



Food and Agriculture  
Organization of the  
United Nations



Centre for Environment  
Fisheries & Aquaculture  
Science

Atelier de formation sur le profilage des risques et l'assainissement des coquillages  
bivalves avec l'appui du Centre de Référence de la FAO

21-23 février 2023

Sénégal

**Données microbiologiques – importance du transport des  
échantillons, de leur réception, des méthodes et de la qualité des  
résultats des analyses**  
**By Louise Stockley**

# Introduction

- Le prélèvement régulier d'échantillons dans une superficie de culture (surveillance) renseigne sur la contamination de la superficie et façonne les contrôles.
- Les données des programmes de surveillance servent à la prise de décisions importantes (ex. classement de la superficie et contrôles).
- Chaque composante du programme doit par conséquent être d'une qualité irréprochable et traçable.



# Prélèvement d'échantillons

- Considérations importantes
  - Protocoles applicables au prélèvement et au transport d'échantillons.
  - Formations des personnes chargées du prélèvement des échantillons officiels, autrement dit, des échantillons utilisés dans le cadre des programmes officiels de surveillance.
  - Emplacement du point d'échantillonnage (en anglais SP pour « Sampling point ») pour illustrer traçabilité et cohérence.
  - Audits réguliers de l'organisme officiel pour vérifier que les protocoles sont suivis.



## Exemple de protocole



### Protocol for the Collection of Shellfish under the Microbiological Classification Monitoring Programme (EU Regulation 627/2019)

Version 10  
May 2020

13 Pages

Document prepared by:	L. Coates	Celas	Classification: Not classified
Document quality checked by:	S. Hart	Celas	Review Date: N/A
Document approved by:	A. Younger	Celas	Date: 06/04/2020

Food Standards Agency London  
0203 333 7149  
shellfish@food.gov.uk

Food Standards Agency Wales  
02920 678643  
shellfish.wales@food.gov.uk

The Centre for Environment,  
Fisheries & Aquaculture  
Science  
Weymouth Laboratory  
Barrack Road  
The Haven  
Weymouth  
Dorset, DT4 8UB

Tel +44 (0) 1305 209600  
Fax +44 (0) 1305 209601  
[www.celias.co.uk](http://www.celias.co.uk)

Celias is an executive agency of  
Defra

# Prélèvement d'échantillons de mollusques bivalves

- Prélèvement exécuté de la même manière que pour les échantillons à des fins commerciales.
- Veiller à ce que les mollusques bivalves soient vivants et de la taille commercialisable.
- Sélectionner chaque mollusque bivalve au hasard, pour éviter l'influence de facteurs environnementaux.
- Prélever les mesures environnementales pertinentes.



L'échantillon ne doit pas être replongé dans l'eau après avoir été prélevé.

Rincer la boue et les débris.

Placer l'échantillon dans deux sachets résistants.

NOM SCIENTIFIQUE	NOM VERNACULAIRE	NOMBRE
<i>Pecten maximus</i>	Coquille Saint-Jacques de l'Atlantique / Pectinidé	12–18
<i>Aequipecten opercularis</i> <i>Chlamys (Aequipecten) opercularis (Linnaeus)</i>	Vanneau	18–35
<i>Crassostrea gigas</i>	Huître creuse du Pacifique	12–18
<i>Ostrea edulis</i>	Huître plate d'Europe	12–18
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Praire/clam	12–18
<i>Tapes philippinarum</i>	Clam japonais/clam de Manila	18–35
<i>Ruditapes decussatus</i>	Palourde franche/palourde croisée d'Europe	18–35
<i>Spisula solida</i>	Spisule solide (ou macre épaisse)	35–55
<i>Mya arenaria</i>	Mye commune (ou mye des sables)	12–18
<i>Ensis</i> spp.	Couteau	12–18
<i>Mytilus</i> spp.	Moule	18–35
<i>Cerastoderma edule</i>	Coque commune	35–55
<i>Donax</i> spp.	Olives de mer	40–70

