



Lignes directrices pour les prélèvements sur les lieux de transformation et le matériel utilisé dans la production de denrées alimentaires, en vue de détecter *Listeria monocytogenes*

Version 3 – 20/08/2012 (date de la version française : 21/12/2012)

Brigitte CARPENTIER et Léna BARRE, LRUE pour *Listeria monocytogenes*,
Laboratoire de sécurité des aliments – Site de Maisons-Alfort, ANSES, France

En collaboration avec :

S. Barbuti	SSICA	Italie
J. Canet Noguera	FECIC	Espagne
H. da Silva Mateus Fernandes Guedes	INRB / LINIA / UITA (LNR Lm)	Portugal
C. Dufour	SILLIKER SAS	France
A. Español Pueyo	Laboratorio de Salud Pública de Huesca	Espagne
A. L. Ferreira Tavares	Laboratório Tomaz	Portugal
L. Gram	Danish Technical University	Danemark
T. Grégori	FICT	France
B. Hickey	Dairy Science Laboratory (LNR Lm)	Irlande
J. Lago	ANFACO-CECOPECA	Espagne
P. Leglise	Laboratoire Départemental de la Côte d'Or	France
A. S. Orfão Ferraz	Globalab-Ensaíos Químicos e Microbiológicos S.A.	Portugal
J. Pardos Bosch	Laboratori de l'Agència de Protecció de la Salut del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya	Espagne
C. M. Pires Gomes	INRB / LINIA / UITA (LNR Lm)	Portugal
N. Sanchez	SOREDAB	France
J. Sanchez Hernandez	Laboratorio de Salud Pública de Salamanca	Espagne
M. Sol	INRB-LINIA-UITA (LNR Lm)	Portugal
V. Stahl	Aérial, Institut technique pour l'industrie agro-alimentaire	France
M. M. Tenreiro dos Santos Monteiro Saraiva	National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge	Portugal
J. Toomas Kramarenko	Veterinary and Food Laboratory (LNR Lm)	Estonie

1 SOMMAIRE

1	Sommaire.....	2
	Avant-propos.....	4
	Introduction	5
2	Champ d'application	6
3	Références normatives.....	6
4	Choix des sites d'échantillonnage	7
5	Moment approprié pour procéder aux prélèvements.....	7
6	Diluants utiles pour humidifier les dispositifs de prélèvement par frottement	9
6.1	Diluants simples	9
6.2	Diluants contenant des neutralisants	9
7	Milieux de culture	10
8	Appareillage et verrerie	10
9	Zone à prélever	11
10	Préparation des dispositifs de prélèvement.....	12
10.1	Écouvillon.....	12
10.2	Éponge, chiffonnette ou compresse tissée ou non tissée.....	12
11	Prélèvement d'échantillons	13
11.1	Méthode avec écouvillon	13
11.2	Méthode avec éponge/chiffonnette/compresse	13
12	Transport des échantillons, conservation, et début de l'analyse.....	14
13	Analyse des échantillons	14
13.1	Méthode avec écouvillon	14
13.2	Méthode avec éponge/chiffonnette/compresse	14
14	Expression des résultats	14
15	Bibliographie	15

AVANT-PROPOS

Sur la base d'une revue bibliographique réalisée par le Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour *Listeria monocytogenes* (LRUE Lm), le LRUE Lm et le réseau des Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) se sont accordés sur le fait que la Norme internationale ISO 18593 décrivant les méthodes de prélèvement sur les surfaces pour la détection et le dénombrement de bactéries sur les lieux de transformation et le matériel utilisé dans la production de denrées alimentaires, ne donne pas suffisamment de recommandations spécifiques à la détection de *L. monocytogenes* (voir l'introduction). Il a donc été décidé que le LRUE Lm rédigerait, en collaboration avec un groupe de travail (GT), des lignes directrices sur ce sujet. Ce GT était composé de 20 membres de 7 États membres de l'UE (EM), trois de ces membres appartenant à un LNR (voir première page).

