



Directives techniques

concernant

l'analyse microbiologique des viandes

du 1^{er} mai 2017

L'Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires (OSAV),

vu l'article 31 alinéa 4 de l'ordonnance du 16 décembre 2016 concernant l'abattage d'animaux et le contrôle des viandes (OAbCV, RS 817.190) et en complément à l'art. 31 al. 1 de l'OAbCV et de l'art. 10, de l'art. 11 let. a et de l'annexe 10 de l'ordonnance du DFE concernant l'hygiène lors de l'abattage d'animaux du 23 novembre 2005 (OHyAb, RS 817.190.1)

édicte les directives suivantes :

I But et champ d'application

1. Cette directive règle le prélèvement des échantillons et les analyses de laboratoire dans le cadre de l'analyse microbiologique des viandes y compris le «test à quatre plaques CEE» élargi (le test à l'égard des substances inhibitrices).

II Echantillons pour l'analyse microbiologique des viandes

2. Les échantillons suivants doivent être prélevés pour l'analyse microbiologique des viandes:

2.1 chez les animaux des espèces bovine et équine:

- 2.1.1 un morceau de muscle compact de 10 cm de long au moins, aussi épais que possible, avec son tissu fibreux et conjonctif:
 - 2.1.1.1 d'un quartier de devant;
 - 2.1.1.2 du quartier arrière situé en diagonale;
- 2.1.2 sur chacun des deux autres quartiers, un ganglion lymphatique non incisé avec le tissu conjonctif et la graisse attenants, à savoir:
 - 2.1.2.1 un ganglion préscapulaire (*Ln. cervicalis superficialis*) ou un ganglion brachique (*Ln. axillaris*);
 - 2.1.2.2 un ganglion sacral interne (*Ln. iliacus lateralis ou medialis*), un ganglion précrural (*Lnn. subiliacus*) ou un ganglion poplité (*Ln. popliteus*);
- 2.1.3 la rate ou un morceau de celle-ci de la grandeur du poing;
- 2.1.4 un rein;
- 2.1.5 chez les animaux de l'espèce bovine le lobe de Spiegel du foie (Lobus caudatus), chez les animaux de l'espèce équine une partie de la même grosseur du bord tranchant;
- 2.1.6 des parties spécifiquement altérées d'organes et de musculature, avec les ganglions lymphatiques correspondants;

2.2 chez les animaux des espèces ovine, caprine et porcine, chez le bétail de boucherie autre que celui des espèces citées, et chez le gibier d'élevage à onglons:

- 2.2.1 un morceau de muscle compact aussi épais que possible, avec son tissu fibreux et conjonctif:

- 2.2.1.1 d'un quartier de devant;
- 2.2.1.2 du quartier arrière situé en diagonale;
- 2.2.2 un rein;
- 2.2.3 un morceau de foie, au minimum la moitié;
- 2.2.4 des parties spécifiquement altérées d'organes et de musculature, avec les ganglions lymphatiques correspondants.

III Préparation des échantillons et envoi

3. La procédure pour le prélèvement d'échantillons se base sur les art. 39 à 53 de l'Ordonnance du 16 décembre 2016 sur l'exécution de la législation sur les denrées alimentaires (RS 817.042).
4. Les échantillons doivent être réfrigérés.
5. Ils ne doivent pas être congelés.
6. Ils doivent être emballés pour l'envoi dans un emballage étanche, fermé de manière à éviter toute fuite.
7. Ils doivent être envoyés dans des récipients pourvus d'une isolation et d'éléments réfrigérants.
8. L'envoi doit s'effectuer le plus rapidement possible.
9. Les échantillons doivent être accompagnés du rapport officiel de prélèvement d'échantillons (annexe 10 de l' OHyAb) emballé proprement.

IV Milieux de culture pour l'analyse microbiologique des viandes

10. Milieu au thioglycollate

Peptone	15,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	5,0 g
NaCl	2,5 g
Thioglycollate de sodium	0,5 g
L-cystine	0,5 g
Agar	0,75 g
Eau dist.	ad 1000 ml

pH final: 7,1±0,2

Dissoudre et stériliser 15 minutes à 121° C. Après refroidissement à env. 45° C, ajouter 10 ml de solution d'hémine et 0,2 ml de solution de vitamine K₁ filtrée stérilement, mélanger et verser en flacons. Le bouillon prêt à l'emploi peut être conservé un certain temps au frais et à l'abri de la lumière, mais doit être régénéré une fois par semaine pendant une heure en étuve anaérobie ou au bain-marie.