# Prélèvement d'échantillons d'eau

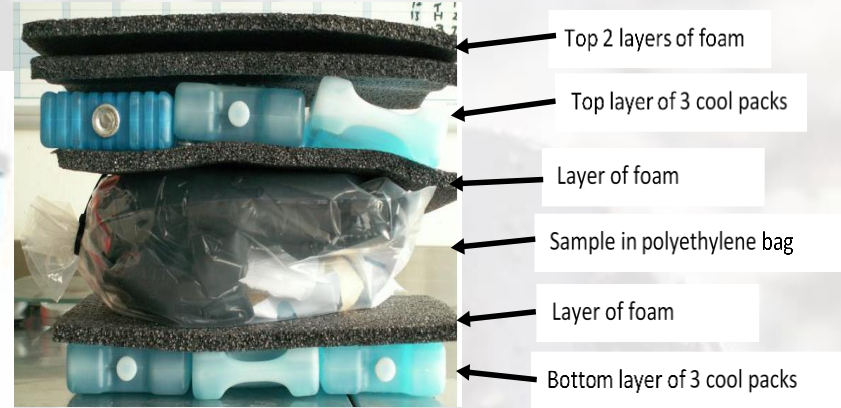
- Prélever l'eau avant les mollusques bivalves ou les échantillons de sédiment, pour limiter la perturbation du sédiment.
- Utiliser un flacon stérile en verre ou plastique.
  - Le transport du liquide peut se faire dans des sachets.
- Prélever l'échantillon au milieu de la colonne d'eau.
  - Le prélèvement de l'échantillon peut s'effectuer à l'aide d'une perche.
  - Refermer immédiatement à fond le couvercle pour éviter les fuites.



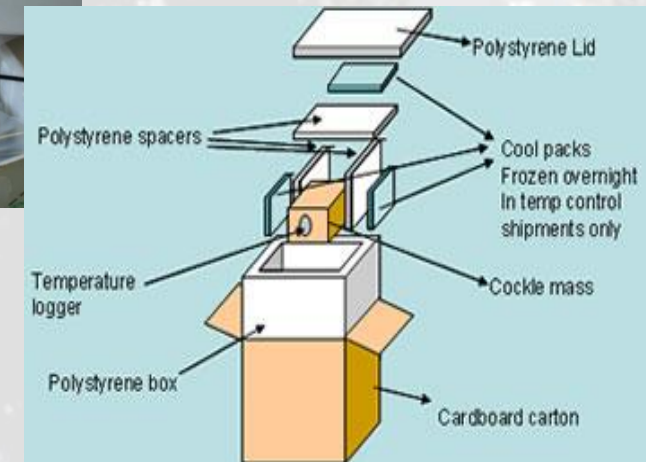
# Transport de l'échantillon

- Les échantillons doivent être transportés dans un conteneur isotherme à température régulée.
- Les conditions de transport ne doivent avoir aucune incidence sur le contenu microbiologique des échantillons.
- Les échantillons doivent être transportés entre 0 et 10°C. Toutefois, si la température de l'eau au moment du prélèvement est supérieure à 10°C, les échantillons doivent arriver au laboratoire à une température inférieure à celle du point de prélèvement.
- Les échantillons doivent être analysés dans les 24 heures après le prélèvement (ce délai peut être prolongé si des études ont confirmé que les échantillons peuvent être laissés plus longtemps).

