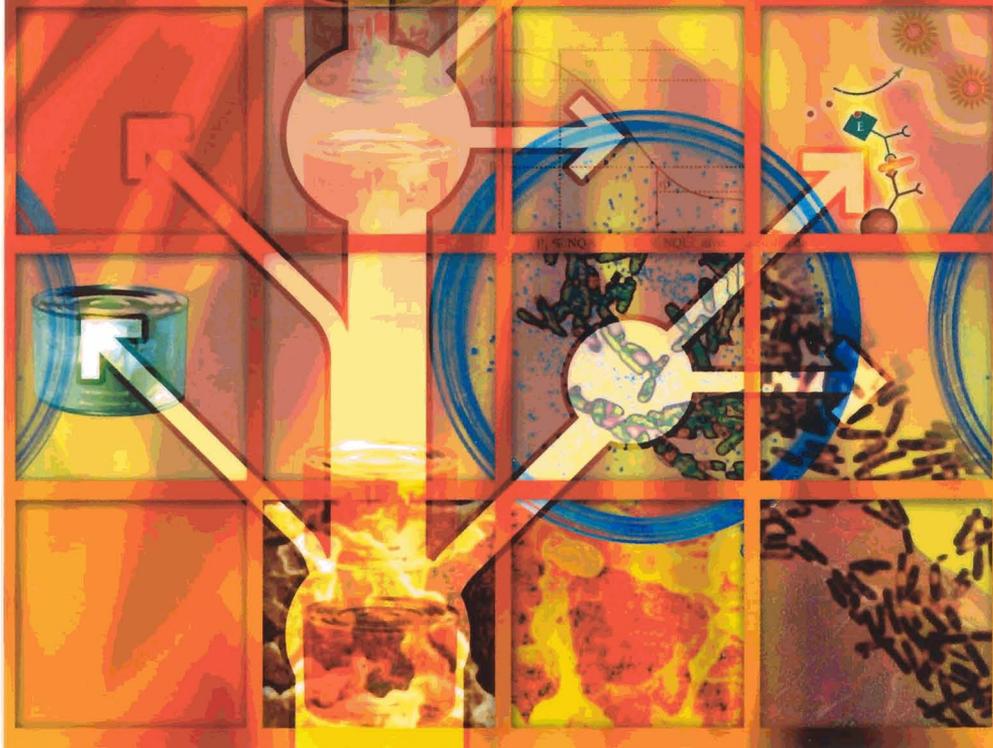




Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires

Caroline Bonnefoy - Françoise Guillet - Guy Leyral - Évelyne Verne-Bourdaï



Sciences des aliments
Série dirigée par Guy Leyral

83970



BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

collection dirigée par J. Figarella et A. Calas

Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires

Caroline Bonnefoy

Professeur à l'école nationale de chimie, physique et biologie à Paris

Françoise Guillet

Inspecteur d'Académie – Inspecteur pédagogique régional – Académie de Versailles

Guy Leyral

Inspecteur général de l'Éducation nationale

Évelyne Verne-Bourdais

Professeur à l'école nationale de chimie, physique et biologie à Paris

Sciences des aliments

Série dirigée par Guy Leyral



SOMMAIRE

CHAPITRE I – LA QUALITÉ DANS L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE

1. Composantes de la qualité 11
2. Construction de la qualité en industrie de production 12
3. Construction de la qualité au laboratoire d'essais et d'analyses microbiologiques 16

CHAPITRE II – CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES DANS LA DÉMARCHE QUALITÉ

1. Les différentes catégories de contrôle en industrie alimentaire 19
2. Niveaux de contrôle microbiologique dans la fabrication 20
3. Laboratoires du contrôle de la qualité microbiologique 22
4. Méthodes mises en œuvre lors des analyses microbiologiques 23
5. Étapes du contrôle d'un produit alimentaire 29

CHAPITRE III – MÉTHODES DE QUANTIFICATION DES POPULATIONS CONTAMINANTES

1. Dénombrement après culture 43
 - Technique de dilution 45
 - Technique d'ensemencement dans la masse 49
 - Technique d'ensemencement en surface 50
2. Dénombrement direct des cellules à l'aide d'un microscope : la cytométrie 64
 - Technique d'utilisation de la cellule de comptage 66
3. Évaluation de l'activité globale 72
 - Manipulation 1** Dénombrement après culture en milieu gélosé de la flore totale aérobique du lait pasteurisé conditionné 79
 - Manipulation 2** Dénombrement après culture en profondeur d'un milieu gélosé de spores de microorganismes anaérobies sulfitoréducteurs dans les algues alimentaires 81
 - Manipulation 3** Dénombrement après culture en surface d'un milieu gélosé de *Staphylococcus aureus* dans le lait sec 83
 - Manipulation 4** Dénombrement par culture après filtration sur membrane des streptocoques du groupe D dans une eau destinée à la consommation humaine 87
 - Manipulation 5** Dénombrement après culture sur Petrifilm de *E. coli* dans les fromages à pâte molle au lait cru et au lait traité thermiquement 89
 - Manipulation 6** Dénombrement à l'aide du système spiral® des coliformes thermotolérants dans la chair à saucisse crue 92
 - Manipulation 7** Dénombrement après culture en milieu liquide des coliformes dans les quenelles fraîches 95
 - Manipulation 8** Dénombrement par méthode DEFT de la flore totale du lait 97
 - Manipulation 9** Contrôle de stérilité d'un jus de fruits par ATPmétrétrie 100

CHAPITRE IV – POPULATIONS CONTAMINANTES ALTÉRANT LA QUALITÉ SANITAIRE ET MARCHANDE

1. Flore totale aérobique mésophile 101
2. Flores indicatrices de contamination fécale 101
3. Flores d'altération de la qualité marchande 106
 - Manipulation 10** Recherche dans les semi-conserves des *Enterobacteriaceae* avec préenrichissement 117
 - Manipulation 11** Dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive dans le camembert par dénombrement des colonies à 44 °C 119
 - Manipulation 12** Dénombrement des microorganismes lipolytiques par culture en surface d'un milieu gélosé, dans le beurre, le lait ou le fromage 122

Manipulation 13	Dénombrement de la flore caséolytique du beurre ou des fromages	124
Manipulation 14	Dénombrement des bactéries lactiques du vin	125
Manipulation 15	Dénombrement et identification des bactéries acétiques du vin	127
Manipulation 16	Dénombrement des microorganismes psychrotrophes du lait liquide	130
Manipulation 17	Dénombrement des <i>Pseudomonas</i> sur et dans les viandes et produits à base de viande	132
Manipulation 18	Dénombrement de <i>Brochothrix thermosphacta</i> sur et dans les viandes et produits à base de viande	134
Manipulation 19	Détermination du temps de réduction décimale à 60 °C d'une souche de <i>E. coli</i>	136
Manipulation 20	Dénombrement de la flore thermorésistante d'un lait cru destiné à la pasteurisation	138
Manipulation 21	Dénombrement en milieu liquide des spores thermorésistantes de <i>Bacillus</i> et <i>Clostridium</i> thermophiles dans les matières premières entrant dans la composition des conserves	139
Manipulation 22	Recherche de <i>Bacillus</i> thermophiles, formes végétatives et spores, dans les conserves	141
Manipulation 23	Recherche de <i>Clostridium</i> thermophiles, formes végétatives et spores, dans les conserves	144
Manipulation 24	Dénombrement des spores butyriques dans les laits destinés à la fabrication des fromages à pâte cuite et dans les fromages	148
Manipulation 25	Dénombrement des levures et moisissures dans les épices et aromates	150

CHAPITRE V – RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES RESPONSABLES DE TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES

1.	Microorganismes responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)	153
2.	Méthodes utilisées pour la recherche et l'identification des bactéries entéropathogènes	168
3.	Recherche et identification des principaux microorganismes et toxines responsables de TIAC .	175
Manipulation 26	Recherche de <i>Salmonella</i> dans une tranche de viande	189
Manipulation 27	Identification des <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes par agglutination sur lame	193
Manipulation 28	Identification des <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques O 157 par agglutination de particules de latex sensibilisées	194
Manipulation 29	Identification des <i>Escherichia coli</i> O157 par la recherche des vérotoxines 1 et 2 (VT1 et VT2)	195
Manipulation 30	Recherche d' <i>Escherichia coli</i> O157 : H7 dans une viande par une méthode directe Blot Elisa	197
Manipulation 31	Recherche et identification des vibrions entéropathogènes dans les coquillages marins	199
Manipulation 32	Recherche de <i>Campylobacter jejuni</i> dans les denrées alimentaires	200
Manipulation 33	Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les produits laitiers par la méthode traditionnelle normalisée	203
Manipulation 34	Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i> dans un produit laitier par hybridation de sondes froides	205
Manipulation 35	Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> dans une gélatine alimentaire	207
Manipulation 36	Recherche de l'entérotoxine staphylococcique dans les produits laitiers par méthode immunoenzymatique	208

CHAPITRE VI – HYGIÈNE DES LOCAUX, DU MATÉRIEL ET DU PERSONNEL

1.	Classement des locaux en zones de sensibilité	211
2.	Aérobiocontamination	212
3.	Hygiène des surfaces et des matériels	219
4.	Contrôle de l'hygiène du personnel	221
Manipulation 37	Utilisation d'un biocollecteur pour le contrôle de l'aérobiocontamination	225
Manipulation 38	Contrôle d'une surface par la technique d'écouvillonnage	227
Manipulation 39	Contrôle d'une surface par la technique d'impression sur gélose	229
Manipulation 40	Mise en évidence de microorganismes présents sur les cheveux, sur les poils de barbe ou de moustache, à la surface de la peau ou sur les mains	230
Manipulation 41	Contrôle de l'hygiène des mains	231

ANNEXES

Annexe 1 - Critères microbiologiques fixés par la réglementation française	233
Annexe 2 - Références des méthodes normalisées ou officielles existant pour les analyses proposées ..	241
Annexe 3 - Exemples d'application des méthodologies de dénombrement présentées au chapitre 4 ..	243
Annexe 4 - Présentation des étapes des analyses décrites dans les manipulations	244

LEXIQUE DES SIGLES	246
---------------------------------	------------

BIBLIOGRAPHIE	247
----------------------------	------------

CHAPITRE I

LA QUALITÉ

DANS L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE

La qualité est définie comme « L'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites... » (*norme ISO/DIS 8402 – Ic X 50-120*) ou comme « La qualité d'un produit ou d'un service est son aptitude à satisfaire les besoins actuels ou futurs de l'utilisateur dans les meilleures conditions de délai et de coût ».

La qualité était autrefois contrôlée, elle est aujourd'hui conçue et assurée en même temps que le produit lui-même. « (...) Le terme qualité n'est pas utilisé pour exprimer un degré d'excellence dans un sens comparatif, il n'est pas utilisé non plus dans un sens quantitatif pour des évaluations techniques (...) ».

1. Composantes de la qualité

Les produits doivent répondre à des exigences assurant la qualité commerciale. Pour être commercialisé, le produit alimentaire doit être conforme aux différents critères de la qualité :

- nutritionnel : composition qualitative et quantitative en macronutriments (glucides, lipides, protides) et micronutriments (vitamines, oligoéléments), disponibilité de ces nutriments dans l'organisme ;
- hygiénique : absence de composés toxiques ou de microorganismes susceptibles de nuire à la santé du consommateur ;
- organoleptique : apparence (forme, couleur), flaveur (arôme, saveur), texture (consistance, résistance).

Pour ces trois critères, il convient de prendre en compte la stabilité du produit, imposant des conditions de stockage pour une bonne conservation ;

- financier : le coût s'oppose souvent aux autres critères, il s'agit donc d'optimiser le rapport coût – qualité ;
- technologique : ce critère prend en compte de nouveaux procédés qui doivent être bien maîtrisés pour permettre d'assurer la qualité.

Pendant de nombreuses années, le contrôle de cette qualité a consisté à vérifier l'innocuité des produits finis, c'est-à-dire leur conformité bactériologique et chimique avec la législation. Cet examen était effectué par le fabricant avant la distribution, et, éventuellement, par des laboratoires officiels de contrôle au niveau des détaillants.

Ce contrôle des produits finis présentait le désavantage majeur de nécessiter l'attente des résultats des analyses avant de pouvoir intervenir sur la chaîne de fabrication, ce qui entraînait un coût supplémentaire. Il devenait souhaitable de pouvoir anticiper d'éventuels résultats non satisfaisants par un procédé mieux adapté, ou d'intervenir sur le procédé par des rectifications en amont du produit fini. Il fallait donc effectuer des contrôles en cours de fabrication.

Les industries de production alimentaire ont donc commencé à développer un système qualité permettant d'assurer un produit fini conforme à la **qualité définie pour ce produit** par l'entreprise elle-même : en fonction de la qualité qu'elle souhaite pour le produit qu'elle fabrique, elle conçoit et réalise son procédé de fabrication en se référant au système qualité qu'elle a elle-même établi.

Aujourd'hui, pour les entreprises, le terme de qualité est donc employé avec un sens différent, il signifie : **assurer la conformité d'un produit ou d'un service par rapport à ce qui a été prévu.**

Le système qualité s'est aussi étendu aux laboratoires d'analyses et concerne le fonctionnement et les résultats fournis par ces laboratoires.

Le but est d'assurer que la fabrication ou les prestations réellement effectuées par l'entreprise sont bien en tous points conformes à ce qui a été choisi et décrit par l'industrie de transformation ou le laboratoire d'analyses et d'essais.

2. Construction de la qualité en industrie de production

La politique qualité dans une entreprise a un objectif principal : s'assurer que les clients ont toute confiance dans les méthodes de travail, tant en ce qui concerne l'organisation que le personnel. Elle vise à assurer un mode de fonctionnement de l'entreprise et non à garantir directement la qualité d'un produit ou d'un service devant donner satisfaction à ce client. Il est évident que l'un ne va pas sans l'autre et que ces deux aspects se complètent comme critères de choix d'une entreprise par un client. Le système qualité consiste à produire des documents d'organisation de la qualité et à s'y référer en permanence : un manuel de qualité, des procédures et des documents d'exécution de la qualité.

Pour les entreprises, il existe des systèmes harmonisés d'assurance qualité rapportés dans les normes de la série ISO 9000 : ISO 9001, ISO 9002, ISO 9003. Ces trois normes présentent un modèle d'organisation de la qualité ; elles seront regroupées en une norme unique : ISO 9000 – 2002.

2.1. Normes ISO 9000

Les industries de production désirant assurer la qualité à leurs clients possèdent un service qualité qui met au point le système de management de la qualité. Ce système se réfère aux normes internationales de la série ISO 9000. Ces normes constituent un modèle de système permettant d'assurer que les produits ou les services sont toujours conçus selon les spécifications fixées par l'entreprise, notamment que les aspects importants de la fabrication sont mis en place et consignés sur des documents.

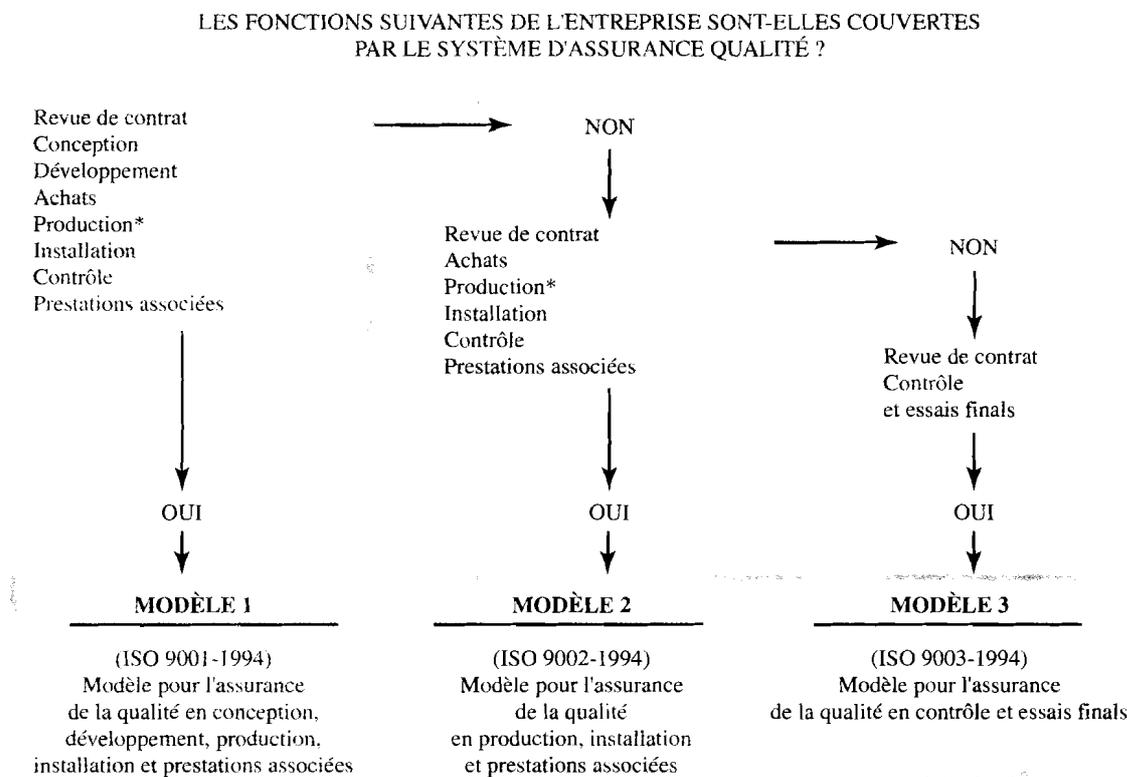
L'activité de l'entreprise détermine le choix de la norme de la série ISO 9000.