Solution d'hémine:	Hémine 0,050 g
	NaOH (1N) 1,0 ml
	Eau dist. ad 100 ml
	Stériliser 15 minutes à 121° C

Solution de vitamine K ₁ :	Vitamine K ₁ 0,15 g
	Ethanol 30 ml
	Conserver au frais et à l'abri de la lumière

11. Bouillon au tétrathionate

Peptone	5,0 g
Sels biliaires	1,0 g
Ca CO ₃	10,0 g
Na ₂ S ₂ O ₃	30,0 g
Eau dist.	ad 1000 ml

pH final: 7,8±0,2

En remuant, amener prudemment à ébullition (ne pas stériliser). Après refroidissement à moins de 45° C, ajouter 20 ml de solution d'iode, mélanger et verser en flacons. Au besoin, on peut ajouter 1 ml d'une solution à 1 pour cent de vert brillant. Le bouillon prêt à l'emploi doit être employé le jour de sa fabrication; le bouillon de base peut être conservé un certain temps au frais et à l'abri de la lumière.

Solution d'iode: KJ Peptone	5,0 g
Solution d'iode: KJ	6,0 g
Eau dist.	20 ml

12. Bouillon Rappaport-Vassiliadis

12.1 Solution de peptone:

Peptone	5,0 g
NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	1,6 g
Eau dist.	ad 1000 ml

Dissoudre en chauffant à 70–80° C. La solution de peptone doit être fraîchement préparée pour chaque emploi.

12.2 Solution de chlorure de magnésium:

MgCl ₂ •6 H ₂ O	400,0 g
Eau dist.	ad 1000 ml

La solution de chlorure de magnésium peut être conservée dans un flacon de couleur foncée pendant une année, à température ambiante.

12.3 Solution de vert malachite:

Vert malachite-oxalate	0,4 g
Eau dist.	ad 100 ml

La solution de vert malachite peut être conservée dans un flacon de couleur foncée pendant six mois, à température ambiante. Pour chaque nouveau lot, examiner si le vert malachite convient.

12.4 Milieu complet:

Solution de peptone	1000 ml
Solution de chlorure de magnésium	100 ml
Solution de vert malachite	10 ml

Mélanger et stériliser pendant 15 minutes à 115° C. Le milieu ainsi préparé peut être conservé dans le réfrigérateur pendant un mois.

13. Gélose au sang

Extrait de coeur de boeuf	10,0 g
Peptone	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	q. s.
Eau dist.	ad 1000 ml

pH final: 7,3±0,2

Dissoudre et stériliser 15 minutes à 121° C. Après refroidissement à 48° C, ajouter du sang défibriné stérile de mouton (concentration finale 5%), mélanger et couler en boîtes.

En lieu et place de cette gélose au sang, on peut employer un milieu gélosé comparable, non sélectif, additionné de sang.

14. Gélose lactosée au bleu de bromothymole

Peptone	7,0 g
Lactose	15,5 g
NaCl	5,0 g
Bleu de bromothymole	0,04 g
Agar	q. s.
Eau dist.	ad 1000 ml

pH final: 7,0±0,2

Dissoudre et stériliser 15 minutes à 121° C.

En lieu et place du milieu gélose lactosé au bleu de bromothymole, on peut employer un milieu gélosé comparable, faiblement sélectif, adapté à la différenciation des colonies fermentant et ne fermentant pas le lactose.

15. Gélose au vert brillant et rouge de phénol

Peptone	10,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
NaCl	5,0 g
Rouge de phénol	0,08 g
Vert brillant	0,0125 g
Agar	q. s.
Eau dist.	ad 1000 ml

pH final: 6,9±0,2

Dissoudre et stériliser 15 minutes à 121° C.

Il faut parallèlement employer un second milieu sélectif éprouvé, pour salmonelles, p. ex.:

- Gélose xylose-lysine-desoxycholate
- Gélose Salmonella-Shigella
- Gélose mannitole-lysine-violet de cristal-vert brillant

V Préparation des échantillons

16. Les tissus conjonctifs et adipeux doivent être enlevés.
17. La surface de l'endroit prévu pour le prélèvement doit être dénaturée par la chaleur sur une profondeur de 1 à 2 mm pour garantir un prélèvement stérile.
18. Le prélèvement s'effectue avec des instruments stérilisés – ciseaux, pincettes ou spatule.
19. Le matériel d'examen doit être conservé au froid jusqu'à la conclusion de l'examen bactériologique. Toutefois, une éventuelle expertise doit en principe être effectuée sur la base de nouveaux prélèvements.