## Glacière



## Caisse isotherme





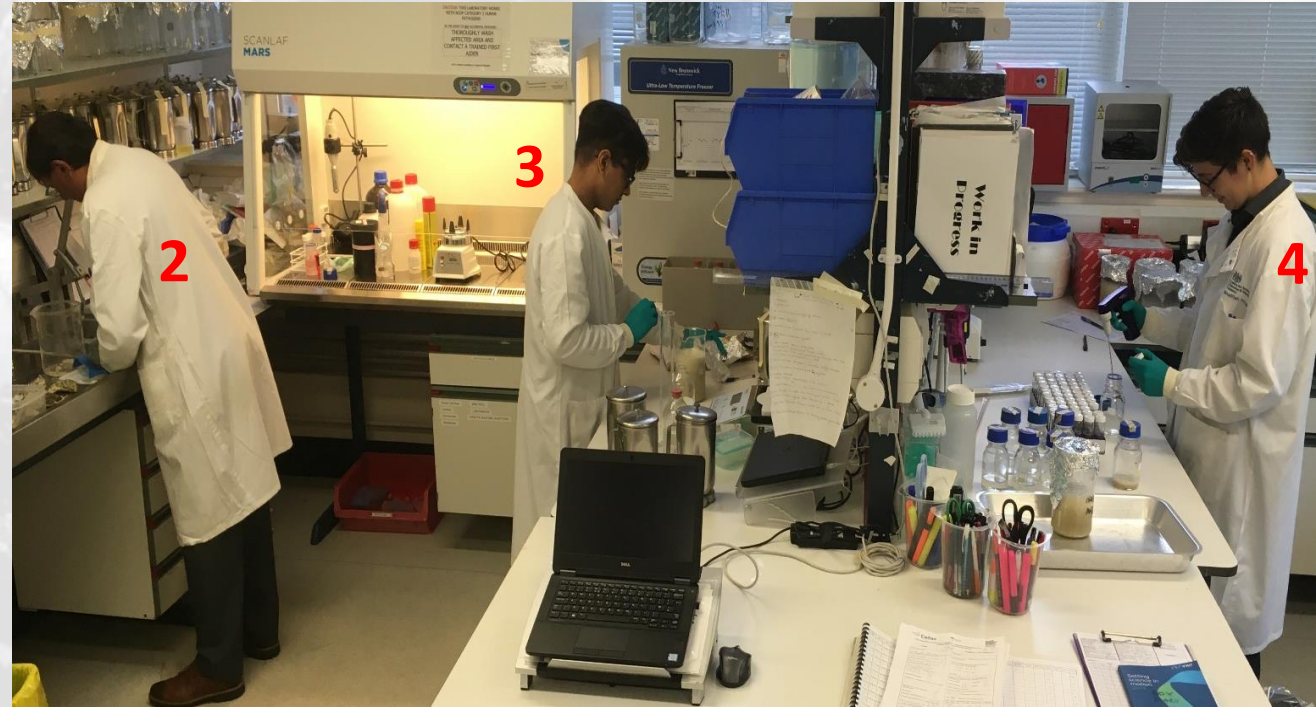
# Réception et analyse en laboratoire

## Réception des échantillons

- Formulaire de soumission d'échantillons et température contrôlés (1)
- Enregistrement des détails des échantillons et attribution d'un numéro d'identification

## Analyse des échantillons

- Les mollusques bivalves sont écaillés (ouverts) (2), homogénéisés (3) et analysés le même jour (4)
- Résultats vérifiés par deux membres du personnel formés





# Réception et analyse en laboratoire

## Réception des échantillons

- Formulaire de soumission d'échantillons et température contrôlés (1)
- Enregistrement des détails des échantillons et attribution d'un numéro d'identification

## Analyse des échantillons

- Les mollusques bivalves sont écaillés (ouverts) (2), homogénéisés (3) et analysés le même jour (4)
- Résultats vérifiés par deux membres du personnel formés

## Compte-rendu des résultats

- Les résultats sont enregistrés sur ordinateur (5)
- Les résultats sont communiqués au client.