Les normes de la série ISO 9000 (Fig. 1) comprennent :

- ISO 9001 : système qualité. Modèle pour l'assurance de la qualité en conception/développement, production, installation et soutien après la vente ;
- ISO 9002 : système qualité. Modèle pour l'assurance de la qualité en production, installation et prestations associées ;
- ISO 9003 : système qualité. Modèle pour l'assurance de la qualité en contrôle et essais finals...

La norme la plus utilisée, compte tenu de son large champ d'application, est la norme ISO 9002. Elle prend en compte les fonctions suivantes :

- les achats ;
- la production ;
- les installations ;
- le contrôle ;
- les prestations associées.



*production s'entend dans le sens de produit ou de service

Fig. 1 – Normes de la série ISO 9000

Une entreprise peut souhaiter faire reconnaître la mise en place de son système de management de la qualité et demander alors une certification à un organisme officiel.

2.2. Certification assurance qualité

L'entreprise qui prend l'engagement de respecter les différents points de la norme ISO 9002 va essayer de faire certifier son système qualité par un organisme certificateur indépendant, reconnu internationalement et sans but lucratif : c'est la « certification qualité ».

L'entreprise certifiée bénéficie de la confiance *a priori* de ses clients, en particulier parce que la probabilité d'un contrôle mettant en évidence le non-respect de la réglementation diminue. L'entreprise doit bien cibler la norme qu'elle vise à appliquer. Sinon, elle risque de se voir refuser une certification, n'ayant pu respecter les objectifs exigés par cette norme.

2.2.1. Association française pour l'assurance qualité

L'Association française pour l'assurance qualité (AFAQ) est un organisme de certification national créé le 30 juin 1988. Il délivre un certificat d'assurance qualité qui constitue un tronc pouvant être complété par d'autres aspects plus spécifiques. Les membres de l'AFAQ, représentatifs de l'ensemble des intérêts nationaux, sont de grands acheteurs (sociétés privées et nationalisées), des représentants des professions, des organismes techniques, l'AFNOR, le mouvement français pour la qualité.

2.2.2. Comité sectoriel agroalimentaire

Les comités sectoriels de certification gèrent les activités de certification des entreprises relevant d'un secteur professionnel déterminé : ainsi, le Comité agroalimentaire (CAL), créé le 5 juillet 1990, effectue la certification des systèmes d'assurance qualité des entreprises qui, dans les filières, fabriquent, fournissent ou manipulent des denrées alimentaires.

Ce comité regroupe trente personnes réparties parmi trois collèges imposés par l'AFAQ et permettant à tous les maillons de la chaîne alimentaire de s'y exprimer. En décembre 1994, le CAL comptait déjà à son actif 200 certificats. Le certificat doit être renouvelé dans un délai maximal de trois ans. Un comité doit respecter en premier lieu le règlement et les procédures générales de l'AFAQ. Il prend en compte les intérêts des entreprises à certifier. Cette certification s'obtient en quelques mois si l'entreprise est à niveau pour les normes ISO 9000.

Les comités de l'AFAQ, pour attribuer la certification AFAQ, fonctionnent eux-mêmes en respectant les normes internationales relatives aux organismes de certification des systèmes qualité : la norme EN 45012.

Les difficultés de mise en place d'un tel comité viennent surtout de la recherche de neutralité de ses membres, compte tenu des intérêts économiques mis en jeu par la certification. Or les membres du comité font eux-mêmes partie d'une entreprise. Cette déontologie est assurée en partie par la non-publication des noms des entreprises d'appartenance des différents membres. Pour définir ses règles de déontologie, l'AFAQ s'appuie sur des organismes d'accréditation internationaux. Par exemple, le comité d'éthique vérifie qu'un organisme de certification n'exerce pas, directement ou indirectement, des activités incompatibles (conseil ou formation notamment) avec son activité de certification. Il doit garantir une confidentialité totale des dossiers traités.

Aujourd'hui, l'AFAQ, en association avec l'AFNOR, propose aux entreprises une certification conjointe AFAQ-ISO 9000 et une certification de produit NF. De même, pour les entreprises disposant d'un laboratoire d'analyses et d'essais intégré, l'AFAQ et le Comité français d'accréditation (COFRAC) ont passé un accord pour diminuer le coût de l'accréditation d'un laboratoire appartenant à une entreprise déjà certifiée « AFAQ-ISO 9000 » par le COFRAC.

2.3. Analyse des risques pour la maîtrise des points critiques : HACCP

2.3.1. Principes généraux du système HACCP

Selon le *Petit Robert*, le risque est un « danger éventuel plus ou moins prévisible ». Or le danger est « ce qui menace ou compromet la sûreté... ». Il s'agit donc d'analyser l'éventualité de survenue d'un événement qui menace ou compromet la sûreté.

Le système assurance qualité et sa certification donnent confiance aux clients quant à l'organisation et à la mise en place de documents relatifs aux procédures diverses de l'entreprise. Mais le respect des normes ISO 9000 ne spécifie pas la sécurité mise en place lors de la fabrication du produit, pour l'obtention d'un produit sain et de « qualité ».

Le système assurance qualité doit donc être complété par d'autres mesures permettant de donner satisfaction aux clients en garantissant la fabrication d'un produit sain et de « qualité ». Pour vérifier ce point, les contrôles ne sont plus seulement effectués comme auparavant sur le produit fini, mais aussi sur la chaîne de fabrication. Les contrôles sur les seuls produits finis sont souvent mal adaptés. L'entreprise cherche à maîtriser les points critiques de sa production en amont du produit fini.

C'est l'objectif de la démarche HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) : analyse des risques pour la maîtrise des points critiques. Ce système vise à contrôler la fabrication du produit depuis l'achat des matières premières jusqu'à la consommation du produit. Le procédé de fabrication peut mettre en jeu jusqu'à 80 étapes différentes et il est impossible de les contrôler toutes. Il s'agit donc de localiser les étapes les plus dangereuses potentiellement pour pouvoir ensuite les maîtriser.

L'analyse des risques permet de déterminer à quel moment il peut y avoir danger potentiel par déviation d'une procédure « normale » (point critique). L'évaluation du risque consiste à déterminer la probabilité d'une conséquence inacceptable de cette déviation. Il faut donc utiliser des connaissances techniques. Un danger est considéré comme inacceptable s'il permet la croissance et la survie d'un organisme pathogène ou la contamination par un tel organisme ou s'il induit la fabrication ou la persistance de toxines microbiennes dans le produit alimentaire ou son environnement. Cette analyse des risques conduit à l'identification des **points critiques à contrôler et à maîtriser** (*control* en anglais se traduit par « maîtrise »). **Un point critique est un lieu, une pratique ou un procédé dont on peut maîtriser les facteurs afin de diminuer les risques potentiels.**

Le système HACCP comprend :

- l'analyse des risques : identification des risques et évaluation de leur gravité (exemple : contamination par *Salmonella* lors de la fabrication du lait en poudre) ;
- la détermination des points critiques où les contrôles sont nécessaires pour maîtriser les risques identifiés (exemple : contamination du lait frais, contamination lors de l'entreposage, contamination lors du transport à la fabrique) ;
- la spécification des critères indicatifs pour l'efficacité du contrôle permettant la maîtrise du risque et des limites de tolérance. Un critère est défini comme limite (de nature physique, chimique ou biologique) ou caractéristique spécifiée (exemple : absence de *Salmonella* dans 100 mL) ;
- l'établissement et la mise en place des procédures de surveillance donnant lieu à la rédaction d'un document ;
- l'exécution d'actions correctives lorsque les critères ne sont pas atteints.

L'application d'une démarche HACCP permet d'intégrer l'hygiène dans une démarche qualité. Les résultats d'une étude HACCP sont spécifiques des produits et du type de chaîne de production.

Ce travail fait appel à toutes les catégories de personnel intervenant au long de la chaîne alimentaire, depuis la fabrication jusqu'à la distribution. Il fait donc participer toutes les disciplines.

En 1992, la proposition de directive européenne sur l'hygiène des denrées alimentaires recommande l'utilisation du HACCP. Il semble maintenant nécessaire d'introduire l'HACCP dans les normes ISO 9000.

C'est un système qui permet d'améliorer l'efficacité dans la fabrication alimentaire en faisant de la prévention, au lieu d'éliminer un produit fini jugé non consommable après contrôle final. Ainsi, tout produit fabriqué est consommable car toutes les étapes où il risquait de se contaminer sont maîtrisées.

2.3.2. Aide à la démarche HACCP : la microbiologie prévisionnelle ou prédictive

La démarche HACCP, pour ce qui concerne l'aspect microbiologique, vise à maîtriser systématiquement l'incidence des différents facteurs de l'environnement susceptibles de favoriser la contamination d'un produit par des microorganismes, la multiplication de ces contaminants ou, à l'inverse, susceptibles de permettre la destruction des microorganismes présents dans un produit alimentaire. Cette démarche peut être rendue plus efficace par la connaissance *a priori* du devenir des microorganismes, qui dépend de leur nature et de certains facteurs de l'environnement.

Il s'agit ici d'anticiper, donc de prévoir comment vont évoluer les microflores dans le produit, ainsi que les risques de dépasser les seuils de tolérance pour les différentes catégories de microorganismes. Cette anticipation (analyse *a priori*), peut permettre de diminuer le rôle des analyses *a posteriori*, qui présentent des difficultés liées aux problèmes statistiques posés par l'échantillonnage. Il est en effet délicat d'obtenir systématiquement un échantillon réellement représentatif lors du contrôle de produits finis, et il n'est pas totalement exclu de « laisser passer » un produit contaminé. Cependant, cette étude *a priori* ne remplace pas le contrôle des produits finis.

L'objectif de la microbiologie prévisionnelle est donc de répondre à un certain nombre de questions concernant le devenir d'un microorganisme dans un produit alimentaire et, notamment :

- d'envisager une modification du produit compatible avec sa qualité marchande (texture, pH...), permettant d'éviter un développement microbien. La qualité et la sécurité du produit seraient alors garanties par sa conception même ;
- d'évaluer un niveau de contamination acceptable aux différents points de la chaîne de fabrication.

La méthode consiste à suivre la croissance, donc à réaliser un certain nombre de modèles cinétiques mesurant l'évolution de la population contaminante en fonction du temps, dans des conditions précises définies par un certain nombre de facteurs. Il faudra ensuite évaluer ces facteurs dans l'aliment et utiliser ces modèles pour « prévoir » l'évolution de la population. Contrairement à la stérilisation qui, elle aussi, fait appel à des modèles cinétiques de destruction par la chaleur, les modèles de la microbiologie prévisionnelle visent surtout à prévoir la multiplication des microorganismes.

Pour suivre et évaluer l'évolution de la population contaminante, on va mesurer trois paramètres qui caractérisent une croissance de microorganismes :

- le temps de latence λ , qui dépend de l'état physiologique initial des microorganismes, de leur concentration initiale, et des caractéristiques de l'environnement. Ce paramètre est très important pour les bactéries pathogènes dont on va chercher à allonger la phase de latence. En effet, les microorganismes responsables d'intoxications alimentaires ne sont en général dangereux qu'à partir de certaines concentrations. Cette concentration peut être atteinte lorsque la bactérie, étant adaptée au « milieu environnant » pendant la phase de latence, se multiplie ;
- le taux de croissance exponentielle μ qui dépend essentiellement de l'espèce microbienne et des caractéristiques de l'environnement. Ce paramètre est essentiel à prendre en compte pour les flores d'altération en lien avec la conservation des produits alimentaires ;
- la croissance maximale N_{\max} , qui dépend essentiellement de la concentration en « facteur nutritif limitant » dans l'aliment.

Les facteurs influençant cette croissance sont ensuite déterminés. Seuls sont pris en compte les facteurs qui peuvent être modifiés. Ce sont, le plus souvent, la température, l'activité de l'eau : A_w , et le pH. Pour chacun des facteurs, la gamme des valeurs, c'est-à-dire l'étendue de la variation possible (champ d'expérimentation) des valeurs que ces facteurs peuvent prendre dans le produit alimentaire considéré, est déterminée.

Enfin, l'expérimentation est planifiée en répartissant les essais (tests de croissance) dans le champ d'expérimentation précédemment fixé. Notamment, les **niveaux** des facteurs (valeurs effectives de ces facteurs), la **distribution** de ces niveaux (progression géométrique ou arithmétique) et la **combinaison** de ces facteurs (plans d'expérimentation) sont choisis.

EXEMPLE

Facteur 1 (pH) :

- valeurs effectives testées pour ce facteur ou « niveaux » de 2 à 6 ;
- distribution : progression arithmétique de 2 (niveaux testés : 2-4-6).

Facteur 2 (température T) :

- valeurs effectives testées pour ce facteur ou « niveaux » : de 15 °C à 25 °C ;
- distribution : progression arithmétique de 5 °C (niveaux testés : 15-20-25).

Ces deux facteurs seront combinés deux à deux selon le plan d'expérimentation suivant :

- à pH 2 et 15 °C ;
- à pH 2 et 20 °C ;
- à pH 2 et 25 °C ;
- à pH 4 et 15 °C ;
- à pH 4 et 20 °C ;
- à pH 4 et 25 °C ;
- à pH 6 et 15 °C ;
- à pH 6 et 20 °C ;
- à pH 6 et 25 °C.

Il faut concevoir des milieux se rapprochant le plus possible du produit considéré mais laissant une possibilité de mesure de la croissance relativement simple. On considère en fait que ce sont essentiellement les facteurs physico-chimiques qui vont avoir un effet majeur sur la croissance, pour peu que la composition en nutriments du milieu soit suffisante.

Les modèles sont ensuite construits à partir des résultats expérimentaux. Une courbe de forme sigmoïde est ajustée sur les points expérimentaux obtenus : $\ln(N) = f(t)$. Une équation mathématique en est déduite, elle donne les paramètres définissant le modèle : λ , μ et, éventuellement, N_{\max} . Cette courbe et son équation représentent le modèle primaire.

Dans un deuxième temps, une relation entre un de ces trois paramètres et les facteurs testés dans le plan d'expérimentation est établie. Ce sont les modèles secondaires.

Ces modèles secondaires représentent :

- la relation entre un paramètre (λ , γ , N_{\max}) et un facteur (température T, A_w , pH), relation représentée par une courbe.

Exemple : $l = f(\text{pH})$;

- la relation entre un paramètre (λ , μ , N_{\max}) et deux facteurs, relation représentée par une série de courbes équivalant à une surface de réponse.

Exemple : $\lambda = f[\text{pH}, T]$ où λ est représenté sur l'axe des ordonnées, pH et T sont représentés sur deux axes des abscisses perpendiculaires.

On trace chaque courbe obtenue ($\lambda = f[\text{pH}]$; $\lambda = f[T]$). La surface de réponse est donnée par la surface définie par ces deux courbes ;

- la relation entre un paramètre (λ , μ , N_{\max}) et trois facteurs, relation représentée par un ensemble de surfaces de réponses pour trois facteurs

EXEMPLE

$$\lambda = f[\text{pH}, T, A_w].$$

Ces modèles, construits à partir de milieux artificiels, seront validés si les écarts entre les valeurs théoriques des paramètres obtenus par modélisation mathématique (λ , μ , N_{\max}) et les valeurs réelles obtenues sur des produits industriels contaminés ne sont pas excessifs.

Après validation, le modèle peut être utilisé pour la prévision du devenir des contaminants, pour des valeurs de facteurs comprises dans la gamme testée en évitant d'extrapoler à d'autres valeurs, compte tenu du caractère empirique de la construction des modèles.

Les problèmes les plus importants qui se posent, pour l'utilisation de la microbiologie prévisionnelle, résident dans le fait que les valeurs des paramètres réellement observées sont très inférieures aux prévisions. Celles-ci sont donc très pénalisantes pour les fabricants, et la microbiologie prédictive par la même trop restrictive. Ceci s'explique par le fait que les mesures ont été effectuées dans des systèmes simplifiés ne prenant pas en compte :

- la structure solide du produit ;
- les phénomènes de compétition entre souches ;
- l'histoire antérieure du microorganisme contaminant.

Il existe une base de données contenant un certain nombre de modèles. Ces informations doivent cependant être relativisées et exploitées par un microbiologiste expérimenté pour éviter de prendre un risque quant au développement des bactéries dangereuses.

3. Construction de la qualité au laboratoire d'essais et d'analyses microbiologiques

Les entreprises sont amenées à faire appel à divers laboratoires pour effectuer des contrôles à des fins réglementaires (législation) ou volontaires (autocontrôles), en vue d'apporter la preuve de la conformité de leurs produits et process à certaines exigences techniques prédéfinies.

À la demande des entreprises, les laboratoires doivent eux aussi adopter une démarche qualité.

La qualité au laboratoire connaît actuellement un développement important et peut faire appel à une certification par un organisme reconnu et indépendant, selon des exigences très précises.

Cette démarche qualité peut faire l'objet d'une accréditation délivrée par un organisme faisant autorité, le Comité français d'accréditation (COFRAC). La demande d'accréditation est une démarche volontaire du laboratoire d'analyses ; cependant, beaucoup de demandeurs d'analyses l'exigent aujourd'hui. Pour pouvoir accéder à différents marchés d'exportation, il convient d'obtenir la reconnaissance au plan international des contrôles effectués en France.