Ces lignes directrices ont été rédigées sur la base des informations relevées dans la littérature, des contributions des membres du GT et des résultats d'une grande enquête conduite en 2010 sur les pratiques de prélèvements de surface (137 répondants de 15 EM : exploitants du secteur alimentaire, prestataires de service en charge des contrôles d'hygiène, services officiels de contrôle...). Cette enquête a montré qu'il existait une grande variété de pratiques dont certaines ne sont pas recommandées, mettant en exergue le besoin d'un guide européen.

Différents projets de lignes directrices ont été préparés, la première a été soumise à l'appréciation des LNR qui ont consulté, au niveau national, les opérateurs pratiquant des prélèvements de surface. Les projets suivants ont été soumis à l'appréciation des membres du GT.

La version 3 actuelle résulte d'un accord entre tous les LNR réunis lors de leur atelier annuel du 28 au 30 mars 2012. Elle intègre également les commentaires reçus de 3 EM de l'UE (Royaume-Uni, Pays-Bas, Allemagne), dans le cadre d'une consultation des EM lancée par la Direction Générale Santé et Consommateurs (DG SANCO) de la Commission Européenne. La présente version a été adoptée par le Comité Permanent de la Chaîne Alimentaire et de la Santé Animale de la Commission Européenne lors de la réunion du 18 juillet 2012 et par une consultation écrite ultérieure de deux semaines.

INTRODUCTION

Il est maintenant bien établi que les denrées alimentaires prêtes à être consommées peuvent être contaminées, au stade de la transformation, par des sous-types de *Listeria monocytogenes* qui persistent dans les usines de transformation [1]. Le prélèvement systématique d'échantillons sur les lieux de transformation et le matériel utilisé en vue de détecter *L. monocytogenes*, suivant un plan d'échantillonnage bien précis, est donc nécessaire et obligatoire, dans le cadre du règlement (CE) n° 2073/2005 fixant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires [2]. Ces plans d'échantillonnage visent à détecter et éliminer une souche persistante ou, si l'élimination est impossible, à permettre la mise en place de mesures correctives pour éviter la contamination des denrées alimentaires par les bactéries pathogènes. Plusieurs documents d'orientation ont été publiés à ce sujet [3-5]. Un programme d'échantillonnage inefficace ou des techniques d'échantillonnage inefficaces peuvent se traduire par la non-détection de *L. monocytogenes* alors que la bactérie est bien présente. Cette situation empêche la mise en œuvre de mesures correctives et crée une fausse impression de sécurité.

La Norme internationale ISO 18593 [6], qui décrit les méthodes de prélèvement sur les surfaces en vue de rechercher ou de dénombrer des micro-organismes viables, ne donne pas suffisamment de conseils ou de recommandations spécifiques à la détection de *L. monocytogenes*. Les méthodes de prélèvement par frottement (écouvillon et éponge/chiffonnette) sont les seules méthodes qu'il convient d'utiliser pour *L. monocytogenes*. La norme ISO ne précise pas à quel moment devraient être effectués les prélèvements, ni les lieux qui devraient faire l'objet de prélèvements. Les présentes lignes directrices visent à pallier cette insuffisance, dans le cadre de l'application de l'article 5, paragraphe 2, du règlement (CE) n° 2073/2005 [2]. Par ailleurs, il a été décidé de ne pas traiter le dénombrement de *L. monocytogenes* sur les surfaces, pour les raisons suivantes. En premier lieu, un frottis ne détache pas la totalité des cellules bactériennes et la proportion de cellules détachées est inconnue et variable. En second lieu, les cellules de *L. monocytogenes* ne sont pas uniformément réparties sur une surface, et les comparaisons de résultats obtenus à partir de zones de superficies différentes ne seraient donc pas pertinentes.