# Cefas

Weymouth Laboratory,  
Barrack Road,  
The Nothe,  
Weymouth, Dorset, DT4 8UB.  
Telephone: +44 (0) 1305 206600  
Direct line: +44 (0) 1305 206644



2293

## RESULTS OF MICROBIOLOGICAL EXAMINATIONS OF SHELLFISH HYGIENE SAMPLES

Name of client:

Address of client:

Cefas sample number:

Your reference:

Species:

Date received:

Date of analysis:

<i>E. coli</i> MPN/100g	<i>Salmonella</i> spp. in 25 g	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> in 25 g

SOP 1172 - 'General procedure for receipt, opening and homogenisation of shellfish'

SOP 1175 - 'Enumeration of *Escherichia coli* in bivalve molluscan shellfish using the Most Probable Number technique' was used for the analysis of *E. coli*.

SOP 1176 - 'Detection of *Salmonella* spp. in bivalve molluscan shellfish' was used for the analysis of *Salmonella* spp.. This excludes *Salmonella* Typhi.

SOP 1333 - 'Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in bivalve molluscan shellfish' was used for the analysis of *V. parahaemolyticus*.

Comments



# Méthodes microbiologiques reconnues pour les indicateurs et agents pathogènes.

- Les méthodes indiquées peuvent être utilisées dans le cadre du programme de surveillance; la méthode devra être vérifiée en laboratoire avant utilisation.
- D'autres méthodes peuvent être utilisées, mais doivent être validées par rapport à une des méthodes indiquées.

MATRICE	ORGANISME VISÉ	MÉTHODE
Mollusques bivalves	Préparation des échantillons pour toutes les méthodes bactériologiques	ISO 6887-3
	Préparation des dilutions des échantillons homogénéisés pour toutes les méthodes bactériologiques	ISO 6887-1
	<i>E. coli</i> :	ISO 16649-3 (formule «à cinq tubes»)
	Coliphages ARN F-spécifiques	Protocole générique - Cefas (2020) Méthode Coliphages ARN F-spécifiques de la FDA
	<i>Salmonella</i> spp. (détection)	ISO 6579-1
	<i>Salmonella</i> spp. (quantification)	ISO 6579-2
	Vibrions pathogènes	Voir FAO/OMS (2016)
	Virus de l'hépatite A et norovirus (quantification)	ISO/TS 15216-1
	Virus de l'hépatite A et norovirus (détection qualitative)	ISO/TS 15216-2
Eau	Coliformes fécaux et <i>E. coli</i> présumés par filtration membranaire	ISO 9308-1
	Coliformes fécaux et <i>E. coli</i> présumés par la méthode du nombre le plus probable (NPP)	ISO 9308-2
	Coliphages ARN F-spécifiques	ISO 10705-1
	Méthodes normalisées d'analyse des eaux de surface et des eaux résiduaires (APHA, 1985)	APHA

# Méthode de détection de la bactérie *E. coli*

## – ISO 16649-3:2015

### 1. Préparation des mollusques bivalves

- Dilution des mollusques bivalves 1:3 à 0,1 % de peptone

### 2. Étape de récupération – bouillon au glutamate minéral (modifié) MMGB

- Inoculer 5 tubes x 3 formats, incuber à 37°C (± 1°C) pendant 24 h (± 2 h)

### 3. Confirmation d'étalement – milieu chromogénique

- Inoculation de boîtes TBX avec tubes producteurs d'acide - détection de la présence de l'enzyme β-glucuronidase, incuber à 44°C±1°C pendant 21 h (± 3 h).

### 4. Interprétation des NPP/100 g de chair de mollusque bivalve

- Confirmation d'*E. coli* - β-glucuronidase +ve (colonies bleu-vert)
- NPP généré par combinaison de tubes ex. 2, 0, 0

**ISO 16649-3 est la méthode de référence de l'UE. Cette méthode est la méthode stipulée pour l'exportation vers l'Europe.**

#### Appendix 1:

TABLE 1: *E. coli* Most Probable Number (MPN)

MPN of organisms: table for multiple tube methods using 5 × 1g, 5 × 0.1g, 5 × 0.01g.