Pour les laboratoires, la norme EN 45001 définit les critères généraux de fonctionnement des laboratoires d'analyses et d'essais. Elle est complétée par le programme 59 pour les analyses microbiologiques.

3.1. Comité français d'accréditation

Le Comité français d'accréditation (COFRAC) a été mis en place en juin 1994, prenant la suite du réseau national d'essais (RNE) et des laboratoires d'étalonnage (Bureau national de métrologie (BNM)).

Le COFRAC est une association organisée en sections : section « essais », section « étalonnage », section « environnement »...

La section essais du COFRAC procède à l'accréditation des laboratoires d'essais et d'analyses. À l'intérieur de cette section essais, la « commission sectorielle agroalimentaire » gère l'accréditation des laboratoires d'essais et d'analyses dans le domaine agroalimentaire.

Un accord multilatéral de reconnaissance réciproque a été signé avec dix autres pays européens dans le cadre de l'EAL (*European Accreditation Laboratories*).

L'accréditation délivrée par le COFRAC valide le respect de certaines exigences :

- **exigences générales d'accréditation**, selon des critères fixés par le guide ISO CEI 25 et la norme NF EN 45001, qui sont répertoriés dans le document 1002 du COFRAC (révision 1 : février 1995) : appliquées à tous les domaines d'essais ou d'analyses, elles doivent être interprétées différemment selon qu'il s'agit d'analyses agroalimentaires ou d'essais mécaniques ;
- **exigences spécifiques pour chaque secteur, secteur agroalimentaire par exemple** :
 - exigences techniques spécifiques qui reprennent en partie les critères de la norme NF EN 45001 en les spécifiant pour les laboratoires du secteur considéré (exemple : secteur agroalimentaire) ;
 - méthodes d'analyses ou d'essais spécifiques à ce secteur (exemple : recherche et dénombrement de microorganismes dans le domaine agroalimentaire).

Pour chaque secteur, la section « essais » du COFRAC rédige des programmes d'accréditation, concernant les exigences spécifiques. Ainsi, la commission sectorielle agroalimentaire de la section essais a mis au point le fameux programme 59 : « Analyses microbiologiques des produits agroalimentaires » (4^e révision en novembre 1995).

3.2. Norme NF EN 45001

La norme NF EN 45001 est identifiée ainsi : « Critères généraux concernant le fonctionnement des laboratoires d'essais ou d'analyses ».

La norme spécifie les critères généraux en matière de compétence technique, sans tenir compte du secteur concerné.

Les différents domaines d'application de cette norme sont les suivants :

- identité juridique ;
- impartialité, indépendance, intégrité ;
- compétence technique ;
- gestion et organisation ;
- personnel (qualification, formation et expérience) ;
- locaux et équipements (équipements et instruments de mesure et d'essai ou d'analyse ; les produits consommables) ;
- procédures de travail (méthodes d'essais système qualité) ;
- coopération :
 - avec le client (pour lui permettre de définir correctement la demande d'essai),
 - avec des organismes d'accréditation,
 - avec d'autres laboratoires,
 - avec des organismes de normalisation.

3.3. Programme 59

Il regroupe les exigences techniques spécifiques auxquelles un laboratoire doit satisfaire, relatives aux points suivants :

- règles générales d'hygiène ;
- compétence du personnel ;
- locaux (une distinction est faite entre les locaux d'essais proprement dits et les locaux annexes) :
 - conception et agencement des locaux d'essais,
 - aménagement des locaux d'essais,
 - entretien et nettoyage des locaux d'essais,
 - environnement des locaux d'essais ;
- équipements et matériels ;
- préparation du matériel et des milieux (cf. norme NF V 08-002) ;
- précautions hygiéniques pendant l'examen (cf. norme NF V 08-002) ;
- préparation de l'échantillon pour essai, de la prise d'essai et de la suspension mère.

Il précise et définit les méthodes d'essais ou d'analyses que doivent pratiquer les laboratoires.

- méthodes normalisées :
 - les méthodes horizontales sont des méthodes de référence (« directives générales ») et des méthodes de routine. Elles sont utilisées pour la recherche d'une catégorie définie de microorganismes sans prendre en compte la spécificité du produit analysé ;
 - les méthodes sectorielles sont propres à certaines familles de produits. Ces méthodes sont obligatoires lorsque les méthodes horizontales ne s'appliquent pas (NF VO4-505 : dénombrement de *Brochothrix thermosphacta* dans la viande).
Le laboratoire a le choix d'utiliser, pour le produit considéré, soit une méthode horizontale, soit une méthode sectorielle.
Les caractéristiques de ces méthodes seront précisées dans le chapitre II (voir chap II – 4.2.3).
- méthodes validées par l'AFNOR : ces méthodes non normalisées sont des méthodes rapides (exemple : Petrifilm Flore totale et Petrifilm Coliformes pour le domaine d'application du lait). Un laboratoire désirant utiliser ces méthodes doit demander conjointement l'accréditation pour la méthode normalisée correspondante.

CHAPITRE II

CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES DANS LA DÉMARCHE QUALITÉ

Ce chapitre présente en premier lieu l'interface entre la production industrielle et les analyses de laboratoire et tente de répondre succinctement aux questions suivantes :

- quelle est la nature des contrôles réalisés au laboratoire ?
- à quels stades de la production les contrôles sont-ils nécessaires ?
- quels laboratoires sont susceptibles d'effectuer ces contrôles ?

Dans un deuxième temps, il envisage plus précisément la démarche de l'analyse au laboratoire :

- quelles méthodes pourront être utilisées pour effectuer ce contrôle ?
- quelle est la démarche du contrôle d'un lot de production ?

1. Les différentes catégories de contrôle en industrie alimentaire

Les contrôles en industrie alimentaire sont de deux types :

- soit ils sont diligentés par des organismes administratifs ou des associations afin de contrôler la conformité à un critère établi, d'une matière première ou d'un produit fini mis sur le marché. Ces contrôles peuvent être officiels (ou réglementaires) et permettent d'autoriser la distribution du produit s'il est conforme ou de sanctionner et d'interdire sa vente dans le cas contraire ;
- soit ils sont décidés au sein de l'entreprise et concernent certaines étapes de la fabrication du produit : ce sont les autocontrôles. Ces autocontrôles sont effectués par des laboratoires internes à l'entreprise ou sous-traités par des laboratoires externes : ils font alors partie de la construction de la qualité dans l'entreprise. Pour les entreprises qui ont une politique qualité, les autocontrôles sont soumis à une réglementation. Ils sont définis à l'article 3 de la directive CEE 93/43, du 14 juin 1993, relative à l'hygiène des denrées alimentaires : l'autocontrôle correspond à l'analyse demandée par le responsable d'un établissement et réalisée dans le cadre d'un plan d'autocontrôle. L'administration donne des instructions pour sa mise en œuvre. Publiées dans les notes de service du *Journal officiel*, ces instructions sont différentes selon la nature du produit. Elles portent :
 - sur la fréquence des prélèvements donnant lieu au contrôle ;
 - sur le moment de la réalisation de ce contrôle ;
 - sur les critères microbiologiques à rechercher ;
 - sur la modalité pour la vérification des critères ;
 - sur la modalité d'interprétation des résultats.

2. Niveaux de contrôle microbiologique dans la fabrication

Les contrôles microbiologiques au cours d'une production industrielle peuvent avoir plusieurs objectifs :

- évaluer la qualité microbiologique d'une matière première à l'aide d'un autocontrôle ;
- maîtriser la qualité et, notamment, la pureté du levain dans le cas d'une production mettant en jeu une fermentation (autocontrôle) ;
- évaluer le niveau de contamination en vue de maîtriser un point critique de contamination ou de multiplication d'un microorganisme sur une chaîne de fabrication : contrôle du produit en cours de fabrication, contrôle des locaux, du matériel et du personnel ;
- évaluer la qualité microbiologique d'un produit fini à l'aide d'un autocontrôle ou d'un contrôle officiel.

La figure 1 situe au cours de la fabrication du produit l'ensemble de ces contrôles.

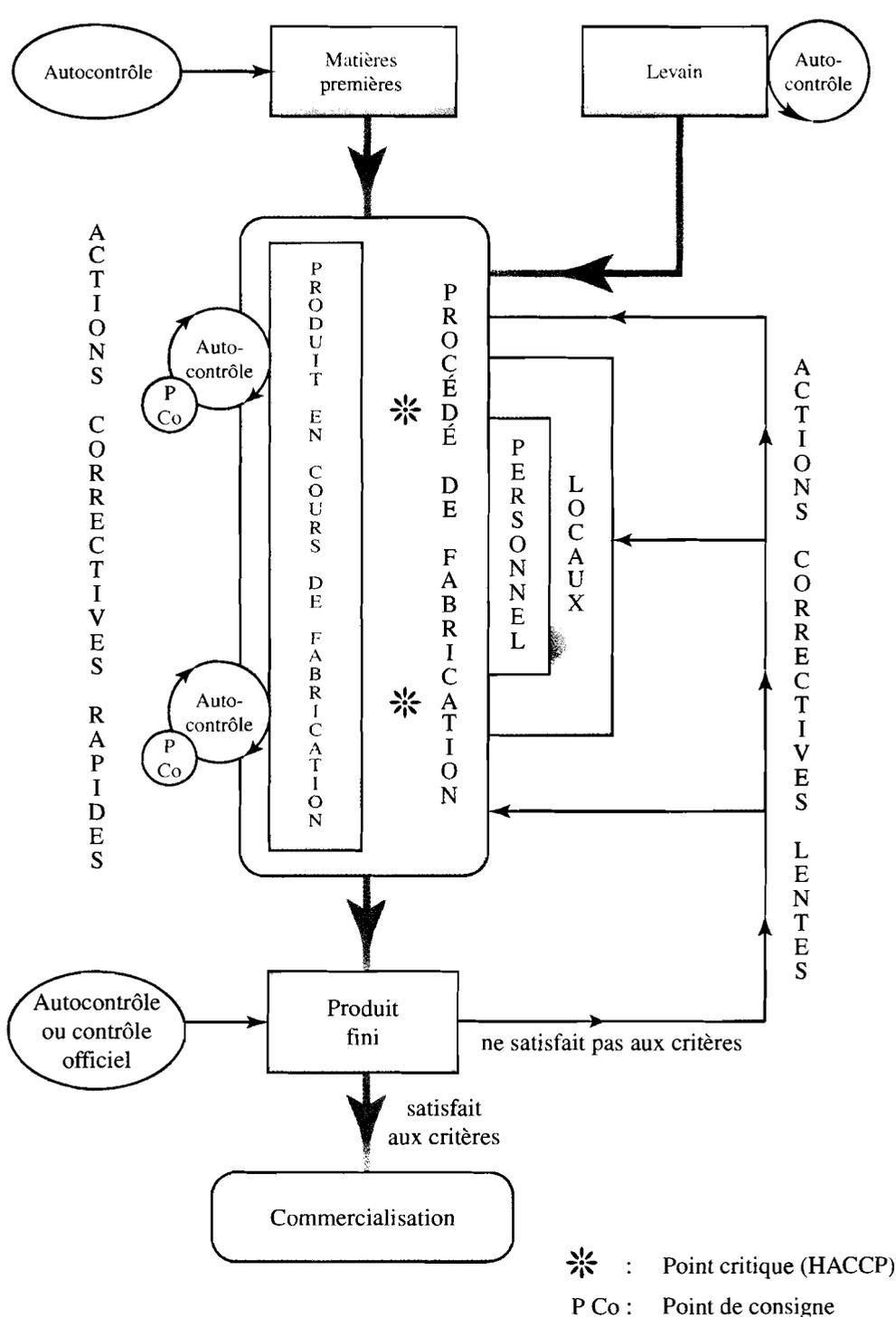


Fig. 1 – Niveaux de contrôle microbiologique en industrie de production alimentaire

2.1. Contrôle des matières premières

Cet autocontrôle effectué par l'entreprise doit permettre de vérifier le niveau de contamination général et la présence de microorganismes particuliers susceptibles de gêner la fabrication ou d'altérer le produit fini lorsqu'ils ne sont pas détruits lors de la fabrication (cuisson, salage...).

La qualité microbiologique des matières premières doit donc être conforme au cahier des charges. Celui-ci pourra être différent pour une transformation mettant en jeu une fermentation ; dans ce cas, on peut tolérer un milieu faiblement contaminé. Actuellement, le développement de l'assurance qualité parmi les fournisseurs de matières premières doit permettre de limiter de plus en plus ces contrôles. Si le fournisseur garantit une qualité ISO 9002 (maîtrise de la production) ou ISO 9003 (conformité des produits livrés), l'entreprise peut alléger les contrôles sur les matières premières.

2.2. Autocontrôles en cours de fabrication

L'objectif recherché ici est de contrôler le procédé de fabrication du point de vue microbiologique pour mieux le maîtriser. Il faut donc localiser les points de la chaîne où il y a le plus de risques de contamination. Cette analyse des points critiques fait partie de l'étude HACCP conduite pour l'ensemble du procédé de fabrication. Ces autocontrôles sont un peu comme les capteurs d'une boucle de régulation. Ils doivent permettre de mettre en évidence rapidement un problème de fabrication afin de pouvoir modifier une partie du procédé et d'améliorer les résultats de l'analyse au « point critique ». Le résultat d'une analyse peut être supérieur au point de consigne (limite acceptable pour ce paramètre : < 100 coliformes/mL, par exemple). Dans ce cas, une action corrective est déclenchée en amont au niveau de la chaîne de production (amélioration du nettoyage et désinfection d'un accessoire de fabrication, par exemple). L'efficacité de l'action corrective est vérifiée par l'obtention d'un résultat devenu satisfaisant pour le paramètre choisi (résultat < 100 coliformes/mL).

Afin que ce système de boucle de régulation puisse fonctionner, il faut que les autocontrôles soient rapides et le moins coûteux possible afin d'être effectués avec une grande fréquence. Il faut, de plus, tester une catégorie de microorganisme représentant un bon indice du risque de contamination à ce stade précis pour le produit considéré. C'est la fréquence élevée des autocontrôles qui permet de déceler le plus tôt possible une défaillance du système de production. Le plus souvent, ces contrôles sont effectués à l'aide de méthodes d'analyse non officielles : les méthodes rapides validées par l'AFNOR. Ces méthodes rapides peuvent être effectuées par un laboratoire interne ou externe à l'entreprise, mais le laboratoire interne fournit des résultats plus rapidement et permet donc une action corrective plus rapide.

2.3. Contrôle du produit fini

C'est un contrôle effectué *a posteriori* pour évaluer la qualité d'un produit après sa fabrication et avant sa distribution. Au titre d'autocontrôle, il est commandité par l'industriel pour valider la production et libérer les stocks pour la distribution. Il ne peut avoir qu'une incidence limitée sur la chaîne de production car les résultats demandent souvent 24 à 48 heures au minimum. Lorsque, au cours de ce contrôle terminal, une défaillance conduisant à la suppression du produit défectueux est détectée, la modification de la chaîne de production entraîne alors des délais d'intervention sur la fabrication du produit beaucoup plus longs que lors d'un autocontrôle en cours de fabrication.

Les contrôles officiels de routine sont effectués de façon systématique pour vérifier la conformité des produits fabriqués aux critères microbiologiques officiels afin de protéger le consommateur. Il s'agit alors d'un contrôle de nature répressive. Dans le cas d'un produit incriminé dans une toxi-infection collective, ce sont les services vétérinaires (sous-direction de l'Hygiène alimentaire SDHA, Centre national d'études vétérinaires et alimentaires CNEVA) ou leurs antennes départementales qui interviennent pour demander l'analyse.

2.4. Contrôle des levains

Lorsqu'un levain est utilisé pour la fabrication, sa qualité est contrôlée avant l'ensemencement de la cuve de fermentation. On cherche à détecter un contaminant, même présent en faible quantité, car, après ensemencement de la cuve, celui-ci serait susceptible de se multiplier plus rapidement que le ferment sélectionné. Les levures peuvent être contaminées par des levures sauvages ou des bactéries lactiques ou acétiques ; les moisissures par des bactéries ; les levains lactiques par des bactéries à développement plus rapide ou par des bactériophages.

2.5. Contrôle de l'hygiène des locaux et du personnel

Enfin, les conditions de fabrication elles-mêmes peuvent être contrôlées. Ceci concerne les locaux, dont la conception même doit assurer de bonnes conditions d'hygiène (contrôle de surface, contrôle de l'air ambiant). Effectués à intervalles de temps réguliers, ces contrôles peuvent faire évoluer le dispositif mis en place dans le cadre de l'assurance qualité. Le matériel de fabrication doit être conçu de façon à éviter les zones de prolifération microbienne (angles morts...). Enfin, le personnel, source majeure de contamination, doit souscrire à des règles d'hygiène très rigoureuses.

3. Laboratoires du contrôle de la qualité microbiologique

3.1. Laboratoires chargés des autocontrôles

Pour la réalisation des autocontrôles, l'entreprise fait appel à un laboratoire qui peut être sur le site ou extérieur au site. Le laboratoire interne d'une entreprise sous assurance qualité ISO 9000 doit être géré selon les mêmes principes que l'entreprise dans son ensemble. Son utilisation est pratique pour l'entreprise, en particulier du fait de la rapidité de son intervention. Le laboratoire interne à l'entreprise peut être accrédité auprès du Comité français d'accréditation, le COFRAC ; il l'est alors, au moins, pour les analyses nécessaires à l'assurance qualité.