Après prélèvement, l'analyse des échantillons sera effectuée suivant la méthode de la Norme EN ISO 11290-1 ou d'autres méthodes validées, conformément à l'article 5 du règlement (CE) n° 2073/2005¹. Dans le cas où un nombre « excessif » d'échantillons positifs pour *L. monocytogenes* (voir section 5) serait retrouvé au cours de campagnes

¹ Conformément aux dispositions du règlement (CE) n° 2073/2005, le présent document concerne uniquement la détection de *L. monocytogenes*. Toutefois, il pourrait être intéressant de savoir que, comme l'indique le Codex Alimentarius [3], « des programmes de contrôle efficaces peuvent également porter sur *Listeria* spp; leur présence étant un bon indicateur de conditions favorables à la présence potentielle du *Listeria monocytogenes* ».

d'échantillonnage successives sur un même lieu de transformation alimentaire ayant déjà mis en œuvre des mesures de prévention, il sera nécessaire de procéder au typage d'isolats de *L. monocytogenes* par des techniques moléculaires basées sur la restriction de l'ADN telles que la PFGE (électrophorèse en champs pulsé) et la fAFLP (polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) ou basée sur l'amplification par PCR telle que la MLVA (Analyse de variation du nombre de motifs dans des répétitions en tandem (VNTR)) pour déterminer si les isolats appartiennent à un seul clone, qui serait donc persistant.

2 CHAMP D'APPLICATION

Les présentes lignes directrices précisent où, comment et quand effectuer des prélèvements par frottement en vue de détecter *L. monocytogenes* sur les surfaces des lieux de transformation et du matériel utilisé dans la production de denrées alimentaires prêtes à être consommées.

REMARQUE 1 : les surfaces des lieux de transformation et du matériel utilisé ne sont pas les seuls endroits à surveiller ; le plan d'échantillonnage devrait également inclure les auxiliaires technologiques (tels que l'air comprimé, la glace, la saumure, l'eau, l'eau d'évacuation), dont les techniques d'échantillonnage ne sont pas couvertes dans le présent document.

REMARQUE 2 : aucun conseil ne sera donné ici sur la fréquence de l'échantillonnage, le nombre de sites d'échantillonnage, le bien-fondé de regrouper les échantillons ou la nécessité de changer régulièrement de sites d'échantillonnage. Tous ces paramètres doivent être choisis au cas par cas, selon une approche fondée sur une analyse de risque.

REMARQUE 3 : les présentes lignes directrices n'ont pas pour objet d'évaluer l'efficacité de nettoyage et de désinfection.

3 RÉFÉRENCES NORMATIVES

Les documents de référence suivants devraient être utilisés pour l'application du présent document.

ISO 6887-1 Microbiologie des aliments – Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

ISO 7218 Microbiologie des aliments – Exigences générales et recommandations

ISO 11290-1 Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* – Partie 1 : Méthode de recherche

ISO/TS 11133 Microbiologie des aliments – Lignes directrices pour la préparation et la production des milieux de culture

4 CHOIX DES SITES D'ÉCHANTILLONNAGE

L. monocytogenes peut être présente sur des surfaces visuellement propres, mais on la retrouve le plus souvent sur des surfaces humides et souillées où la bactérie est capable de se développer et de persister [1, 7]. Les endroits difficiles à atteindre tels que les trous ou les crevasses dans les matériaux fibreux, poreux, rouillés ou creux, ou encore le matériel difficile à nettoyer, sont des niches potentielles qui devraient faire l'objet de prélèvements. Il peut être difficile de prélever des échantillons dans les zones inaccessibles où des débris alimentaires peuvent s'accumuler. Ces zones devraient donc être analysées après démontage du matériel par l'équipe de maintenance. Il n'est pas recommandé d'utiliser le rinçage comme technique de prélèvement dans de telles zones, car le rinçage n'a pas la même efficacité que les méthodes par frottement pour détacher les micro-organismes des surfaces.

Les prélèvements devraient être prévus fréquemment dans les lieux où le produit alimentaire est exposé à une contamination, mais il peut s'avérer intéressant de prélever également des échantillons de surface, à une moindre fréquence, dans les lieux où le produit n'est pas exposé à une contamination (lieux d'entreposage).