1g	0.1g	0.01g	MPN/100g	Category
0	0	0	<18 <sup>1</sup>	1
0	1	0	18	1
1	0	0	20	1
1	0	1	40	2
1	1	0	40	1
1	2	0	61	2
2	0	0	45	1
2	0	1	68	2
2	1	0	68	1
2	1	1	92	2
2	2	0	93	1
3	0	0	78	1

MPN calculation program for the control of shellfish, version 1, dated 2017-01-25, for calculation

More information can be found in the following sheets 'Equations & Info' and 'Examples'. For details see: B. J.

#### General data and data for generating the input tables

Name of experiment	Date of experiment	No. of samples	Max. no. of dilutions

**Note:** A sample/matrix consists of the different dilutions for one target organism (e.g. *Escherichia coli*) with bivalve shellfish matrix. For the Official Control of bivalve shellfish in the EU generally at least 3 dilutions must be analysed.

# Méthode de détection de bactériophages ARN F-spécifiques – ISO 10705-1 :1995

## 1. Préparation des mollusques bivalves

- Dilution des coquillages 1:3 à 0,1 % de peptone

## 2. Préparation de la bactérie hôte

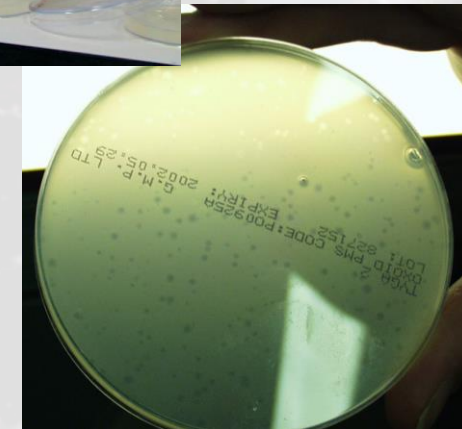
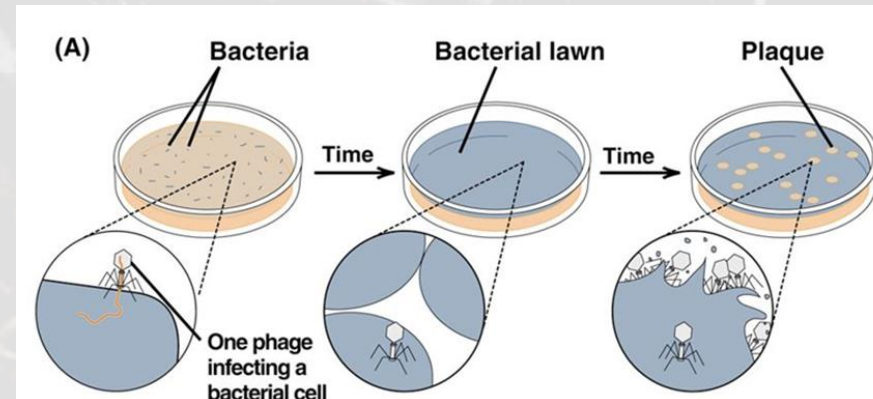
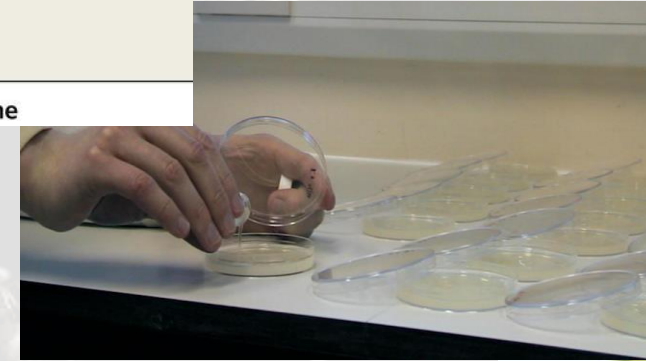
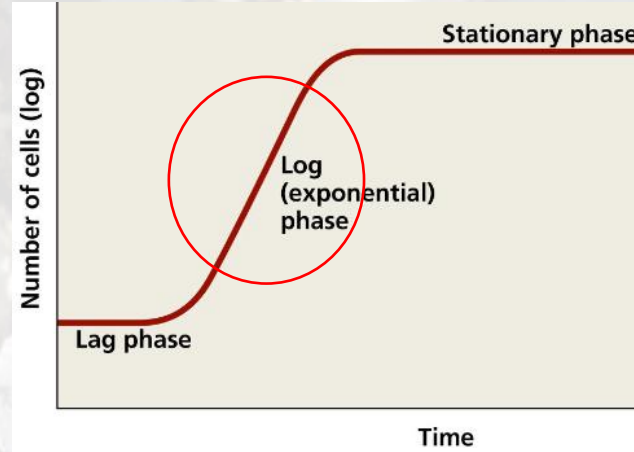
- *S. typhimrium* (WG49) - modifiée génétiquement avec pili sexuels d'*E. coli*
- Culture d'hôte en milieu TYGB pour obtenir  $7 - 40 \times 10^7$  ufc/ml.