Le laboratoire externe, dans lequel sont sous-traitées les analyses de contrôle des entreprises alimentaires, a intérêt à être accrédité auprès du COFRAC. Son intervention garantit l'indépendance des contrôles effectués et c'est un atout important dans les rapports que peut entretenir l'entreprise avec ses clients et l'administration.

Un texte réglementaire publié au *Journal officiel* du 6 janvier 1971 spécifie les qualités requises pour les laboratoires – matériel et personnel – pour obtenir l'accréditation.

L'accréditation COFRAC est soumise à la norme NF EN 45001 (voir chapitre I).

Parmi les laboratoires accrédités effectuant des autocontrôles pour les entreprises, figurent des laboratoires chargés également des contrôles officiels (ou réglementaires).

3.2. Laboratoires chargés des contrôles officiels (ou réglementaires)

Les contrôles officiels sont initiés soit à la suite de plaintes, soit à la suite de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), soit lors des enquêtes habituelles concernant un produit, soit dans le cadre d'enquêtes programmées sur un plan national ou régional. Dans ce dernier cas, il s'agit de réaliser sur un type de produit des analyses concernant un critère précis, et de donner un résultat permettant de vérifier la conformité de ce produit aux exigences fondées sur la loi. Les critères à contrôler portent essentiellement sur les indices de qualité sanitaire. Ces mêmes laboratoires peuvent également se charger de contrôles demandés par des groupements professionnels ou des associations de consommateurs. Les paramètres évalués sont alors soit des indices de qualité sanitaire, soit des indices de qualité marchande. Les contrôles officiels sont menés suivant des méthodes normalisées ou, si celles-ci n'existent pas, selon des méthodes officielles.

Trois types de laboratoires interviennent pour la réalisation de ces contrôles.

3.2.1. Laboratoires de la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF)

La Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF), dépendant du ministère des Finances, administre huit laboratoires inter-régionaux, à compétence régionale pour les analyses courantes et à compétence nationale pour les analyses spécifiques.

Il existe, de plus, des laboratoires agréés dépendant de l'État, qui effectuent les analyses officielles des départements, des municipalités, et des laboratoires privés habilités réalisant dans le secteur privé les analyses prévues dans le cas de réglementation spécifique.

Les laboratoires DGCCRF et les laboratoires agréés effectuent toutes les analyses de composition et tous les contrôles microbiologiques sur les produits les plus variés. La DGCCRF intervient aussi bien dans un atelier industriel de fabrication que dans les locaux d'un artisan fabricant. Elle peut transmettre les résultats des contrôles pratiqués aux services vétérinaires.

3.2.2. Laboratoires vétérinaires – la sous-direction de l'Hygiène alimentaire (SDHA)

Cette sous-direction est rattachée au ministère de l'Agriculture. Ses activités couvrent le contrôle des établissements de production, le contrôle du transport, de la conservation, de la transformation, de la mise sur le marché, de l'utilisation en restauration collective des denrées animales ou d'origine animale ; une extension est possible aux autres denrées.

L'ensemble des critères concernant les denrées animales ou d'origine animale figure dans l'arrêté du 21 décembre 1979 publié au *Journal officiel* du 19 janvier 1980 et modifié le 21 avril 1994. L'ensemble des critères microbiologiques fixés par la réglementation française a été publié en 1996.

La sous-direction administre deux types de laboratoires :

- les laboratoires vétérinaires départementaux, au nombre de 86, qui sont habilités à pratiquer les analyses bactériologiques courantes et des contrôles particuliers adaptés aux besoins locaux. Ils interviennent pour des examens officiels pour tout ce qui concerne les métiers de la bouche, la restauration individuelle et collective. Ils dépendent des conseils généraux des départements. Un nombre croissant de ces laboratoires sont accrédités pour plusieurs types d'analyses qu'ils effectuent couramment ;
- les laboratoires de recherche et de contrôle qui servent de référence et qui sont regroupés au sein du Centre national d'études vétérinaire et alimentaire (CNEVA).

Ils assurent les contrôles spécialisés nécessitant soit une compétence particulière, soit un équipement particulier, et sont également chargés de recherches sur de nouvelles techniques d'analyse, d'enquêtes épidémiologiques, de la mise en évidence des implications de technologies nouvelles sur l'hygiène alimentaire.

3.2.3. Laboratoires de l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER)

Cet institut assure les activités de contrôle de la qualité des productions marines.

Il est placé sous la double tutelle du ministère chargé de la Mer et de celui chargé de la Recherche.

3.2.4. Exigences communes aux laboratoires chargés des contrôles officiels

L'examen doit être pratiqué dans des conditions précises.

L'échantillonnage doit être représentatif.

Le prélèvement doit être adapté, réalisé et identifié selon les normes.

Les renseignements doivent être récupérés sur une feuille de commémoratifs.

Le transport au laboratoire doit être réalisé dans des conditions qui ne peuvent fausser les résultats de l'analyse.

L'analyse est pratiquée par le laboratoire selon une technique normalisée ou validée par l'organisme de normalisation.

Les résultats des analyses microbiologiques doivent être analysés et intégrés à l'ensemble des résultats concernant le produit.

Les résultats doivent être consignés sur des bulletins normalisés.

4. Méthodes mises en œuvre lors des analyses microbiologiques

Selon la nature de l'aliment et le type de contrôle effectué, les paramètres microbiologiques évalués seront différents. Les méthodes dépendent de la nature du microorganisme étudié, des critères fournis pour ce microorganisme et de la nature du produit.

4.1. Méthodes et critères microbiologiques officiels

4.1.1. Présentation des méthodes officielles et rattachement aux critères

Le *Journal officiel* publie dans la série *Hygiène alimentaire* plusieurs fascicules concernant les différentes catégories de produits alimentaires (exemples : viandes et produits à base de viande, n° 1488 II ; produits diététiques et de régime n° 1545).

Dans chaque fascicule, figurent les décrets et arrêtés concernant les différentes opérations liées à la production et à son contrôle, à la transformation, au transport, à l'exportation et à l'importation des produits concernés. Ainsi, l'arrêté du 23 mars 1993, relatif au traitement par rayonnements ionisants des camemberts fabriqués à partir de lait cru se trouve dans le recueil concernant les « laits et produits laitiers ».

De même, ces recueils de textes contiennent des arrêtés fixant les critères d'hygiène et de salubrité auxquels doivent répondre les produits.

Ainsi, l'arrêté du 30 mars 1994 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché se trouve dans le même recueil : « lait et produits laitiers ».

Ces critères fixent les catégories de microorganismes recherchés ou dénombrés, spécifient les conditions de réalisation de l'échantillonnage et fournissent la ou les limites quantitatives pour chaque microorganisme, permettant ainsi de conclure quant à la qualité du produit.

Ces critères sont indiqués dans les tableaux de l'annexe 1.

En annexe des derniers arrêtés relatifs aux critères microbiologiques, ou par une note de service faisant référence à l'arrêté, sont précisées les méthodes d'analyse du produit, devenant officielles après leur publication. Au sein de la Direction générale de la concurrence de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF), existent quarante et une missions, selon les produits et les spécialités, constituées de personnels scientifiques d'origine publique et privée. Ces missions se chargent d'établir les méthodes destinées à être officialisées par arrêté publié au *Journal officiel*.

Ainsi, dans la note de service du 25 novembre 1986 concernant les méthodes d'analyse des beurres, sont précisés :

- les critères microbiologiques ;
- les étapes de l'analyse microbiologique et les protocoles opératoires : échantillonnage, préparation de l'échantillon pour essai, préparation de la suspension mère, réalisation de dilutions décimales, ensemencement, lecture et expression des résultats.

Les laboratoires chargés des contrôles officiels réalisent ces contrôles en utilisant la méthode officielle ou les méthodes normalisées correspondantes et se réfèrent aux critères officiels pour établir leur conclusion.

Depuis l'arrêté du 13 mars 1992, article premier, l'utilisation de certaines méthodes normalisées est devenue obligatoire pour les « (...) laboratoires chargés de concourir à l'application de la réglementation relative à la répression des fraudes concernant les denrées, produits ou boissons destinées à l'alimentation humaine (à l'exclusion des eaux destinées à la consommation humaine et des eaux minérales naturelles) ».

Les méthodes suivantes (voir 4.2. et annexe 2) sont concernées :

- NF V 08-017 (1980) : dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* ;
- NF V 08-010 (1996) : dilutions ;
- NF V 08-014 (1984) : dénombrement de *Staphylococcus aureus* ;
- NF V 08-019 (1985) : dénombrement des *Clostridium perfringens* ;
- NF V 08-021 (1985) : dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* ;
- NF ISO 7954 (1988) : ICV 08-022 : dénombrement des levures et moisissures ;
- NF ISO 7832 (1988) : ICV 08-023 : dénombrement des *Bacillus cereus* à 30 °C ;
- NF ISO 6579 (1990) : ICV 08-013 : recherche de *Salmonella* ;
- NF ISO 4833 (1991) : ICV 08-011 : dénombrement des microorganismes à 30 °C ;
- NF ISO 4832 (1991) : ICV 08-015 : coliformes à 30 °C.

Un certain nombre de ces méthodes normalisées ont été réactualisées depuis l'arrêté de 1992 (annexe 2). Il est possible de se procurer ces textes auprès de l'AFNOR.

Ce sont toutes des directives générales qui peuvent être appliquées pour l'ensemble des produits alimentaires.

Le *Journal officiel* peut même préciser les méthodes sectorielles à utiliser, c'est le cas pour les laits et produits laitiers.

Un avis paru au *Journal officiel* du 23 janvier 1996 prévoit que « Les méthodes mises en œuvre dans le cadre des contrôles officiels, notamment par les services vétérinaires départementaux pour les laits de consommation et les produits à base de lait, prévues dans l'article 3 de l'arrêté du 30 mars 1994 sont les suivantes (voir annexe 2) :

- recherche de *Salmonella* spp :
 - méthode de référence : NF ISO 6579 (dec. 1993, ICV 08-013),
 - méthode de routine : norme AFNOR V08-052 (sept. 1993) ;
- dénombrement de *Staphylococcus aureus* :
 - méthode de référence : AFNOR NF V08-014 (jan 1984),
 - méthode de routine : norme AFNOR V08-057 (1994) ;
- dénombrement des coliformes à 30 °C :
 - méthode de référence : norme FIL 73 A (1985),
 - méthode de routine : norme AFNOR V 08-050 (1992) ;
- dénombrement des microorganismes à 30 °C :
 - méthode de référence : norme FIL 100 B (1991),
 - méthode de routine : norme AFNOR V08-051 (1992) ;
- dénombrement des microorganismes psychotrophes :
 - méthode de référence : norme FIL 101 A (1991),
 - méthode de routine : norme FIL 132 A (1991) ;
- dénombrement d'*E. coli* :
 - méthode de routine : norme AFNOR V08-053 (1993) ;
- recherche de *Listeria monocytogenes* :
 - méthode de routine : norme AFNOR V08-055 (1993),
 - méthodes alternatives validées par l'AFNOR. »

Les laboratoires officiels ont donc obligation d'utiliser des méthodes normalisées récentes, qu'elles soient de référence ou de routine (voir 4.2).

4.1.2. Critères microbiologiques officiels

Les catégories de produits sont définies plus précisément, car les critères fixés sont différents selon le mode de préparation de l'aliment. En effet, les opérations technologiques mises en œuvre lors de la préparation de l'aliment favorisent l'exposition de l'aliment aux microorganismes contaminants et conduisent souvent à une augmentation de la charge microbienne totale.

On différencie, par exemple, pour des produits de même nature comme les produits carnés, les viandes de boucherie (sans manipulation) et les viandes hachées (avec manipulation).

Inversement, on regroupe des produits d'origine différente mais qui ont des points communs lors de leur préparation.

Par exemple, la tolérance pour les coliformes thermotolérants est moindre pour une viande cuisinée (10 par gramme) que pour une viande hachée crue (100 par gramme). Dans le deuxième cas, la cuisson probable de la viande devrait éliminer une partie de cette flore, donc la tolérance est plus grande. Par ailleurs, pour être respectés, ces critères doivent être réalisables en pratique.

Les catégories et sous-catégories des produits d'origine animale ont été déterminées par l'arrêté du 21 décembre 1979 dans les articles 1 à 10. Cet arrêté, paru au *Journal officiel*, concerne les textes généraux d'hygiène alimentaire d'origine et a été modifié par les arrêtés suivants : 17 septembre 1984 – 5 mars 1985 – 2 juin 1988 – 13 mars 1989 – 23 mars 1993.

D'autres critères complètent les textes d'origine :

- pour les viandes hachées : arrêté du 29 février 1996 ;
- pour les coquillages vivants : arrêté du 2 juillet 1996 abrogeant celui du 21 décembre 1979 ;
- pour les laits de consommation et les produits à base de lait : arrêté du 30 mars 1994 ;
- pour les beurres et corps gras : arrêté du 15 avril 1986 ;
- pour les végétaux crus : arrêté du 28 mai 1997 ;
- pour les eaux de consommation : arrêté du 20 février 1990.

• **Produits carnés – plats cuisinés – potages déshydratés**

- Viande de boucherie (article 2) : les viandes d'abattoirs et les viandes fraîches, sauf exception, ne sont pas considérées comme viandes de boucherie.
- Viandes hachées à l'avance, viandes cuites, produits de charcuterie, quenelles, plats cuisinés à l'avance, potages déshydratés (article 3) : les plats cuisinés à l'avance sont cuits ou précuits. Donc, les préparations crues, réfrigérées ou surgelées, ne sont pas concernées par ces critères. Dans ce cas, le principal constituant d'origine animale doit être considéré. Le service vétérinaire d'hygiène alimentaire décide si un produit fait ou non partie de cette catégorie (les sandwiches en font partie), mais les microorganismes à 30 °C ne sont pas pris en compte. L'arrêté du 29 février 1996 (article 40) modifie l'article 3 du 21 décembre 1979 en précisant les critères applicables aux viandes hachées et préparations de viande. Les viandes hachées peuvent être d'origine bovine, porcine, ovine et caprine. La définition exclut les saucisses crues et les chairs à saucisse. Les préparations de viande sont des viandes ayant subi une modification « insuffisante pour faire disparaître les caractéristiques de la viande fraîche ».
- Viandes de volailles (article 4).

• **Produits de la pêche (article 5)**

L'arrêté du 2 juillet 1996 modifie les critères retenus pour les coquillages bivalves et oursins présentés vivants, jusqu' alors pris en compte dans l'arrêté du 21 décembre 1979.

• **Produits à base d'œufs (article 6)**

Ovoproduits, pâtisseries, crèmes pâtisseries.

• **Produits laitiers**

- Lait fermentés (yaourts, Kéfir), laits gélifiés, fromages frais pasteurisés, crèmes fraîches pasteurisées, glaces et crèmes glacées (article 7).
- Lait de producteur destiné à un traitement thermique ou à la transformation (arrêté du 17 septembre 1984).
- Camemberts fabriqués à partir de lait cru, à l'exception de ceux bénéficiant d'une appellation d'origine (article 2 de l'arrêté du 2 mars 1993).

Ces critères ont été complétés et précisés par l'arrêté du 30 mars 1994 « relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché ». Ces critères sont vérifiés par les méthodes d'analyse prévues par l'avis publié le 23 janvier 1996.

Il définit :

- les laits de consommation comme les laits destinés à être consommés en l'état ;
- le traitement thermique, qui s'entend pour « tout traitement par chauffage ayant pour effet une réaction négative au test de la phosphatase » ;
- les produits laitiers comme dérivés exclusifs du lait avec un ajout éventuel d'une substance nécessaire à leur fabrication ;
- les fromages à pâte dure ayant une teneur en eau inférieure à 56 % dans le fromage dégraissé ;
- les fromages à pâte persillée qui contiennent des moisissures internes de couleur bleue ;
- les fromages à pâte molle étant soit « des fromages affinés ayant subi une autre fermentation qu'une fermentation lactique et dont la pâte n'est ni cuite ni pressée », soit des fromages dont la teneur en eau est supérieure à 67 %.

- **Conserves (article 8)**

Conserves à base de denrées animales ou d'origine animale. Les conserves de légumes sont exclues.

- **Semi-conserves (article 9)**

- **Graisses animales (article 10)**

L'arrêté du 15 avril 1986 précise les critères donnés par l'arrêté du 21 décembre 1979. Il concerne le beurre cru, le beurre concentré, les corps gras à base de matière grasse butyrique.

- **Produits végétaux crus et préparations de végétaux**

Les produits végétaux crus sont pris en compte depuis les arrêtés du 13 mars 1992 et du 28 mai 1997 parus dans le recueil des textes généraux du Journal officiel. Le premier arrêté précise les méthodes applicables pour les recherches classiques et décrit la méthodologie à suivre pour la recherche de *Listeria* dans les produits végétaux ou d'origine végétale.

Le décret du 26 avril 1991 fixe un certain nombre de prescriptions pour tout produit, denrée, ou boisson destinés à l'alimentation humaine. L'arrêté du 28 mai 1997 fixe de nouveaux critères pour certains aliments et préparations alimentaires jusque-là non envisagés.

La définition des produits végétaux crus ou préparations à base de végétaux crus exclut les produits végétaux surgelés. Ce sont des « produits végétaux ayant fait l'objet d'un épluchage ou d'un coupage ». Les critères présentés ici concernent aussi les graines germées, les jus de légumes et les jus de fruits crus.