VI Enrichissement et ensemencement des échantillons

20. Enrichissement en milieu liquide

- 20.1 Des échantillons partiels de la musculature, du foie, de la rate et des reins sont placés séparément dans des tubes à 10 ml de milieu au thioglycollate et incubés pendant 18 à 24 heures à 37° C.
- 20.2 Les cultures en milieux liquides montrant une croissance sont repiquées sur gélose au sang et bleu de bromothymole-lactose-agar. Les boîtes sont incubées 18 à 24 heures à 37° C.
- 20.3 Parallèlement, un étalement sur plaque porte-objet, suivi d'une coloration Gram doit être effectué.

- 20.4 En cas de suspicion de germes anaérobies (mise en évidence de bâtonnets gram positifs par la coloration de Gram, culture de matériel d'abcès), on effectue un repiquage supplémentaire sur gélose au sang avec incubation anaérobie pendant 18 à 24 heures à 37° C.
21. Ensemencement direct sur milieux de culture solides
- 21.1 Un échantillon partiel des muscles et des organes est ensemencé de manière appropriée sur une partie des milieux de culture suivants:
- 21.1.1 Gélose au sang
- 21.1.2 Bleu de bromothymole-lactose-agar ou milieux gélosés comparables.
- 21.2 Les milieux sont incubés pendant 18 à 24 heures à 37° C. En cas d'absence de croissance, ils sont ré-incubés 18 à 24 heures à 37° C.
22. Enrichissement pour Salmonella
- 22.1 Un échantillon partiel de chaque échantillon de musculature et du foie, de la rate et des reins est placé dans un récipient contenant 50 ml de bouillon au tétrathionate ou 50 ml de bouillon Rappaport-Vassiliadis.
- 22.2 Après 18 à 24 heures d'incubation à 37° C pour le bouillon au tétrathionate, resp. 43° C pour le milieu de Rappaport-Vassiliadis, un repiquage sur gélose au vert brillant et un milieu sélectif supplémentaire éprouvé pour salmonelles est effectué, qui est à son tour incubé 18 à 24 heures à 37° C.

VII Interprétation des boîtes montrant une croissance

23. Après écoulement du temps d'incubation, les boîtes doivent être examinées quant à la croissance d'agents de maladies infectieuses, de toxi-infections ou d'intoxications, de septicémies ou de germes non spécifiques au coeur de la musculature.
24. Un résultat favorable de l'analyse microbiologique doit permettre d'exclure notamment:
- 24.1 les agents de maladies infectieuses, de toxi-infections ou d'intoxications;
- 24.2 les septicémies;
- 24.3 la présence de micro-organismes non spécifiques au coeur de la musculature;
- 24.4 la présence de micro-organismes non spécifiques dans les organes.
25. Le résultat favorable de l'analyse microbiologique ne suffit pas à lui seul pour déclarer sans autres une carcasse propre à la consommation. Le résultat de l'analyse microbiologique des viandes doit être considéré comme l'un des éléments de l'annexe 7 qui doivent être pris en considération pour décider de l'utilisation de la carcasse.

VIII Test à l'égard des substances inhibitrices et interprétation

26. La musculature et les reins doivent être examinés quant à la présence de substances inhibitrices. A cette occasion, le test à l'égard des substances inhibitrices («test à quatre plaques CEE» élargi) doit être appliqué.
27. Le test est considéré comme positif lorsqu' il y a présence d'une zone d'inhibition de croissance complète d'au moins 2 mm de large (mesuré à l'endroit le plus mince) autour des deux échantillons sur au moins une plaque
28. Les résultats positifs doivent être confirmés en les testant une deuxième fois avec une membrane semi-perméable.
29. En cas de résultat positif pour les reins (zone d'inhibition \geq 2 mm), tous les organes sont à déclarer impropres à la consommation ; la carcasse peut être déclarée propre à la consommation.

30. En cas de résultat positif pour la musculature (zone d'inhibition ≥ 2 mm), la carcasse entière et les parties d'entre-elles sont à déclarer impropre à la consommation.
31. Un résultat négatif au test de recherche de substances inhibitrices dans la musculature et dans les reins ne suffit pas à lui seul pour déclarer sans autres une carcasse propre à la consommation. Le résultat est un élément parmi d'autres qui doit être pris en considération selon l'annexe 7 pour décider de l'utilisation de la carcasse.

IX Entrée en vigueur

Les présentes directives entrent en vigueur le 1^{er} juin 2017.

Berne, le 1^{er} juin 2017

OFFICE FÉDÉRAL DE LA SÉCURITÉ ALIMENTAIRE ET DES
AFFAIRES VÉTÉRINAIRES