## 3. Gélose de recouvrement

- Mélanger la bactérie hôte, la gélose fondue (TYGA) et l'échantillon, former un recouvrement, incuber le bouillon à  $37^\circ\text{C} (\pm 1^\circ\text{C})$  pendant 18 h ( $\pm 4$  h).

## 4. Interprétation de l'ufc/100 g de chair de mollusque bivalve

- Compter les plages – les bactériophages s'accrochent aux pili sexuels d'*E. coli*, les cellules sont lysées au sein du film bactérien.

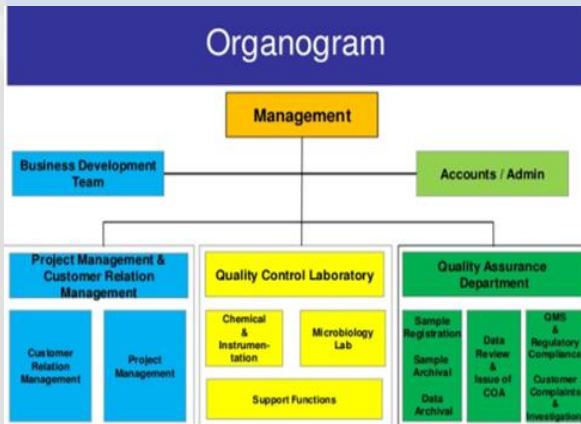


# Accréditation ISO 17025:2017



- L'accréditation, qui confirme la compétence d'un laboratoire et son aptitude à produire des résultats fiables, rassure sur la qualité des travaux entrepris.
- ISO/IEC 17025 - exigences générales confirmant la compétence des laboratoires d'analyse et d'étalonnage.