Le choix d'un lieu d'échantillonnage doit se faire en fonction des données historiques propres à chaque usine et après un examen minutieux du procédé de fabrication. Afin de sélectionner les lieux d'échantillonnage, une liste non exhaustive de lieux est donnée ci-dessous [4, 5, 8] :

- Surfaces qui ne sont pas en contact avec les aliments : caniveaux, sols, flaques d'eau sur le sol, instruments de nettoyage, zones de lavage, appareils de pesage intégrés au sol, tubes, rouleaux creux de tapis convoyeurs, transporteurs, armature d'équipements, panneaux intérieurs d'équipements, plateaux d'égouttage de condensat, chariots élévateurs, diables, chariots, roues de chariots, corbeilles à ordures, congélateurs, machines à glace, ailettes de refroidissement dans les condenseurs, tabliers, murs et parois, plafonds, points froids où l'eau se condense, isolant humide dans les murs ou autour des tuyaux et des unités de refroidissement, joints en caoutchouc autour des portes, notamment dans les équipements frigorifiques, intérieur des aspirateurs, poignées de porte et robinets.
- Surfaces en contact avec les aliments : bandes transporteuses, trancheuses, planches à découper, découpeuses, trémies, déchiqueteuses, malaxieuses, éplucheuses, collecteurs, matériel de remplissage et d'emballage, conteneurs, autres ustensiles, gants non jetables.

5 MOMENT APPROPRIÉ POUR PROCÉDER AUX PRÉLÈVEMENTS

La détection de *L. monocytogenes* peut être difficile si les échantillons sont prélevés immédiatement ou peu de temps après le nettoyage et la désinfection. Il se peut que les cellules, endommagées par les agents chimiques employés pour le nettoyage et la désinfection, soient encore vivantes, mais non cultivables, et par conséquent difficiles à détecter [8]. Par ailleurs, il se peut également que des cellules subsistent dans des niches malgré le nettoyage et la désinfection et ne soient donc pas détectées, alors qu'elles deviennent plus accessibles aux prélèvements une fois délogées sous l'effet des vibrations du matériel et/ou du contact des niches avec les aliments et les liquides pendant la production [9].

Par conséquent, pour augmenter la probabilité de détecter une souche persistante, le prélèvement devrait être effectué au cours des étapes de transformation, après au moins deux heures de production ou à la fin d'un cycle de production, autrement dit avant nettoyage et désinfection [4, 8-11]. Dans les lignes de transformation où les produits alimentaires sont fabriqués à partir de matières premières crues qui ne sont pas soumises à un traitement réduisant la concentration de micro-organismes (fromages au lait cru par exemple), *L. monocytogenes* dans un échantillon de surface prélevé au cours du cycle de transformation peut aussi bien provenir de ces produits crus que des endroits où des cellules de *L. monocytogenes* peuvent persister dans l'environnement de transformation des denrées alimentaires. Dans les usines où l'on transforme des produits pasteurisés ou des matières premières crues rarement contaminées (fromages au lait pasteurisé par exemple), une souche de *L. monocytogenes* décelée dans un échantillon de surface devrait être considérée comme une souche de *Listeria* persistante.

Lorsque des denrées alimentaires qui pénètrent dans un lieu de transformation sont des denrées crues ou des denrées qui ont été traitées pour diminuer leur charge microbienne (par pasteurisation, microfiltration, etc.)², les exploitants du secteur alimentaire devraient, dans le cadre de leur plan HACCP, établir le nombre acceptable d'échantillons positifs, qui peut être fixé pour la recherche de *L. monocytogenes*, ceci à la fois sur les surfaces en contact avec les aliments et également sur les surfaces qui ne sont pas en contact avec les aliments. Des mesures correctives devront être mises en œuvre, conformément au plan HACCP des exploitants, lorsque le nombre préétabli d'échantillons positifs sera dépassé³. Lors de la transformation de matières premières crues, il est bien évident que des prélèvements après nettoyage et désinfection ou en début de production peuvent s'ajouter à ceux pratiqués en cours de transformation. Cependant, l'absence de détection de *L. monocytogenes* dans un prélèvement réalisé après nettoyage et désinfection peut

² Les denrées alimentaires et les ingrédients devraient être analysés conformément au plan HACCP.

³ Le nombre acceptable d'échantillons positifs pourrait être de zéro lorsque les denrées alimentaires pénétrant dans les lieux de transformation ont subi un traitement pour diminuer leur charge microbienne.

entraîner un faux sentiment de sécurité. Inversement, la détection de *L. monocytogenes* sur des surfaces en contact avec les aliments après nettoyage et désinfection témoigne d'une sérieuse insuffisance des procédures de nettoyage et de désinfection.