- **Eaux utilisées dans les industries alimentaires**

On peut ajouter à ces produits alimentaires les eaux de consommation et les eaux destinées à la production alimentaire. Il semble important de prendre en compte cette dernière catégorie non comme produit alimentaire mais comme produit utilisé pour la fabrication en industrie alimentaire.

En effet, le décret du 3 janvier 1989 modifié le 10 avril 1990 et le 7 mars 1991 définit les eaux destinées à la consommation humaine :

- eaux livrées à la consommation conditionnées ou non, à l'exclusion des eaux minérales naturelles ;
- eaux utilisées dans les entreprises alimentaires à des fins de fabrication, de traitement, de conservation ou de mise sur le marché de produits ou de substances destinés à être consommés par l'homme et qui peuvent affecter la salubrité de la denrée alimentaire finale.

L'ensemble de ces critères s'applique aux produits finis pour consommation, pour un contrôle externe ou pour un autocontrôle. En effet, selon la circulaire du 4 avril 1980, « les critères de l'arrêté du 21 décembre 1979 sont ceux des laboratoires officiels et des laboratoires qui effectuent des analyses microbiologiques à la demande des professionnels assujettis à l'obligation de l'autocontrôle ». En cas d'expertise, on appliquera spécifiquement une méthode normalisée, précisément décrite par l'AFNOR.

L'ensemble des tableaux présentés en *annexe 1* regroupent les critères microbiologiques pour chaque denrée alimentaire et pour chaque microflores étudiée. Ils permettent de choisir les dilutions et les prises d'essai à tester pour pouvoir répondre aux critères.

4.2. Méthodes normalisées

La vérification des critères de qualité d'un produit alimentaire concerne à la fois le domaine commercial et le domaine réglementaire. Les méthodes d'analyse ont été normalisées pour répondre avec efficacité aux enjeux fixés par ces deux domaines.

4.2.1. Organismes chargés de la normalisation

Il s'agit des organismes suivants :

- Association française de normalisation (AFNOR). Elle n'a pas le monopole de la normalisation. Créée le 22 janvier 1926, l'association est chargée de coordonner toutes les activités de normalisation, de gérer le certificat de normalisation NF et de défendre auprès des instances internationales les technologies nationales. L'AFNOR, par l'intermédiaire de son comité agroalimentaire, décrit des méthodes d'analyse : ce sont les méthodes normalisées. Exemple : norme NF V 08-019 de 1985 : dénombrement des *Clostridium perfringens* ;
- Comité européen de normalisation (CEN). Le comité a été créé en 1961. Les ministres européens ont souhaité, en 1985, faire un plus grand usage des procédures nationales de normalisation et de certification en partant du principe que le niveau de sécurité assuré dans les différents états membres est équivalent. Les normes européennes adoptées à la majorité pondérée doivent être intégrées dans les collections nationales des États membres et toute norme existante divergente doit être supprimée ;
- *International standard organisation* (ISO). Créée en 1926, son but est de faciliter entre les pays les échanges de produits et les prestations de service. L'AFNOR est le membre français de l'ISO.

Il existe cinq comités techniques en agroalimentaire.

4.2.2. Processus de normalisation des méthodes d'analyse

4.2.2.1. Études préliminaires et choix du principe des méthodes

Il s'agit de comparer les différentes méthodes existantes et de déboucher sur un seul projet de méthode, ou deux si le choix n'a pu être déterminé.

4.2.2.2. Expérimentation et mise au point technique des méthodes

Des essais interlaboratoires sont effectués. Pour ceux-ci, il existe un guide NF ISO 5725 : les laboratoires réalisant ces essais doivent suivre le plus strictement possible les protocoles opératoires testés afin d'éviter toute variabilité des paramètres.

4.2.2.3. Mise au point rédactionnelle des méthodes

La méthode la mieux adaptée aux conditions de contrôle ayant été choisie, ses critères ayant été fixés et contrôlés, la rédaction est réalisée. La rédaction des différentes méthodes est unitaire : même plan, mêmes rubriques.

4.2.3. Méthodes d'analyse normalisées

4.2.3.1. Présentation des méthodes normalisées

La normalisation d'une méthode implique la description détaillée de toutes les étapes et garantit la validité des résultats obtenus, pour peu que la méthode ait été pratiquée dans les bonnes conditions. Comme nous l'avons vu, certaines méthodes normalisées peuvent être rendues officielles par publication d'un arrêté au *Journal officiel*.

Conçues et publiées en France par l'AFNOR, elles sont décrites dans le tome 1 et le tome 2 de la dernière édition des *Méthodes normalisées pour l'analyse microbiologique des produits alimentaires* (1996).

Il existe deux types de méthodes normalisées :

- des directives générales ou des méthodes de routine utilisables pour tous les produits alimentaires, ce sont les méthodes horizontales (*voir annexe 2*) ;
- des méthodes spécifiques à un produit, ce sont les méthodes sectorielles.

• Méthodes horizontales

Les directives générales, méthodes horizontales de référence, précisent les modalités de réalisation des opérations communes à tous les produits.

Parmi les directives générales, il existe des normes fixant les règles de l'échantillonnage, les techniques de prélèvements, les règles de réalisation des dilutions. La norme NF ISO 7218 (mai 1996) présente les *Règles générales pour les examens microbiologiques* (indice de classement : V 08-002).

Cette norme inventorie toutes les étapes du protocole opératoire de chaque type d'analyse en partant de la suspension mère. Elle précise également le mode d'exploitation des résultats pour chaque type de méthodologie décrite ensuite (NPP en milieu liquide, colonies en milieu solide).

Ce mode d'exploitation est repris dans les formules de calcul qui sont présentées dans les manipulations.

D'autres directives générales décrivent très précisément les différentes étapes de la méthode d'analyse pour la recherche ou le dénombrement d'une microflore. La norme NF ISO 7251 (septembre 1994) : *Directives générales pour le dénombrement d'Escherichia coli présumés* présente la méthode à suivre pour le dénombrement des *E. coli* présumés par la technique du nombre le plus probable.

Certaines méthodes horizontales de référence ont été simplifiées en méthodes de routine. Ainsi, la norme V 08-019 : « Dénombrement des *C. perfringens* par comptage des colonies » a été simplifiée par la méthode de routine V 08-056 d'avril 1994 (*annexe 2*).

• Méthodes sectorielles

Elles concernent spécifiquement un produit.

L'indice de classement commence alors par un nombre correspondant au produit considéré : NF V 59-101 octobre 1982 : *Gélatine alimentaire – Dénombrement des microorganismes – Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C*.

Les méthodes normalisées par l'AFNOR sont présentées par leur nom et précédées par les deux lettres NF. Lorsque le numéro attribué correspond à celui attribué par la norme internationale ISO, la norme s'appelle NF ISO (exemple : NF ISO 7218 de mai 1996).

Les méthodes horizontales de référence ou de routine se substituent aux méthodes sectorielles lorsque celles-ci n'existent pas ou ne sont pas utilisables dans certains cas particuliers.

4.2.3.2. Application des méthodes normalisées

Les méthodes normalisées sont utilisées pour l'ensemble des catégories de denrées alimentaires.

Les produits alimentaires à analyser sont classés différemment selon que l'on s'intéresse :

- aux analyses effectuées sur ces produits ;
- aux critères microbiologiques officiels.

Ces deux classifications se recoupent, mais les produits susceptibles d'être analysés ne sont pas tous repris dans les critères officiels.

Pour les méthodes normalisées, les produits sont classés de la façon suivante :

- 1 : aliments des animaux ;
- 2 : céréales et légumineuses ;
- 3 : conserves ;
- 4 : épices et aromates ;
- 5 : gélatines alimentaires ;
- 6 : lait et produits laitiers ;
- 7 : margarines ;
- 8 : produits de la pêche ;
- 9 : produits déshydratés ;
- 10 : viandes et produits à base de viande.

Les tableaux de l'*annexe 2* indiquent la ou les référence(s) des méthodes normalisées pour chaque denrée alimentaire et pour chaque microflore étudiée.

4.3. Méthodes alternatives – Validation AFNOR

4.3.1. Méthodes alternatives

Ce sont des méthodes alternatives aux méthodes officielles ou normalisées. Ces méthodes se caractérisent par leur facilité d'usage et leur rapidité nettement supérieures aux méthodes officielles ou normalisées, souvent longues et lourdes à mettre en œuvre.

Elles peuvent ou non être validées par l'AFNOR.

Celles validées par l'AFNOR peuvent être utilisées pour tous types de contrôle et par tous les laboratoires alors que celles non validées concernent :

- les laboratoires de contrôle d'entreprise, pour les autocontrôles ;
- les laboratoires privés réalisant des contrôles pour les entreprises ;
- les laboratoires publics pour des contrôles non officiels.

Grâce à l'apparition de ces méthodes, le laboratoire aide l'entreprise à maîtriser la qualité microbiologique des produits pendant la fabrication.

Les contrôles portent sur les points critiques déterminés selon une démarche HACCP.

La méthode d'analyse choisie doit permettre, après interprétation, de détecter des non-conformités et de réagir sur la production en amont. Le temps compris entre le prélèvement et l'action corrective doit être le plus court possible.

Il s'agit de contrôles à caractère préventif et l'analyse microbiologique n'est donc plus limitée à un contrôle *a posteriori* d'un nombre d'individus statistiquement représentatif d'un lot et devant satisfaire aux critères. Le contrôle du produit fini devient alors un sondage permettant de valider l'ensemble de la fabrication.

Les méthodes d'analyse rapides sont simples à exécuter (automatisation) et permettent de traiter simultanément un grand nombre d'échantillons.

Leur coût est élevé mais elles participent à la rentabilité de l'entreprise car elles assurent :

- le contrôle de la qualité des matières premières ;
- le contrôle en temps réel de la production ;
- la libération rapide des produits finis, diminuant ainsi les coûts de stockage.

On peut différencier :

- les méthodes rapides qui nécessitent une culture mais dont le délai de lecture a été considérablement réduit par rapport à celui des méthodes traditionnelles (impédancemétrie, détection immuno-enzymatique, détection par sonde nucléique...);
- les méthodes ultra-rapides qui permettent une détection directe, sans incubation, dans des délais allant de quelques minutes à quelques heures (ATPmétrie, DEFT (*Direct Epifluorescent Filter Technic*), cytométrie en flux...).

4.3.2. Validation AFNOR

De très nombreuses méthodes sont apparues et il est devenu nécessaire de montrer leur niveau de qualité par rapport aux méthodes de référence.

Une procédure de validation reconnue par les pouvoirs publics (DGCCRF et SDHA) offre aux fabricants de méthodes nouvelles la possibilité d'obtenir une attestation de validation.

Celle-ci garantit aux utilisateurs que « les résultats d'essais obtenus par application de méthodes rapides commerciales spécifiques sont comparables à ceux qui auraient été obtenus par application des méthodes de référence » (texte AFNOR). L'intérêt de cette démarche est important pour les laboratoires des entreprises certifiées ISO 9002 et pour les laboratoires accrédités devant utiliser des méthodes reconnues. Les techniques validées par l'AFNOR sont autorisées pour tous les types de contrôles.

L'obtention de la validation dépend des résultats de deux études :

- une étude préliminaire réalisée par un laboratoire expert, consistant à comparer les résultats (fidélité et justesse) de la méthode de référence à ceux de la méthode rapide à valider. Elle doit permettre l'estimation de la spécificité, de la sensibilité et de la linéarité pour les techniques quantitatives. Elle permet également de vérifier la rapidité et la simplicité de l'analyse annoncées par le fabricant ;
- une étude collaborative consistant en une série d'essais effectués par au moins huit laboratoires n'utilisant que la méthode rapide. Elle doit permettre de mesurer la reproductibilité en comparant les résultats des essais réalisés dans plusieurs laboratoires, et la répétabilité en comparant les résultats des essais effectués dans un même laboratoire.

Les résultats des deux études fondent l'acceptation de validation prise par l'AFNOR qui délivre au fabricant, devant justifier par ailleurs d'un système qualité satisfaisant à la norme ISO 9002, une attestation de validation.

Cette attestation de validation précise, pour chaque méthode :

- le principe de la méthode ;
- le domaine d'application ;
- les restrictions éventuelles d'emploi ;
- la méthode de référence ;
- la justesse ;
- la fidélité.

Elle constitue un atout commercial non négligeable pour la promotion de la méthode.

La vérification du maintien en conformité des méthodes validées est réalisée par :

- un audit tous les deux ans ;
- une étude bibliographique et collaborative quatre ans après la date de validation.

En cas de résultats non satisfaisants, l'attestation n'est pas renouvelée.

Actuellement, les méthodes microbiologiques qui ont obtenu la validation sont surtout des méthodes de recherche de microorganismes pathogènes (test de détection des *Salmonella*, des *Listeria*) ou de dénombrement de germes indicateurs (coliformes totaux et thermotolérants, *E. coli* par Pétrifilm®).

5. Étapes du contrôle d'un produit alimentaire

Le produit analysé est le produit fini d'un lot de fabrication dont on veut valider la qualité microbiologique. Il s'agit donc de présenter l'ensemble de la démarche de ce contrôle, depuis l'échantillonnage dans l'entreprise jusqu'à l'analyse microbiologique de l'échantillon.

5.1. Principales étapes de l'analyse du produit fini

Quel que soit le laboratoire qui effectue l'analyse microbiologique, celle-ci comporte un certain nombre d'étapes communes à toutes les analyses.

Un premier prélèvement, réalisé dans l'entreprise, est destiné au laboratoire : c'est l'échantillonnage qui consiste à prélever sur le lot de fabrication un nombre représentatif d'individus pour les analyser (échantillon pour laboratoire : boîtes de conserve, fromage entiers...) (voir 5.2).

4.3.2. Validation AFNOR

De très nombreuses méthodes sont apparues et il est devenu nécessaire de montrer leur niveau de qualité par rapport aux méthodes de référence.

Une procédure de validation reconnue par les pouvoirs publics (DGCCRF et SDHA) offre aux fabricants de méthodes nouvelles la possibilité d'obtenir une attestation de validation.

Celle-ci garantit aux utilisateurs que « les résultats d'essais obtenus par application de méthodes rapides commerciales spécifiques sont comparables à ceux qui auraient été obtenus par application des méthodes de référence » (texte AFNOR). L'intérêt de cette démarche est important pour les laboratoires des entreprises certifiées ISO 9002 et pour les laboratoires accrédités devant utiliser des méthodes reconnues. Les techniques validées par l'AFNOR sont autorisées pour tous les types de contrôles.

L'obtention de la validation dépend des résultats de deux études :

- une étude préliminaire réalisée par un laboratoire expert, consistant à comparer les résultats (fidélité et justesse) de la méthode de référence à ceux de la méthode rapide à valider. Elle doit permettre l'estimation de la spécificité, de la sensibilité et de la linéarité pour les techniques quantitatives. Elle permet également de vérifier la rapidité et la simplicité de l'analyse annoncées par le fabricant ;
- une étude collaborative consistant en une série d'essais effectués par au moins huit laboratoires n'utilisant que la méthode rapide. Elle doit permettre de mesurer la reproductibilité en comparant les résultats des essais réalisés dans plusieurs laboratoires, et la répétabilité en comparant les résultats des essais effectués dans un même laboratoire.

Les résultats des deux études fondent l'acceptation de validation prise par l'AFNOR qui délivre au fabricant, devant justifier par ailleurs d'un système qualité satisfaisant à la norme ISO 9002, une attestation de validation.

Cette attestation de validation précise, pour chaque méthode :

- le principe de la méthode ;
- le domaine d'application ;
- les restrictions éventuelles d'emploi ;
- la méthode de référence ;
- la justesse ;
- la fidélité.

Elle constitue un atout commercial non négligeable pour la promotion de la méthode.

La vérification du maintien en conformité des méthodes validées est réalisée par :

- un audit tous les deux ans ;
- une étude bibliographique et collaborative quatre ans après la date de validation.

En cas de résultats non satisfaisants, l'attestation n'est pas renouvelée.

Actuellement, les méthodes microbiologiques qui ont obtenu la validation sont surtout des méthodes de recherche de microorganismes pathogènes (test de détection des *Salmonella*, des *Listeria*) ou de dénombrement de germes indicateurs (coliformes totaux et thermotolérants, *E. coli* par Pétrifilm®).

5. Étapes du contrôle d'un produit alimentaire

Le produit analysé est le produit fini d'un lot de fabrication dont on veut valider la qualité microbiologique. Il s'agit donc de présenter l'ensemble de la démarche de ce contrôle, depuis l'échantillonnage dans l'entreprise jusqu'à l'analyse microbiologique de l'échantillon.

5.1. Principales étapes de l'analyse du produit fini

Quel que soit le laboratoire qui effectue l'analyse microbiologique, celle-ci comporte un certain nombre d'étapes communes à toutes les analyses.

Un premier prélèvement, réalisé dans l'entreprise, est destiné au laboratoire : c'est l'échantillonnage qui consiste à prélever sur le lot de fabrication un nombre représentatif d'individus pour les analyser (échantillon pour laboratoire : boîtes de conserve, fromage entiers...) (voir 5.2).

Cet échantillon est ensuite analysé au laboratoire : sur chaque individu de l'échantillon est pratiquée l'analyse microbiologique proprement dite.

