un comptoir.)

Le contenant d'échantillon ne doit pas être rempli plus qu'aux trois quarts de sa capacité pour éviter tout débordement. Il ne faut pas évacuer l'air du contenant lors de son scellage, plus particulièrement pour les sacs en plastique. Les échantillons ou le matériel d'échantillonnage ne doivent pas être exposés à des courants d'air non filtré.

Les échantillons doivent être livrés au laboratoire et analyser le plus rapidement possible. Le matériel périssable doit être maintenu à la température appropriée, de préférence entre 0 et 4 °C (32 à 40 °F). Il faut utiliser des sacs réfrigérants scellés pour éviter toute contamination causée par la fonte de la glace.

Plan d'échantillonnage

Les producteurs de pousses doivent mettre en place un plan d'échantillonnage pour assurer le prélèvement uniforme d'échantillons d'une manière appropriée. Ils doivent effectuer des analyses de dépistage de pathogènes en prélevant un échantillon représentatif d'eau d'irrigation usée sur chaque lot ou bassin de production.

Aux fins de la présente ligne directrice, un lot de pousses est défini comme étant la quantité de pousses produite et manipulée dans des conditions uniformes et avec le moins de variation possible et récoltée le même jour (p. ex. des pousses produites à partir d'un même lot de pousses, germées et récoltées en utilisant les mêmes méthodes de désinfection et de croissance, ainsi que le même type d'équipement).

Le groupage d'échantillons prélevés sur différents lots de pousses permettra une réduction de la charge de travail d'analyse. Si un résultat présumé positif est obtenu, le producteur de pousses doit éliminer tous les lots représentés dans l'échantillon groupé ou effectuer des analyses supplémentaires pour déterminer le ou les lot(s) contaminé(s).

1. Prélèvement d'échantillons d'eau d'irrigation usée

Les volumes indiqués ci-après pour les échantillons d'eau d'irrigation usée (ou de pousses) représentent une taille d'échantillon suffisante pour l'analyse de *Salmonella* et d'*Escherichia coli* O157:H7.

Dans le cas de l'analyse d'eau d'irrigation usée, on effectue le prélèvement aseptique d'un litre

au moment où l'eau quitte le baril ou le plateau pendant le cycle d'irrigation.

Si les pousses sont cultivées dans des barils, un seul échantillon d'un litre est prélevé.

Si les pousses sont cultivées sur des plateaux et que tous les plateaux d'un lot de production sont reliés à un bassin commun qui reçoit l'eau d'irrigation usée, un échantillon d'un litre peut être prélevé à cet endroit. S'il n'existe pas de point commun de réception de l'eau des plateaux, il peut se révéler nécessaire de prélever des échantillons d'eau de chaque plateau et de grouper ces échantillons. Si le plateau est large, il peut être nécessaire de prélever un échantillon d'eau à différents endroits du plateau. Il faut concevoir un plan d'échantillonnage pour s'assurer de prélever un échantillon représentatif du lot de production. Quand un lot de production est constitué de dix plateaux ou moins, des volumes comparables d'eau doivent être prélevés dans chacun des dix plateaux pour obtenir un échantillon d'un volume total d'un litre. Par exemple, prélevez environ 100 ml d'eau de chacun des dix plateaux pour obtenir un échantillon d'un litre : environ 125 ml pour un lot de huit plateaux, etc. Si un lot de production comporte plus de dix plateaux, il faut prélever dix échantillons dans l'ensemble du lot de production (p. ex. si le lot de production comporte vingt plateaux, il faut prélever des échantillons dans un plateau sur deux, de haut vers le bas, d'un côté à l'autre et de l'avant vers l'arrière). Les échantillons doivent être placés directement dans un contenant individuel, propre, stérile et préétiqueté.

2. Prélèvement d'échantillons de pousses

Pour l'analyse d'échantillons de pousses, il faut prélever de façon aseptique cinq unités d'échantillonnage d'environ 200 grammes chacune, à différents endroits dans le baril ou sur les plateaux de culture. Les unités d'échantillonnage doivent être prélevées sur l'ensemble du lot de production (p. ex. de haut en bas, d'un côté à l'autre et de l'avant vers l'arrière du baril ou des plateaux). Chaque unité d'échantillonnage de 200 grammes doit être placée directement dans un contenant individuel, propre, stérile et préétiqueté.

Procédures d'analyse microbiologique

Les procédures d'analyse décrites dans la présente ligne directrice ont été sélectionnées pour obtenir le plus rapidement et le plus simplement possible des résultats liés à la présence ou à l'absence de deux bactéries pathogènes importantes, c.-à-d. *Salmonella* spp. et *Escherichia* O157:H7. Les méthodes sont décrites dans le Compendium de méthodes d'analyse de Santé Canada².

En outre, les différences saisonnières ou régionales de qualité de l'eau, de type de semence germée, de facteurs individuels de production de pousses et de variations des conditions

²http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index_f.html

d'échantillonnage et d'analyse peuvent toutes avoir une incidence sur l'efficacité des analyses de dépistage.

Trousses d'analyse :

***Escherichia coli* O157:H7 :**

1. MFLP-87 VIP EHEC. Biocontrol Systems, Inc., Bellview, WA.
2. MFLP-94/95 Reveal *E.coli* O157:H7, Neogen Corp., Lansing, MI.
3. MFLP-91 Tecra UVA, méthode pour *E.coli* O157:H7.
4. Ou toute autre méthode précisée dans le Compendium pour *E. coli* O157:H7.

Salmonella spp. :

1. MFHPB-24 méthode Vidas SLM, Biomerieux, Montréal.
2. MFLP-96 trousse Reveal pour *Salmonella*.
3. MFLP-97 trousse Alert pour *Salmonella*.
4. MFLP-35 Tecra VIA pour *Salmonella*.
5. Ou toute autre méthode précisée dans le Compendium pour *Salmonella*.

Instructions générales de laboratoire

Suivre les instructions précisées dans chaque méthode.

Répartition des échantillons dans des unités d'échantillonnage pour analyse

Eau d'irrigation usée

Un échantillon d'un litre d'eau d'irrigation usée doit être prélevé pour analyse. Deux (2) unités d'échantillonnage de 100 ml chacune doivent être analysées pour la présence d'*E. coli* O157:H7. Deux (2) unités d'échantillonnage de 375 ml chacune doivent être analysées pour la présence de

Salmonella spp. Toute portion d'eau d'irrigation usée non utilisée doit être entreposée au réfrigérateur en attendant que l'analyse soit terminée.

Pousses

Cinq (5) unités d'échantillonnage de 200 g chacune doivent être prélevées pour analyse. Pour chaque unité d'échantillonnage, une unité d'échantillonnage de 25 g doit être analysée pour détecter la présence d'*E. coli* O157:H7 et une unité d'échantillonnage de 25 g doit être analysée pour la présence de *Salmonella*. Toute portion de pousse non utilisée doit être entreposée au réfrigérateur en attendant que l'analyse soit terminée.