Lorsque la fréquence des prélèvements n'est pas quotidienne, ces prélèvements ne devraient pas être effectués systématiquement le ou les mêmes jours de la semaine. Il peut être pertinent de prélever des échantillons après un entretien normal du matériel, après des réparations effectuées sur le matériel, après un montage de pièces ou après une augmentation de la production, étant donné que toutes ces opérations peuvent accroître le risque d'une contamination par *L. monocytogenes*.

6 DILUANTS UTILISES POUR HUMIDIFIER LES DISPOSITIFS DE PRÉLÈVEMENT PAR FROTTEMENT

6.1 DILUANTS SIMPLES

Dans les zones faciles à atteindre qui font l'objet de prélèvements pendant ou à la fin de la production, il convient d'utiliser des diluants simples ne contenant pas de neutralisant, afin d'humidifier les écouvillons et tout autre matériel de prélèvement par frottement.

Les diluants recommandés sont les suivants : eau peptonée à 1 g/l, eau peptonée salée ou solution de Ringer diluée au quart, répartis dans des tubes ou des flacons, et stérilisés pendant 15 min à 121 °C.

Les diluants tamponnés au phosphate ne sont pas recommandés pour une utilisation sur des cellules bactériennes stressées. Les conditions hostiles qui règnent dans les lieux de transformation alimentaire (sel, acide, produits de nettoyage et de désinfections, etc.) engendrent un stress bactérien et les diluants de ce type peuvent avoir un effet néfaste sur la cultivabilité des cellules bactériennes [12].

De même, il est recommandé de ne pas utiliser de diluant contenant du neutralisant en l'absence de désinfectant résiduel sur la surface à analyser. Un neutralisant utilisé pour inactiver un désinfectant résiduel peut avoir un léger effet néfaste sur les cellules bactériennes et un tel effet serait probablement amplifié en présence de cellules stressées. De fait, il a été montré que les neutralisants réduisent le taux d'isolement de *Salmonella* dans des échantillons de surface prélevés sur des sites de production [13].

Le bouillon de Fraser ou le bouillon Fraser demi ne devraient pas être utilisés à la place d'un diluant, car ils pourraient favoriser le développement de *L. monocytogenes* dans le site de production.

6.2 DILUANTS CONTENANT DES NEUTRALISANTS

Dans les zones où la présence de résidus de désinfectants est prévisible, ou lorsque des échantillons sont prélevés immédiatement après désinfection, il convient d'utiliser des diluants contenant des neutralisants pour humidifier les écouvillons ou tout autre matériel de prélèvement par frottement.

Lorsque des composés chlorés ou libérant du chlore sont utilisés, le neutralisant choisi devrait être le thiosulfate de sodium. Pour d'autres substances actives, un certain nombre de neutralisants sont disponibles (voir EN 1276 [14], EN 1650 [15], EN 13697 [16] et EN 13704 [17]) mais aucun d'entre eux ne convient pour la totalité des désinfectants (pas de neutralisant « universel ») [18]. Un diluant neutralisant pouvant être utilisé dans la plupart des situations est décrit dans le tableau 1. Il conviendra de le répartir dans des tubes ou des flacons, et de le stériliser pendant 15 min à 121 °C.

Tableau 1 : Diluant neutralisant qui peut être utilisé dans la plupart des situations (selon l'ISO 18593 [6])

Constituant	Conc.
Monooléate de sorbitane (Polysorbate 80)	30 g/l
Lécithine	3 g/l
Thiosulfate de sodium	5 g/l
L-Histidine	1 g/l
Saponine	30 g/l
Peptone	1 g/l
Chlorure de sodium	8,5 g/l

7 MILIEUX DE CULTURE

Voir la norme EN ISO 11290-1 relative aux milieux de culture.

8 APPAREILLAGE ET VERRERIE

Pour les exigences générales, voir EN ISO 7218.

Pour les exigences propres à *L. monocytogenes*, voir EN ISO 11290-1 et amendement(s).

Équipement de laboratoire de microbiologie habituel et, en particulier, ce qui suit.