Une partie de l'aliment doit alors être prélevée : c'est le prélèvement de l'échantillon pour essai. Il doit être réalisé en conditions aseptiques afin de ne pas entraîner une contamination de l'échantillon par des microorganismes exogènes. Le mode de prélèvement dépend de la nature du produit. Lorsque cela est possible, ce prélèvement est précédé d'une homogénéisation du produit. À partir de ce prélèvement stérile, un certain nombre d'opérations vont permettre la préparation du produit en vue de l'analyse proprement dite : c'est le traitement de l'échantillon.

La suspension mère obtenue correspond à une dilution du produit. Les analyses sont effectuées sur la suspension mère ou sur ses dilutions (voir chapitre III).

Elles peuvent consister en :

- des dénombrements : évaluation quantitative des populations contaminantes (voir chapitre IV) ;
- des recherches : mise en évidence d'un microorganisme dans une quantité de produit déterminée. Le plus souvent, c'est une bactérie responsable d'intoxication alimentaire qui est recherchée et identifiée (voir chapitre V).

L'ensemble de la démarche est présenté dans la figure 2.

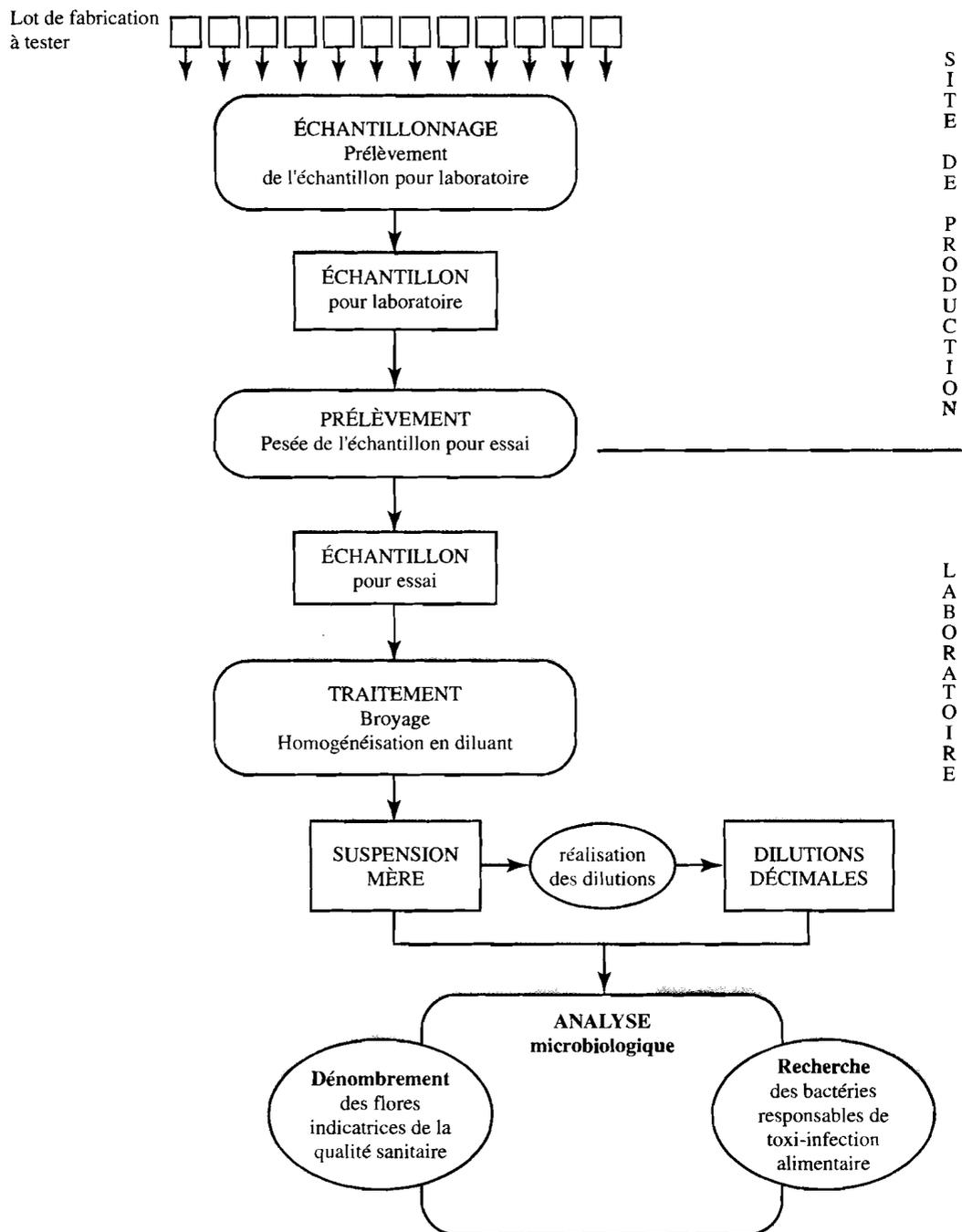


Fig. 2 – Contrôle microbiologique d'un produit fini

5.2. Échantillonnage pour laboratoire

5.2.1. Principes généraux de l'échantillonnage

L'échantillonnage a pour but d'estimer les caractéristiques d'un lot de produits en effectuant des analyses sur une partie seulement du lot.

Il est en pratique impossible d'examiner tous les individus d'un lot (trop long, trop coûteux et impossible dans le cas particulier d'un contrôle conduisant à la destruction des individus).

L'échantillon, somme des objets ou des matières prélevés parmi l'ensemble possible appelé population, permettra l'estimation de la qualité du lot.

Chacun des objets de l'échantillon est appelé prélèvement élémentaire.

L'échantillonnage est donc l'opération de choix des prélèvements qui vont constituer l'échantillon.

Le nombre des prélèvements élémentaires est appelé effectif de l'échantillon et le rapport de l'effectif de l'échantillon (n) à l'effectif de la population (N) est appelé taux d'échantillonnage.

Le lot doit être homogène (usine X, chaîne de fabrication, type de fabrication, jour de fabrication...).

Il faut définir le prélèvement élémentaire à contrôler :

- objet individuel (le paquet, la boîte de conserve...);
- groupe d'objets (le pack de 6 yaourts);
- quantité (volume ou poids) dans le cas de produits en vrac, solides ou liquides.

L'échantillon doit être représentatif de la population (lot) dans laquelle il a été prélevé, ce qui suppose deux conditions :

- **prélèvement des individus au hasard**, c'est-à-dire que chaque individu d'un lot a la même probabilité d'être prélevé que n'importe quel autre;
- **prélèvement des individus indépendants**, c'est-à-dire que le tirage des premiers individus ne doit pas influencer sur les tirages suivants. Cette condition sera satisfaite si le taux d'échantillonnage est inférieur à 10 % ($n/N < 10\%$).

L'échantillonnage est une opération qui comporte nécessairement une erreur irréductible, inhérente au choix aléatoire, mais mathématiquement connue et maîtrisée par les lois de probabilité.

Tous les efforts doivent être faits pour que des erreurs supplémentaires d'origine humaine, technique, instrumentale ou environnementale ne viennent pas s'ajouter à l'erreur statistique et suppriment la représentativité de l'échantillon.

Dans le cas d'une estimation de la qualité d'un lot, si les échantillons sont prélevés correctement, on pourra donner un « intervalle de confiance » au critère choisi, intervalle au sein duquel on a de très fortes chances de trouver la vraie valeur du paramètre étudié.

Dans le cas d'un contrôle de fabrication du lot, la taille n de l'échantillon mais aussi la fréquence des prélèvements devront être fixées.

Dans le cas d'un contrôle au stade de la vente du lot, il faudra déterminer la taille n de l'échantillon, et le nombre limite c d'individus défectueux en fonction du « risque fournisseur », ou risque α , et de la « protection client » désirée, c'est-à-dire le « risque client », ou risque β .

Le fournisseur désire se protéger contre le risque de se voir refuser trop souvent des lots ayant un niveau de qualité acceptable (NQA), l'acheteur contre le risque d'accepter trop souvent des lots contenant une proportion d'individus défectueux dépassant le niveau de qualité limite (NQL).

Il a été établi des courbes d'efficacité (fig. 3)

qui indiquent, en fonction du pourcentage d'individus défectueux dans les lots et pour divers plans d'échantillonnage, la probabilité d'acceptation du lot.

La protection client est d'autant plus grande que la courbe d'efficacité est accentuée.

L'un et l'autre risques ne sont jamais complètement éliminés et le plan d'échantillonnage est un compromis entre ces deux risques. Le fournisseur et le client doivent se mettre d'accord sur les couples (α -NQA) et (β -NQL).

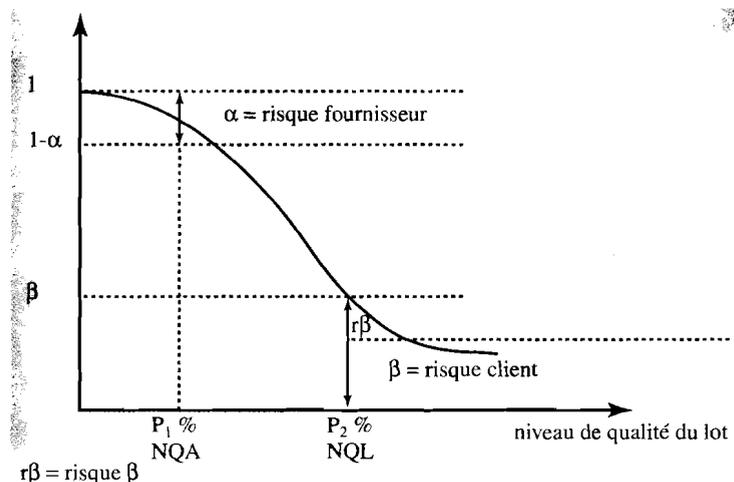
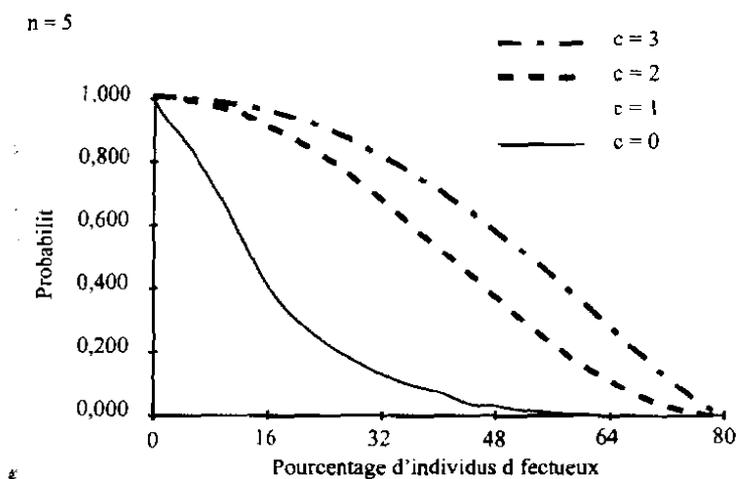


Fig. 3 – Courbe d'efficacité : information globale de la qualité d'un lot



Par exemple, dans le cas d'un plan d'échantillonnage simple avec $n = 5$, on peut tracer les courbes d'efficacité (fig. 4) correspondant à $c = 0$, $c = 1$, $c = 2$ et $c = 3$.

Fig. 4 – Courbes d'efficacité : probabilité d'acceptation d'un lot

Pour le critère d'acceptation le plus draconien, c'est à dire $c = 0$, on voit que pour un lot contenant 20 % d'individus défectueux, la probabilité d'acceptation du lot n'est que de 0,3, ce qui traduit un risque fournisseur important.

Au contraire, pour le critère d'acceptation le plus large, soit $c = 3$ pour le même lot (20 % d'individus défectueux), la probabilité d'acceptation du lot est proche de 1.

Dans ce dernier cas, le risque client est par contre très élevé (la probabilité d'acceptation d'un lot contenant 60 % d'individus défectueux est de 0,6, alors qu'elle était inférieure à 0,1 dans le cas précédent).

Dans le cas des contrôles microbiologiques officiels, le plan d'échantillonnage est un plan simple avec $n = 5$ et $c = 2$, permettant de définir trois classes de contamination.

5.2.2. Échantillonnage en vue de l'analyse microbiologique

Le caractère aléatoire de la contamination microbienne rend difficile le contrôle des différents critères de la qualité hygiénique et marchande de l'aliment. La biocontamination peut toucher seulement quelques individus de la population et sa nature peut varier suivant les individus.

Le choix de l'unité d'échantillonnage, l'effectif et la fréquence des prélèvements dépendent de nombreux facteurs :

- la nature du produit :
 - le lot peut être homogénéisé (cas de fluides alimentaires même complexes comme le lait) : dans ce cas, un seul prélèvement minimal est représentatif de l'ensemble du produit ;
 - le lot est hétérogène : il faut considérer le nombre d'individus échantillonnables ;
- les modalités de production, en continu ou en discontinu ;
- le but de l'analyse nécessitant l'échantillonnage :
 - le contrôle systématique des produits finis dont la qualité hygiénique est réglementée,
 - le contrôle en cours de fabrication, où il est alors nécessaire de détecter les microorganismes spécifiques d'un risque particulier en fonction du produit et des conditions de sa fabrication ;
- la valeur des critères à respecter et les tolérances admises.

La figure 5 schématise les étapes de l'échantillonnage.

5.2.2.1. Échantillon pour laboratoire

La taille de l'échantillon pour laboratoire d'un produit de même nature doit être égale, d'après l'annexe I de l'arrêté du 21 décembre 1979 :

- pour des portions unitaires de viande et des denrées animales ou d'origine animale : si possible, au moins à cinq unités ;
- pour des conserves à base de denrées animales ou d'origine animale : cinq unités ;
- pour des coquillages : un nombre suffisant pour obtenir au laboratoire au moins 5 fois 25 grammes de chair et de liquide intervalvaire.

Le laboratoire doit disposer, pour conduire les analyses complètes, d'environ 500 grammes de produits, soit 5 fois 100 grammes. Ces 100 grammes peuvent être fournis par une ou plusieurs pièces.

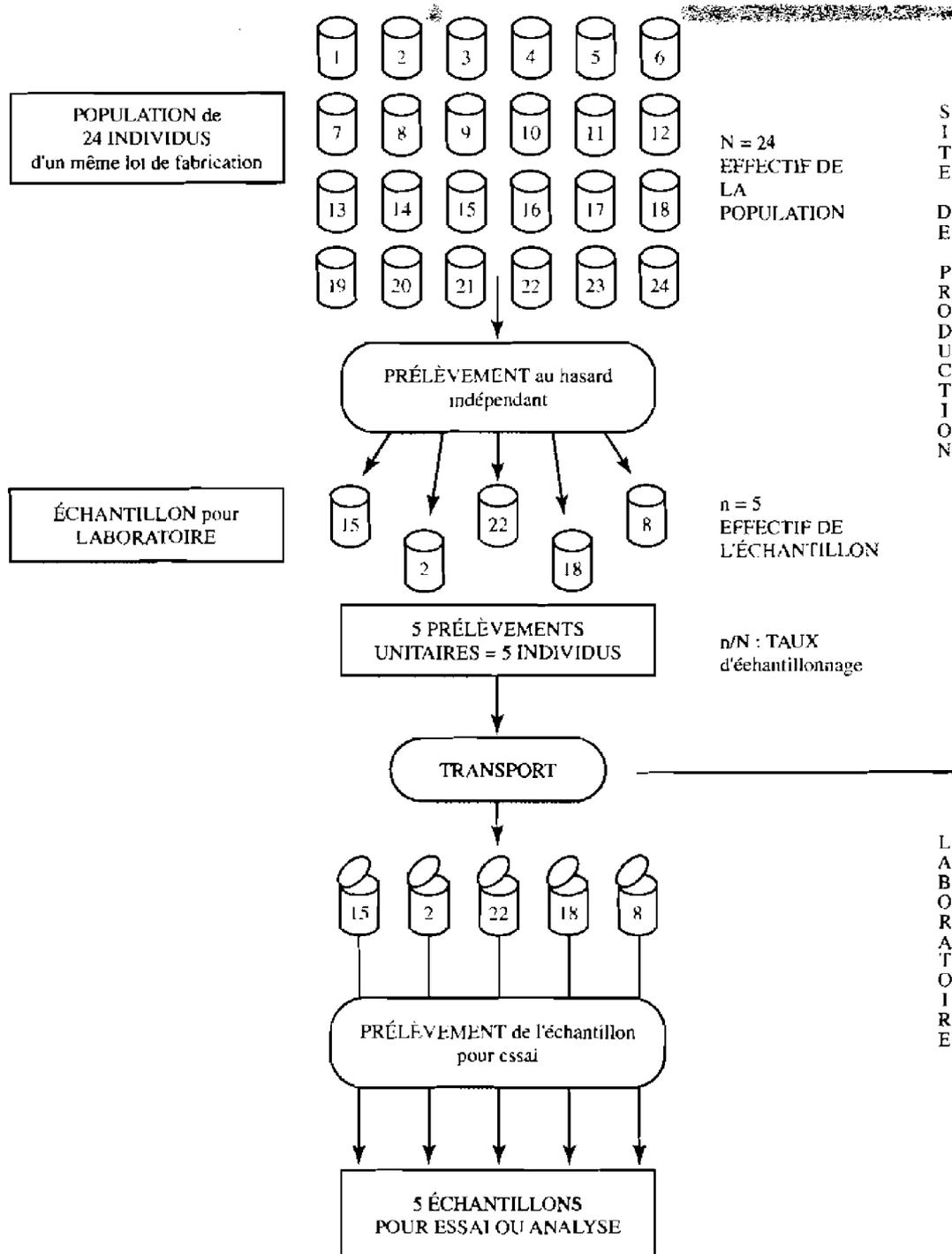


Fig. 5 – Échantillonnage en vue de l'analyse microbiologique

5.2.2.2. Échantillon pour essai

La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales porte :

- sur les parties superficielles et profondes, notamment pour les produits en tranches, hachés, divisés, pour les plats cuisinés à l'avance... ;
- sur la partie profonde du produit pour les viandes (pièces), les produits de charcuterie (pièces) et les poissons entiers, après cautérisation de la surface ;
- sur le produit homogénéisé (lait) ou sur les parties superficielles et profondes pour les produits laitiers et selon la nature des produits.