## Structure générale



## Ressource



## Processus

**Standard Operating Procedure**

**Shellfish hygiene**

**SOP 1175**

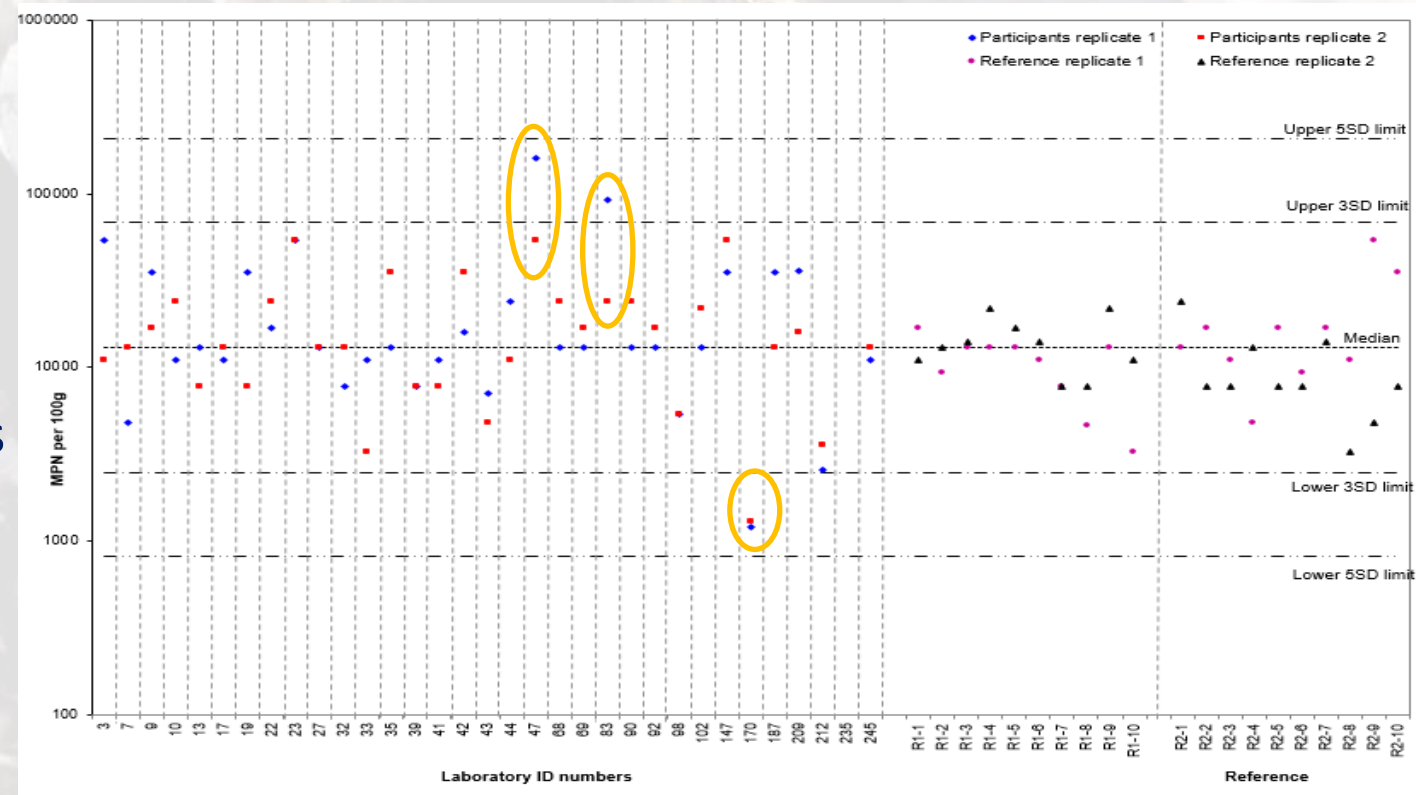
**ENUMERATION OF *ESCHERICHIA COLI*  
IN BIVALVE MOLLUSCAN SHELLFISH  
USING THE MOST PROBABLE NUMBER  
(MPN) TECHNIQUE**