8.1. Dispositifs de prélèvement par frottement

Écouvillon, bâtonnet stérilisé à extrémité en coton ou en matière synthétique, conditionné individuellement dans un tube stérilisé. La matière utilisée devrait être, documents à l'appui, exempte de substances inhibitrices.

REMARQUE Pour certains types de surface, les résidus de coton peuvent contaminer les parties internes de ces surfaces après le prélèvement.

Éponge, ou chiffonnette ou compresse tissée ou non tissée, stérilisée puis conditionnée individuellement dans un sac en plastique stérilisé. La matière utilisée devrait être, documents à l'appui, exempte de substances inhibitrices.

- 8.2. **Gants stérilisés jetables (facultatif)**
- 8.3. **Glacière, avec blocs réfrigérants, isolante, capable de maintenir les échantillons entre 1 et 8 °C pendant leur transport jusqu'au laboratoire (voir EN ISO 7218)**
- 8.4. **Papier absorbant stérilisé, capable d'absorber l'eau stagnante (c'est-à-dire les flaques d'eau sur le sol)**
- 8.5. **Agitateur, pour mélanger les liquides dans les tubes**
- 8.6. **Homogénéisateur péristaltique, pour préparer les suspensions initiales par un mouvement péristaltique**

9 ZONE À PRÉLEVER

La superficie des zones échantillonnées devrait être aussi grande que possible afin d'accroître la probabilité de détecter *L. monocytogenes*. A cet égard, il est conseillé de réaliser les prélèvements sur une superficie de 1000 cm² à 3000 cm² (soit 0,1 m² à 0,3 m²) si possible [6, 10, 11], autrement dit lorsque les zones sont dégagées et planes (transporteurs, étagères, etc.).

Lorsque les zones à prélever sont petites et difficiles d'accès (par exemple, intérieur de rouleaux creux, boîtier de moteur), il est préférable d'utiliser un écouvillon.

Lorsque les zones à prélever sont étendues, il est préférable d'utiliser une éponge, une chiffonnette tissée ou non tissée ou une compresse. À la différence des écouvillons, elles peuvent être frottées plus énergiquement sur les surfaces et sont très absorbantes. Il est déconseillé d'utiliser des gabarits ou des règles graduées, car ces outils peuvent transférer une contamination, et/ou leur désinfection peut interférer avec le test ; cependant, les dimensions de la zone prélevée doivent être connues de façon approximative. À cet effet, l'opérateur peut se rappeler que la longueur de l'avant-bras, de l'extrémité du majeur jusqu'au coude (une coudée), est d'environ 45 cm. De même, lorsque les doigts sont entièrement dépliés et écartés, la distance entre l'extrémité du pouce et celle du petit doigt est d'environ 20 cm.

Les dimensions de la zone prélevée devraient être constantes, de façon à pouvoir suivre les évolutions au cours du temps.

10 PRÉPARATION DES DISPOSITIFS DE PRÉLÈVEMENT

Aucun matériel ayant séjourné dans un laboratoire de microbiologie ne devrait être introduit dans une zone de production de denrées alimentaires, pour éviter tout risque d'introduction de contaminations.

Le matériel destiné au prélèvement d'échantillons de surface et les vêtements de protection devraient être entreposés et manipulés à l'écart des opérations du laboratoire, notamment des locaux consacrés à l'analyse des pathogènes.

Les opérateurs devraient s'assurer qu'aucun objet utilisé pour le prélèvement d'échantillons n'est laissé dans la zone de production. À cet effet, le comptage de ces objets avant et après le prélèvement est recommandé.

10.1 ÉCOUVILLON

Un écouvillon peut être utilisé à l'état sec ou humidifié. Dans le cas où la zone à prélever est humide, utiliser un écouvillon sec, et dans le cas où la zone à prélever est sèche, utiliser un écouvillon humidifié. Dans le cas où le prélèvement doit se faire dans un lieu humide ou sec où l'on s'attend à la présence de résidus de désinfectants (ce qui est fréquent dans les zones difficiles d'accès), il convient d'humidifier l'écouvillon avec un diluant contenant un neutralisant (6.2).