Dans le cas d'examen microbiologiques mis en œuvre à la suite de toxi-infections alimentaires, il est nécessaire de pratiquer la recherche des germes pathogènes, toxigènes et/ou de leurs toxines, aussi bien en surface qu'en profondeur. Pour les techniques de prélèvement, il convient de se référer au *paragraphe 5.3.*

5.2.3. Interprétation des résultats : plan à trois classes – plan à deux classes

Les critères microbiologiques se rapportent à des phénomènes biologiques et traduisent notamment l'activité métabolique des microorganismes. C'est dire la difficulté de les transcrire en valeurs numériques. Le critère microbiologique m fixe la valeur qui correspond au niveau supérieur de contamination microbienne qu'il est habituel d'attendre de produits fabriqués, transportés et distribués selon les bonnes pratiques professionnelles en matière d'hygiène.

Tous les résultats égaux ou inférieurs sont considérés comme satisfaisants et les individus comme conformes.

Les résultats des analyses bactériologiques n'ont pas la même précision que ceux des analyses chimiques et physiques.

Il est apparu utile de tenir compte de deux notions différentes :

- une variabilité statistique (risque client, risque fournisseur) ;
- une variabilité analytique (reproductibilité relative des analyses).

Cette variabilité analytique est estimée à $1/2 \log$ de part et d'autre du résultat N , c'est-à-dire comprise entre $10^{(\log N) - 0,5}$ et $10^{(\log N) + 0,5}$, pour les milieux solides.

Pour un critère m , la tolérance d'origine analytique est donc de $3 m$: car $\log m \leq \log m + 0,5$, soit $\log m \leq \log m + \log 3$, soit encore $\log m \leq \log 3m$, donc $m \leq 3 m$.

Pour les milieux liquides, la variabilité analytique est de $1 \log$ autour du résultat N , c'est-à-dire comprise entre $10^{(\log N - 1)}$ et $10^{(\log N) + 1}$. La tolérance analytique pour un critère m est donc de $10 m$ car $\log m \leq \log m + 1$, soit $\log m \leq \log m + \log 10$, soit encore $\log m \leq \log 10 m$, donc $m \leq 10 m$.

Ceci est valable quelle que soit la nature des milieux de culture utilisés.

5.2.3.1. Plan à trois classes

L'utilisation du plan dit à trois classes, qui permet de nuancer l'interprétation des résultats de l'analyse bactériologique, impose la réalisation de prélèvements en nombre suffisant ; le nombre minimal d'unités d'échantillons n (ou prélèvements élémentaires) pour le laboratoire a été fixé à 5 pour un même produit. Il caractérise avec son autre paramètre $c = 2$ (nombre maximal d'unités de l'échantillon défectueuses) un plan d'échantillonnage d'efficacité minimale.

Soit :

- m : critère fixé par arrêté (du 21 décembre 1979 relatif aux denrées animales ou d'origine animale) ;
- n : nombre d'unités composant l'échantillon ;
- c : nombre d'unités défectueuses de l'échantillon donnant des valeurs supérieures à $3 m$ lors d'un dénombrement en milieu solide, ou $10 m$ lors d'un dénombrement en milieu liquide ;
- M : seuil limite d'acceptabilité, au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, sans que pour autant le produit soit considéré comme toxique. Les valeurs de M sont fixées en tenant compte de la variabilité analytique et statistique à :
 - $M = 10 m$ lors du dénombrement effectué en milieu solide ;
 - $M = 30 m$ lors du dénombrement effectué en milieu liquide.

On peut définir trois classes de contamination permettant d'évaluer la qualité d'un lot.

- **La qualité du lot est considérée comme satisfaisante**
 - lorsque les valeurs observées pour les 5 unités de l'échantillon sont :
 - $\leq 3 m$ en milieu solide,
 - $\leq 10 m$ en milieu liquide.
 - **La qualité du lot est considérée comme acceptable**
 - lorsque les valeurs observées pour 2 unités de l'échantillon ($c/n \leq 2/5$) sont comprises :
 - entre $3 m$ et $10 m (= M)$ en milieu solide,
 - entre $10 m$ et $30 m (= M)$ en milieu liquide ;
 - et lorsque les valeurs observées pour les 3 autres unités de l'échantillon sont :
 - $\leq 3 m$ en milieu solide ;
 - $\leq 10 m$ en milieu liquide.
 - **La qualité du lot est considérée comme non satisfaisante**
 - lorsque les valeurs observées pour 3 unités d'échantillons ($c/n > 2/5$) sont comprises :
 - entre $3 m$ et $10 m (= M)$ en milieu solide ;
 - entre $10 m$ et $30 m (= M)$ en milieu liquide ;
 - dans tous les cas où 1 unité d'échantillon présente une valeur supérieure à M .
- **Le produit doit être considéré comme toxique ou corrompu**
 - lorsque la contamination atteint la valeur microbienne limite S , qui est fixée dans le cas général à $10^3 m$. Pour *Staphylococcus aureus*, cette valeur S ne doit jamais excéder $5 \cdot 10^4$.

5.2.3.2. Plan à deux classes

Ce plan est ainsi désigné car les résultats interprétés permettent de déterminer seulement deux classes de contamination. Ce type de plan n'accepte aucune tolérance, même de type analytique.

Le résultat est alors analysé de la manière suivante :

- « absence dans » : le résultat est considéré comme satisfaisant ;
- « présence dans » : le résultat est considéré comme non satisfaisant ; le produit est déclaré impropre à la consommation.

REMARQUE

- Dans le cas des carcasses ou coupes de demi-gros, réfrigérées ou congelées ainsi que des pièces de viande de boucherie conditionnées sous vide ou non, réfrigérées ou congelées, le plan à deux classes est appliqué avec seulement acceptation des tolérances de caractère analytique pour le critère concernant les microorganismes aérobies à 30 °C.
- Dans le cas des cuisses de grenouilles, escargots décoquillés, surgelés ou congelés, le plan à deux classes est également appliqué, avec seulement acceptation des tolérances d'origine analytique pour le critère concernant *Clostridium perfringens*.

Le plan à deux classes est applicable en particulier aux contaminations par *Salmonella*.

L'ensemble de ces données est repris dans la figure 6.

PLAN À TROIS CLASSES

Tolérance d'origine analytique			
m	$3m$	$M = 10m$	$S = 10^3 m$
$10m$		$M = 30m$	$S = 10^3 m$
		en milieu solide	
		en milieu liquide	
SATISFAISANT	ACCEPTABLE si $c/n \leq 2/5$	NON SATISFAISANT	NON SATISFAISANT Produit toxique ou corrompu
	NON SATISFAISANT si $c/n > 2/5$		

**PLAN À DEUX CLASSES
(CAS GÉNÉRAL)**

ABSENCE	PRÉSENCE
SATISFAISANT	NON SATISFAISANT

**PLAN À DEUX CLASSES
(CAS PARTICULIER)**

Ce tableau s'applique à quelques cas de produits carnés.

m	$3m$
	$10m$
milieu solide	
milieu liquide	
SATISFAISANT	NON SATISFAISANT

Fig. 6 – Interprétation des résultats de l'analyse microbiologique

5.3. Prélèvement de l'échantillon pour analyses

Les laboratoires chargés d'effectuer des contrôles sur les produits alimentaires sont tenus de respecter des consignes précises concernant le prélèvement des échantillons.

La réalisation des prélèvements d'échantillons d'une population donnée est décrite soit dans les normes spécifiques relatives à chaque aliment, et, dans ce cas, la technique de prélèvement est simple (exemple : algues alimentaires), soit dans des normes générales concernant les techniques de prélèvement adaptées à une catégorie de produits (exemple : viande, conserves, lait...).

Les normes précisent le matériel nécessaire au prélèvement, le stockage et le transport dudit prélèvement, son étiquetage.

5.3.1. Méthodes de prélèvement des produits à base de lait

Ces méthodes se réfèrent à la norme AFNOR NF V 04 150.

5.3.1.1. Lait entier, partiellement ou totalement écrémé, aromatisé, fermenté, et crème

Le prélèvement peut aussi bien être réalisé sur une citerne de stockage de laits, sur un bidon de collecte, ou sur un récipient destiné au commerce de détail. Dans ce dernier cas, c'est le plus souvent le contenu des récipients entiers non ouverts qui constitue l'échantillon. La méthode est la suivante :

- bien mélanger les liquides en vrac, au moyen du plongeur ou de l'agitateur (instruments destinés à l'homogénéisation...), par agitation mécanique, ou à l'aide d'air comprimé propre, c'est-à-dire filtré.

La taille des plongeurs est évidemment dépendante de la dimension des récipients contenant les laits en vrac (fig. 7 et fig. 8).

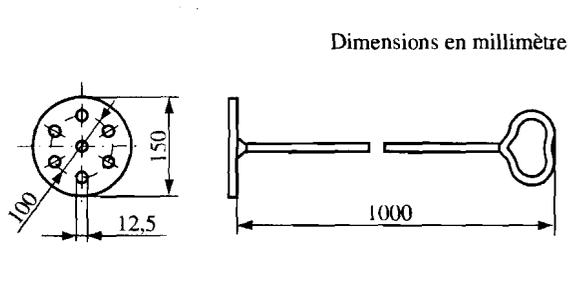


Fig. 7 – Plongeur recommandé pour les bidons et les seaux

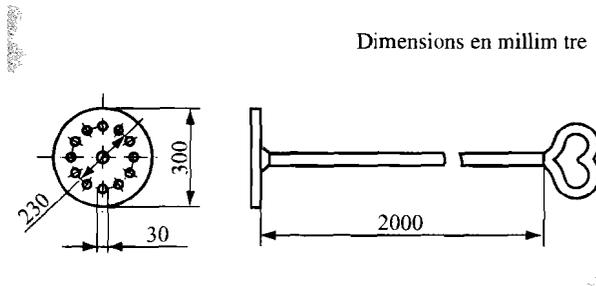


Fig. 8 – Plongeur approprié pour les camions-citernes, les réservoirs installés à la ferme

- prélever l'échantillon à l'aide d'une louche ou d'un extracteur immédiatement après l'homogénéisation ; la dimension de l'échantillon ne doit pas être inférieure à 200 mL ;
- l'équipement pour prélèvement doit être propre et stérilisé : soit à l'air chaud (170 °C pendant 1 heure), soit à la vapeur (121 °C pendant 20 minutes à l'autoclave), soit par immersion dans l'eau bouillante (1 minute) ou dans l'éthanol à 70 % v/v ;
- les récipients destinés à recevoir les prélèvements sont en verre, matière plastique, ou certains métaux. Ils sont propres, secs et stériles ;
- la température de stockage doit être atteinte le plus rapidement possible après le prélèvement, et le délai entre prélèvement et analyse doit être le plus bref possible (de préférence inférieur à 24 h) (tableau 1).

Produit	Température de stockage avant et durant le transport	Quantité minimale de prélèvement élémentaire
Lait non stérilisé	0 à 4 °C	200 mL
Lait stérilisé, UHT en récipients non ouverts	Température ambiante (25 °C au maximum)	200 mL
Glace de consommation et produits congelés à base de lait	- 18 °C	100 ou 200 g
Lait sec	Température ambiante (25 °C au maximum)	100 ou 200 g
Beurre	0 à 4 °C à l'obscurité	100 g ou 250 g ou 2 kg
Fromage	0 à 4 °C	100 ou 200 g

Tableau 1 – Conditions de conservation de l'échantillon et quantité minimale

5.3.1.2. Beurre

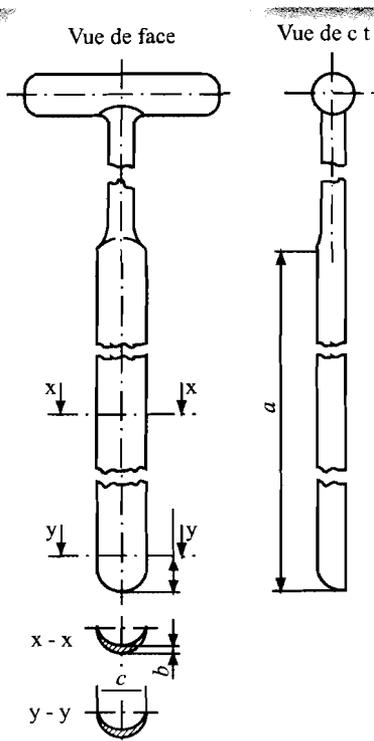


Fig. 9 – Sonde à beurre

La méthode est la suivante :

- prélever à partir du produit en vrac ou à partir d'un emballage contenant au moins 1 kg de produit, après avoir, si nécessaire, maintenu le produit à une température de 8 °C environ pour qu'il ait atteint une fermeté permettant son prélèvement.
- Dans le cas d'un emballage de moins de 1 kg, c'est l'emballage dans son entier et non ouvert qui constitue l'échantillon ;
- enlever, à l'aide d'une spatule stérilisée, la couche de surface de la zone d'échantillonnage sur une épaisseur ne dépassant pas 5 mm ;
- enfoncer la sonde stérilisée (fig. 9) en diagonale dans le produit, sans qu'elle atteigne la surface opposée ; faire pivoter la sonde d'un tour complet et la retirer : elle contient le noyau ;
- verser le noyau dans un récipient stérile pour échantillon.

5.3.1.3. Fromage à pâte dure, demi dure, ou molle

La méthode est la suivante :

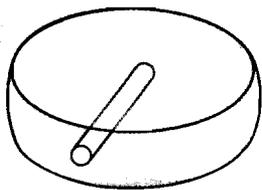


Fig. 10 – Échantillonnage de fromages à l'aide d'une sonde (cas d'un fromage cylindrique)

- sauf spécification, l'échantillon doit comprendre la surface du fromage ;
- les échantillons sont prélevés soit à l'aide d'une sonde stérilisée, soit en coupant une portion à l'aide d'un scalpel ou d'un fil à couper stérilisé, ou bien directement en prenant le fromage entier non ouvert dans son emballage ;
- si l'échantillon est prélevé à l'aide d'une sonde : enfoncer une première sonde jusqu'à 25 mm de profondeur et retirer un noyau, puis enfoncer dans le canal réalisé une seconde sonde de diamètre inférieur, la faire pivoter et retirer le noyau (fig. 10) ;
- transférer ce noyau dans le récipient prévu pour l'échantillon, et recommencer jusqu'à obtention de la quantité.

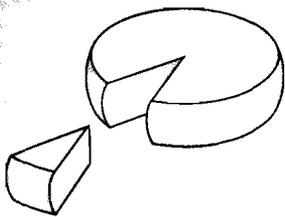


Fig. 11 – Échantillonnage de fromages par prélèvement d'une portion

- L'échantillon peut être réalisé par prélèvement d'un morceau (fig. 11).

5.3.2. Méthodes de prélèvement de la viande et des produits à base de viande

Les méthodes sont élaborées selon la norme AFNOR NF V 04 501.

- Les échantillons peuvent appartenir à différentes catégories :
 - unités de viande ou de produits à base de viande, préparés ou conditionnés (bocal, barquette sous film plastique) ;
 - morceaux de viande prélevés dans une unité de masse inférieure à 2 kg ;
 - échantillons prélevés sur des unités de masse supérieure à 2 kg ;
 Ces échantillons peuvent être réfrigérés, congelés ou surgelés, en l'état ou partiellement déshydratés.
- L'analyse microbiologique peut avoir pour but la recherche et/ou le dénombrement de la flore de surface, de la flore profonde ou des deux.
- Les échantillons doivent être manipulés dans des conditions d'aseptie.

5.3.2.1. Prélèvement d'un échantillon réfrigéré

• Prélèvement en profondeur

Il est toujours réalisé après cautérisation de la surface.

– Sur une pièce :

après avoir éliminé, au couteau, une pellicule superficielle de 2 mm d'épaisseur, cautériser la partie superficielle avec une lampe à souder sur une surface d'environ 25 cm² ; éliminer la pellicule carbonisée sur une surface en retrait de 1 cm par rapport à la surface cautérisée. Prélever en profondeur en utilisant un outil approprié (pinces, bistouri...) et déposer le prélèvement dans le récipient pour échantillon.

– Sur une carcasse :

le prélèvement est effectué, après cautérisation de la partie superficielle, sur des muscles pectoraux pour les carcasses de gros animaux, sur la cuisse pour les petits animaux.

• Prélèvement superficiel

Il se fait sans cautérisation préalable.

- Appliquer un cadre (fig. 12) qui permet de délimiter un carré de surface déterminée (exemple : 25 cm²).
- À l'aide d'un bistouri, inciser la viande en suivant le périmètre extérieur de la surface déterminée et dégager un lambeau superficiel de 2 à 3 mm d'épaisseur.
- S'il n'est pas possible d'appliquer un cadre, la surface de prélèvement est délimitée au bistouri.