## Système de gestion



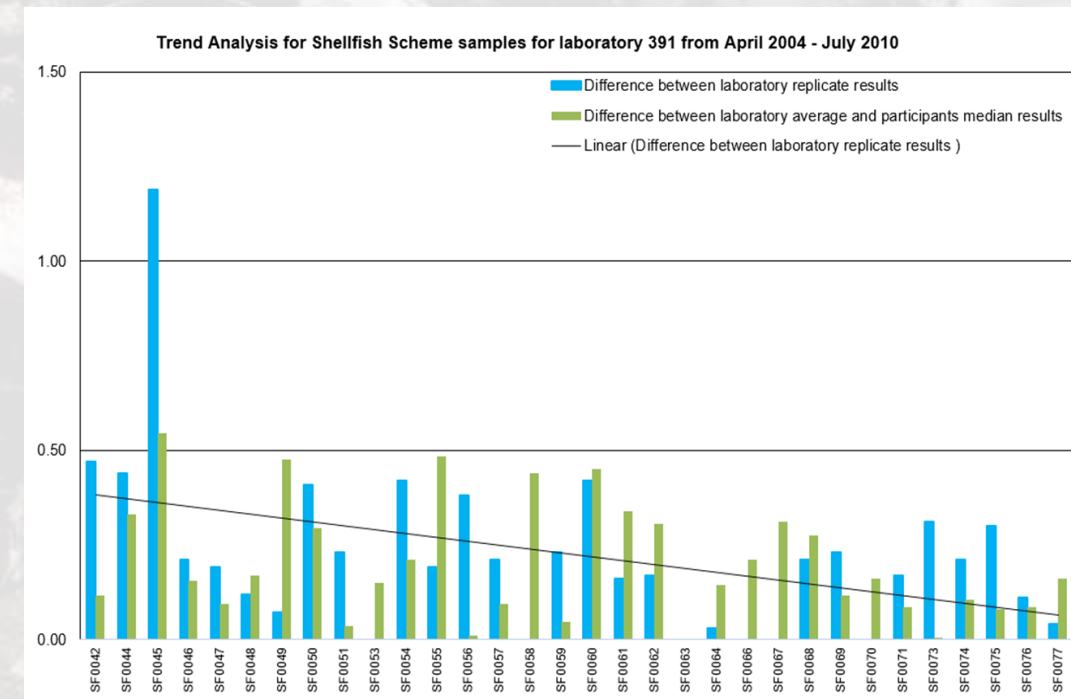
# Essai d'aptitude (PT)

- L'essai d'aptitude (en anglais « proficiency testing » (PT) ou évaluation externe de la qualité (en anglais « external quality assessment (EQA)) est un outil utile pour évaluer la performance, l'exactitude et la fiabilité des résultats d'analyse d'un laboratoire.
- Les échantillons doivent subir les mêmes analyses que les échantillons de routine.
- Les résultats du laboratoire sont comparés à ceux d'autres laboratoires participants.
- Les scores attribués peuvent servir à évaluer la performance sur une seule distribution et dans la durée (en continu).



# Avantages de l'essai d'aptitude

- Fournit une évaluation indépendante de la performance d'un laboratoire.
- Facilite l'identification des domaines potentiellement problématiques.
- La participation est imposée par les organismes d'audit (pour des raisons de qualité et commerciales).
- Sert à la formation du personnel et à l'évaluation continue des compétences.
- Sert à soutenir le développement et la validation des méthodes.
- Le contrôle périodique des échantillons de la matrice facilite l'évaluation des aspects de la méthode que les disques de contrôle de laboratoire (ex. Lenticule™) ne permettent pas d'éprouver.



# Récapitulatif

- Les données générées au cours d'un programme de surveillance sont utilisées pour prendre les décisions importantes en matière de santé publique et doivent être d'une qualité irréprochable.
- Des protocoles décrivant la manière dont un échantillon doit être prélevé, transporté et analysé doivent être disponibles.
- Plusieurs méthodes approuvées à l'international conviennent aux programmes de surveillance, sachant toutefois que certains partenaires commerciaux exigent des méthodes d'analyse spécifiques
- L'accréditation compte parmi les moyens par lesquels un laboratoire peut démontrer la qualité de ses résultats.
- La participation aux essais d'aptitude fait partie des mécanismes servant à démontrer la compétence d'un laboratoire.



A close-up photograph of a large bouquet of blue hydrangea flowers. The flowers are in various stages of bloom, with some showing the intricate details of the petals and the central stamens. The background is softly blurred, showing more of the bouquet and some greenery. The overall lighting is bright and natural, highlighting the vibrant blue color of the flowers.

**Merci**