Les écouvillons humidifiés peuvent être préparés en conditions aseptiques au laboratoire avant la campagne d'échantillonnage. Faire en sorte que l'extrémité de l'écouvillon touche légèrement la surface du diluant (6.1 ou 6.2) pour que l'écouvillon ne goutte pas [8]. Puis remettre l'écouvillon dans le tube qui est ensuite hermétiquement fermé pour maintenir à la fois la stérilité et l'humidité.

10.2 ÉPONGE, CHIFFONNETTE OU COMPRESSE TISSÉE OU NON TISSÉE

Avant de commencer la campagne d'échantillonnage, il est possible de préparer au laboratoire les dispositifs de prélèvement humidifiés à l'aide d'un volume approprié et enregistré de diluant stérilisé (6.1 ou 6.2). Ce volume sera fixé de façon à ce que le dispositif de prélèvement ne goutte pas. Après avoir humidifié ce dernier, fermer le sac en plastique d'une manière qui garantira la stérilité et maintiendra l'humidité.

Si l'humidification des dispositifs de prélèvement est effectuée dans le site de production, il n'est pas conseillé d'utiliser de flacons en verre pour conserver le diluant.

11 PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

11.1 MÉTHODE AVEC ÉCOUVILLON

Sortir un écouvillon de son tube, le frotter aussi énergiquement que possible en faisant attention à ne pas le désintégrer et faire tourner l'écouvillon à l'intérieur de la pièce d'équipement ou sur toute autre zone difficile d'accès à prélever.

Remettre l'écouvillon dans son tube d'origine ; reboucher celui-ci de façon à ce que l'écouvillon soit protégé d'une contamination et que son extrémité reste humide jusqu'au moment de l'analyse.

Après le prélèvement, la zone prélevée devrait être essuyée avec une lingette imbibée d'alcool.

11.2 MÉTHODE AVEC ÉPONGE/CHIFFONNETTE/COMPRESSE

Dans le cas où la zone à prélever est trop humide (par exemple, flaques d'eau sur le sol), le liquide en excès devrait d'abord être éliminé en appliquant avec une légère pression du papier absorbant stérilisé.

Ouvrir le sac en plastique contenant le dispositif de prélèvement. Dans des conditions aseptiques, sortir manuellement le dispositif de prélèvement en portant des gants stériles. Alternativement, le dispositif de prélèvement peut être saisi à travers le sac en plastique qui est ensuite retourné pour venir recouvrir la main gantée, comme le montre la figure 1.

Essuyer énergiquement la totalité de la surface choisie, par un mouvement en zigzag, dans deux directions perpendiculaires, en changeant la face du dispositif de prélèvement. Remettre le dispositif de prélèvement dans le sac en plastique et fermer ce dernier de façon à ce que le dispositif soit protégé d'une contamination et qu'il reste humide jusqu'au moment de l'analyse.

Figure 1 : Dispositif de prélèvement tenu à travers un sac en plastique



Après le prélèvement, la zone prélevée devrait être essuyée avec une lingette imbibée d'alcool.

12 TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS, CONSERVATION, ET DÉBUT DE L'ANALYSE

Transporter les échantillons dans une glacière (8.3) entre 1 et 8 °C.

Si nécessaire, conserver les échantillons au laboratoire à 3 °C ± 2 °C. Procéder à l'examen des échantillons aussi rapidement que possible, de préférence au plus tard 24 h après leur réception au laboratoire et dans tous les cas au maximum 36 h après le prélèvement, conformément à la norme EN ISO 7218 (clause 8.3, 3^{ème} paragraphe avant la fin et paragraphe suivant sur les produits périssables). Le laps de temps écoulé avant l'analyse devrait être enregistré et consigné dans le rapport d'analyse.

13 ANALYSE DES ÉCHANTILLONS

13.1 MÉTHODE AVEC ÉCOUVILLON

Ajouter un volume suffisant et au moins 9 ml de bouillon de Fraser demi (voir EN ISO 11290-1) dans le tube contenant un écouvillon de façon à ce que l'extrémité soit complètement immergée dans le bouillon.

Mélanger soigneusement le contenu des tubes contenant des écouvillons à l'aide d'un agitateur (8.5) pendant 30 s.

Procéder ensuite à la détection de *L. monocytogenes* conformément à la méthode de la Norme EN ISO 11290-1 ou à une autre méthode validée.

13.2 MÉTHODE AVEC ÉPONGE/CHIFFONNETTE/COMPRESSE

Ajouter 9 fois le poids du dispositif de prélèvement humidifié, tel que préparé en 10.2, de bouillon Fraser demi (voir EN ISO 11290-1) dans le sac en plastique contenant le dispositif de prélèvement qui doit être entièrement imbibé de bouillon.

Traiter le contenu des sacs dans un homogénéisateur péristaltique (8.6) pendant 1 min.

Procéder ensuite à la détection de *L. monocytogenes* conformément à la méthode de la Norme EN ISO 11290-1 ou à une autre méthode validée.

14 EXPRESSION DES RÉSULTATS

Il convient d'exprimer les résultats en termes de présence ou d'absence de *L. monocytogenes* sur le site d'échantillonnage. Indiquer, si elle est connue, la taille de la zone prélevée.

15 BIBLIOGRAPHIE

- [1] Carpentier B, Cerf O (2011). Review -- Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 1-8.
- [2] Anonyme (2005). Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Journal officiel de l'Union européenne <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R2073:20060101:fr:PDF> consulté le 5 juillet 2012: 34 pages.
- [3] Commission du Codex Alimentarius (2007). Directives pour l'application des principes généraux d'hygiène des denrées alimentaires à la maîtrise de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer. CAC/GL 61-2007. http://www.codexalimentarius.org/codex-home/fr/?id_sta=10740 consulté le 23 mars 2012.
- [4] FDA (2008). Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready-To-Eat Foods; Draft Guidance. US Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodProcessingHACCP/ucm073110.htm> consulté le 31 janvier 2011.
- [5] Tompkin RB, Scott VN, Bernard DT, Sveum WH, Gombas KS (1999). Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy Food and Environmental sanitation*, 19: 551-62.
- [6] Anonyme (2004). ISO 18593. Microbiologie des aliments -- Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons.
- [7] Chasseignaux E, Gerault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters*, 210: 271-5.
- [8] NSW (2008). Food Authority for meat processors and retail meat licensees. *Listeria Management Program NSW/FA/FI034/0809*. http://www.foodauthority.nsw.gov.au/Documents/industry_pdf/listeria-management-program.pdf consulté le 27 janvier 2011: 40 pages.
- [9] Tompkin RB (2004). Environmental sampling: A tool to verify the effectiveness of preventive hygiene measures. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 95: 45-51.
- [10] Mc Namara AM (2007). Maîtrise des contaminations *Listeria* spp des surfaces: expérience aux USA dans le secteur des produits carnés. Colloque Sécurité et qualité des aliments Paris, France, 4 décembre

<http://silliker.atcommunications.com/france/html/actualites/programme07.php>, consulté le 6 avril 2010.

[11] Anonyme (2011). Méthodes d'échantillonnage et d'essai (chapitre 5) dans le Manuel des méthodes de l'hygiène des viandes de l'Agence canadienne d'inspection des aliments.

<http://www.inspection.gc.ca/aliments/produits-de-viande-et-de-volaille/manuel-des-methodes/fra/1300125426052/1300125482318> consulté le 10 février 2012.

[12] Billaux F, Boubetra A, Denis C, Garry P, Jehanno D, Kobilinsky A. Recommendation for the revival of injured microbes with intent to detect and count them (résultats non publiés).

[13] Davies RH, Wray C (1996). Determination of an effective sampling regime to detect *Salmonella* Enteritidis in the environment of poultry units. *Veterinary Microbiology*, 50: 117-27.

[14] Anonyme (1997). EN 1276. Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés dans les domaines de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2/étape 1).

[15] Anonyme (1997). EN 1650. Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide des antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés dans les domaines de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2/étape 1).

[16] Anonyme (2001). EN 13697. Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité. Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2/étape 2).

[17] Anonyme (2002). EN 13704. Désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité sporicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2/étape 1).

[18] Espigares E, Bueno A, Fernández-Crehuet M, Espigares M (2003). Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, 55: 137-40.