Dans le cas où sont pratiqués à la fois un prélèvement de surface et un prélèvement en profondeur, il n'y a pas de cautérisation.

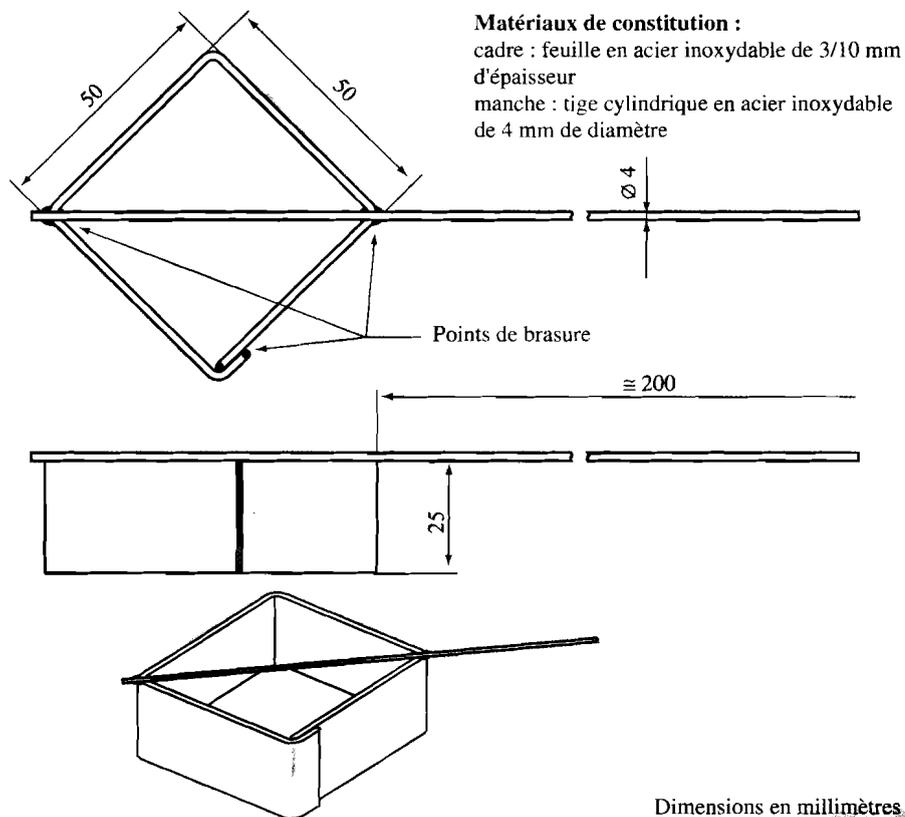


Fig. 12 – Cadre pour délimiter une zone de prélèvement superficiel

5.3.2.2. Prélèvement d'un échantillon congelé ou surgelé

• Prélèvement sans décongélation

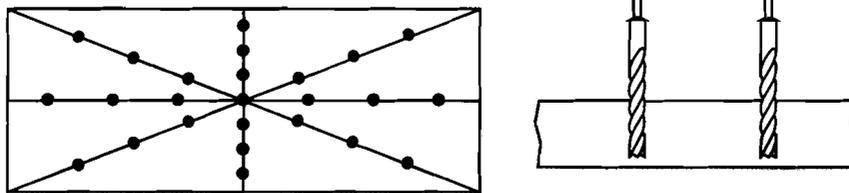
Les pièces de volume important sont perforées en un certain nombre de points à la perceuse électrique. Les copeaux obtenus sont recueillis à l'aide d'une spatule et placés dans le récipient pour prélèvement. Si seul le prélèvement en profondeur est demandé, un lambeau superficiel de 3 mm d'épaisseur est dégagé au ciseau à bois sur une surface d'environ 30 cm² ; la surface dégagée est cautérisée et le prélèvement en profondeur s'effectue comme précisé ci-dessus.

Si en revanche, seul le prélèvement superficiel est demandé, une surface est délimitée, elle n'est pas cautérisée, et, au moyen du ciseau à bois, un lambeau superficiel de 3 mm d'épaisseur est dégagé (fig. 13).

A Cas d'un pain non homogène

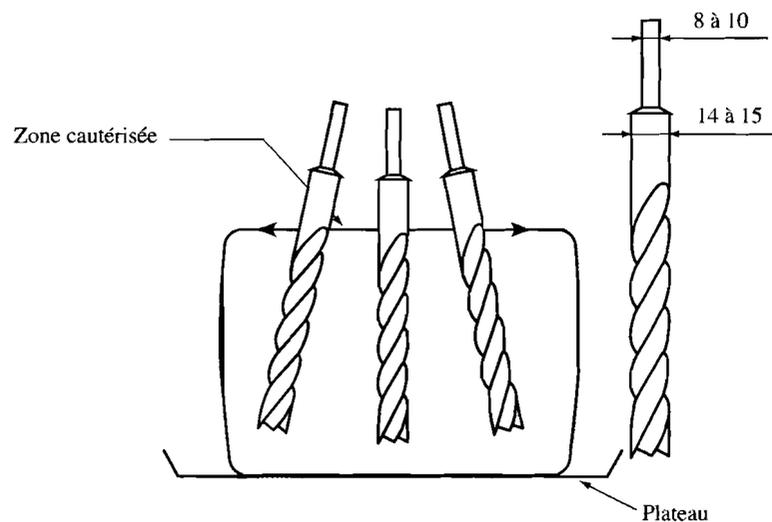
(morceaux comprimés agglomérés, congelés ou surgelés - masse : 25 kg à 30 kg)

Points de perforation : prélèvement global



B Cas d'une pièce homogène

Points et limites des perforation pour un prélèvement en profondeur



Dimensions en millimètres

Fig. 13 – Modalités de prélèvement sur une pièce ou un pain congelé ou surgelé

• Prélèvement après décongélation

L'échantillon est maintenu dans son conditionnement et est amené à une température de 20 à 25 °C pour que le cœur de l'échantillon atteigne une température de -1 °C. Cette élévation de température doit se réaliser en moins de 2 à 3 h.

Dans le cas de carcasses de volailles, la décongélation se fait en chambre froide et dure 15 à 16 h.

Les prélèvements se font ensuite selon les techniques décrites pour un produit réfrigéré.

5.3.2.3. Homogénéisation

Elle est réalisée pour constituer un échantillon homogène et est indispensable pour tout prélèvement de masse supérieure ou égale à 50 g.

Le prélèvement est haché (tête de hachoir stérile) après un éventuel prédécoupage ; le hachis est recueilli dans un sac en plastique, qui est fermé hermétiquement et sur lequel est réalisé le malaxage (Stomacher).

Pour les prélèvements de masse inférieure à 50 g, le malaxage seul suffit.

5.3.3. Méthodes de prélèvement aseptique des conserves

Ces méthodes sont élaborées selon la norme AFNOR NF V 08 403.

Les conserves peuvent se présenter sous différents emballages : boîtes métalliques, bocaux en verre, barquettes, sachets... La conserve est un produit biologiquement stable sur lequel on peut être amené à effectuer des analyses lorsqu'on recherche des causes de défauts de fabrication, ou au cours d'enquêtes menées lors de TIAC.

Les analyses doivent être conduites en aseptique. Malgré cette condition, la proportion de contamination exogène (« faux positifs ») est supérieure à 1 % du nombre de prélèvements élémentaires, ce qui se trouve être supérieur au % d'individus non conformes (de l'échantillon) considéré comme acceptable (généralement < 1 %).

Les analyses menées sur les conserves donnent des résultats « tout ou rien » : un résultat positif indique la présence de microorganismes, un résultat négatif, l'absence de microorganisme ; tout résultat positif est, de ce fait, entaché de suspicion.

Il est donc indispensable de réduire au maximum les risques de contamination exogène, que ce soit lors du prélèvement ou lors des analyses.

La verrerie utilisée, les outils sont stérilisés ; la stérilisation est contrôlée. Une enceinte à écoulement d'air unidirectionnel (hotte à flux laminaire) est préconisée.

5.3.3.1. Examen préalable

Les caractéristiques (figurant sur l'emballage) de l'individu de l'échantillon sont notées, de même qu'est noté l'aspect « normal » ou non de l'individu (selon la norme NF V 08 401).

5.3.3.2. Nettoyage de l'emballage

Le récipient est brossé avec une solution de détergent dans le cas de boîtes métalliques ou de bocaux. Les sertis et les joints sont nettoyés avec attention. Le séchage est effectué à l'aide de papier absorbant.

5.3.3.3. Désinfection de l'emballage

L'opération doit avoir lieu sous la hotte à flux laminaire. À l'aide de cotons hydrophiles : désinfecter à l'eau de Javel à 1,2 ° chlorométrique (100 mg/L de chlore) puis, après 10 minutes, recommencer l'opération avec de l'éthanol à 95 °. Laisser sécher.

5.3.3.4. Ouverture de l'emballage

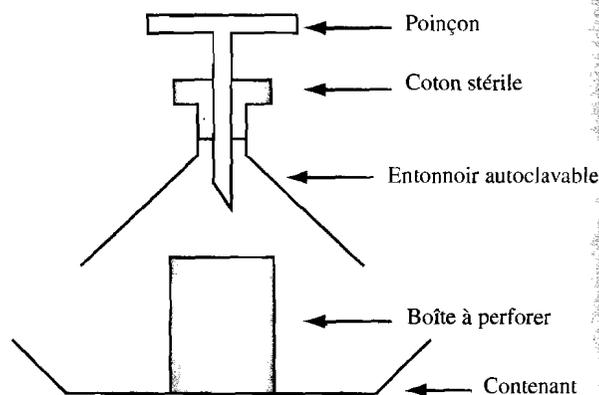


Fig. 14 – Dispositif pour la perforation des boîtes (NF V 04 501)

Il faut dans tous les cas faire attention aux risques de projection.

Immédiatement avant l'ouverture, passer un coton hydrophile imbibé d'éthanol à 95 ° à l'endroit où va se pratiquer l'ouverture.

- S'il s'agit d'une boîte métallique : utiliser le dispositif présenté figure 14 ou travailler sous hotte. Le matériel ayant été stérilisé au préalable, perforer la boîte à l'aide d'un poinçon et d'un marteau à manche métallique et, si nécessaire, agrandir l'ouverture à l'aide d'un ouvre-boîte à découpe circulaire.
- S'il s'agit d'un bocal à couvercle en verre avec joint de caoutchouc : ouvrir « normalement ».

5.3.3.5. Prélèvement du contenu

Le matériel utilisé dépend de la nature liquide ou solide du produit. Si le produit est mixte (liquide et solide), prélever dans les deux phases. Placer le prélèvement dans un flacon stérile et conserver à 4 °C jusqu'à l'analyse. Procéder à une homogénéisation si nécessaire.

5.4. Analyse microbiologique de l'échantillon pour essai

5.4.1. Catégories de microflores

Les microflores étudiées doivent refléter la qualité sanitaire et la qualité marchande du produit.

La flore totale mésophile aérobie est un indice du niveau de contamination globale de l'aliment.

Ainsi, en général, lorsque cette flore est présente à une concentration supérieure à 10^5 microorganismes par gramme, il y a une forte probabilité de trouver une flore pathogène associée. De même, si cette flore est de l'ordre de 10^6 à 10^7 microorganismes par gramme, il y a risque de voir apparaître très rapidement des détériorations de l'aliment. Il faudra interpréter les résultats de la quantification de la flore totale aérobie mésophile (voir chapitre IV) en tenant compte de son évolution, qui dépend du mode de conservation et du mode d'utilisation de l'aliment.

La recherche et le dénombrement des flores d'altération sont effectués car leur présence est susceptible de modifier la qualité marchande du produit sans qu'il y ait obligatoirement danger pour la santé du consommateur.

Ainsi, si le produit en cours de fabrication doit être conservé par réfrigération, on dénombre la flore psychrotrope. En revanche, si le produit doit subir un traitement thermique avant conservation ou utilisation, on dénombre la flore sporulée thermorésistante (voir chapitre IV).

Pour évaluer la qualité sanitaire du produit, il sera réalisé une quantification de microflores indicatrices de contamination fécale et une recherche de microflores spécifiques responsables de toxi-infection. La présence d'entérobactéries, de coliformes ou de coliformes thermotolérants témoigne d'une mauvaise qualité hygiénique du produit fini ou en cours de fabrication et peut être l'indice de la présence éventuelle de *Salmonella*.

D'autres microorganismes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* ou *Listeria monocytogenes* sont recherchés car leur présence met également directement en jeu la santé du consommateur (voir chapitre V).

L'étude détaillée des différentes catégories de microflores est présentée dans le chapitre IV pour la flore totale mésophile aérobie, pour les flores de contamination fécale et pour les flores d'altération, et dans le chapitre V pour les flores pathogènes.

5.4.2. Choix d'une méthode d'analyse

Le choix de la méthode d'analyse doit tenir compte de la nature de la microflore recherchée. Pour chaque microflore, il existe plusieurs méthodologies possibles. Dans le chapitre III sont présentées les différentes méthodologies de quantification des microorganismes. Par ailleurs, les différentes catégories de microflores sont étudiées dans les chapitres IV et V.

Pour choisir une méthode d'analyse en fonction des objectifs fixés, des tableaux sont proposés en annexe :

- l'ensemble des tableaux présentés en annexe 1 regroupe les critères microbiologiques pour chaque denrée alimentaire et pour chaque microflore étudiée ;
- les tableaux présentés en annexe 2 indiquent la ou les références des méthodes normalisées pour chaque denrée alimentaire et pour chaque microflore étudiée ;
- les tableaux présentés en annexe 3 regroupent des applications pour chaque méthodologie de quantification proposée ;
- les tableaux présentés en annexe 4 rassemblent et précisent les étapes des manipulations décrites dans les chapitres III, IV et V.

Les manipulations décrites dans cet ouvrage (chapitres III, IV et V) sont repérées par une astérisque dans chacun des tableaux présentés en annexe.

L'utilisation des tableaux peut se faire de la façon suivante :

- illustration d'une méthodologie de quantification (annexes 3 et 4) ;
- recherche ou dénombrement d'une microflore sur un produit (annexes 1 et 2) ;
- analyse linéaire d'un produit (annexes 1 et 2).

CHAPITRE III

MÉTHODES DE QUANTIFICATION DES POPULATIONS CONTAMINANTES

Les risques de porter atteinte à la santé des consommateurs et de voir apparaître des altérations de la qualité marchande d'un produit ne surviennent qu'à partir **d'une concentration critique en microorganismes**. Il est donc nécessaire de réaliser une évaluation quantitative des microorganismes contaminants. De nombreuses méthodes peuvent être utilisées, leur choix dépend des paramètres suivants :

- équipement nécessaire ;
- rapidité et simplicité de mise en œuvre ;
- délai d'obtention des résultats ;
- coût de l'analyse.

1. Dénombrement après culture

1.1. Méthodologie générale

Elle suit la **norme ISO 7218 du 5 mai 1996**, qui remplace la norme AFNOR NF V 08 002 de décembre 1985.

Il s'agit de mettre en culture sur un milieu approprié l'aliment pour lequel on souhaite réaliser un dénombrement, afin que les microorganismes présents dans l'inoculum introduit s'y développent et que leur développement puisse donner lieu à une évaluation quantitative.

Le développement des microorganismes dans un milieu de culture solide donne naissance à des colonies. Une colonie peut être issue d'un ou de plusieurs microorganismes formant un amas. Les colonies sont dénombrées et le résultat est exprimé en nombre **d'UFC (unité formant colonie) par mL** de suspension de départ, souvent assimilé cependant au nombre de microorganismes par mL.

Le développement des microorganismes en milieu liquide donne naissance à un trouble du milieu ou à une modification visible des caractéristiques du milieu, souvent le pH ; on conclut alors à la présence d'au moins un microorganisme ou à l'absence de microorganisme s'il n'y a ni trouble ni modification visible des caractéristiques du milieu.

L'évaluation quantitative d'une population nécessite une démarche adaptée à chaque recherche présentant plusieurs points communs :

- **le nombre d'échantillons à analyser par rapport au nombre total d'unités constituant le lot est déterminé** (voir chapitre II, paragraphe 5.2) ;
- **le volume, ou la masse de l'inoculum, est déterminé** puisque l'évaluation sera rapportée à l'unité de volume ou de masse : par mL, par 100 mL, par g ;
- **le milieu de culture** doit apporter l'ensemble des nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes à dénombrer ;
- **les conditions de culture** – température, oxygénation, durée – doivent permettre un développement convenable des microorganismes à dénombrer ;

- la concentration en microorganismes dans l'aliment testé peut être très variable :
 - elle peut être très élevée : 10^5 microorganismes par gramme. Dans ce cas, des dilutions de l'essai sont réalisées afin que cette concentration soit compatible avec la quantification,
 - elle peut être très faible : 1 microorganisme par gramme. Dans ce cas, les volumes testés sont importants et nécessitent une technique particulière. **La filtration sur membrane permet de dénombrer les microorganismes provenant d'un grand volume d'échantillon.**

1.1.1. Réalisation de la prise d'échantillon ou préparation de l'inoculum

Selon que l'aliment est solide ou liquide, la quantité analysée est déterminée en masse ou en volume.

1.1.1.1. Choix de la quantité d'échantillon pour essai

Dans le cas d'un aliment solide, il faut réaliser la pesée d'une masse d'aliment (m g), puis **une suspension mère** par mise en suspension et/ou broyage de la masse pesée dans un volume de diluant.

La masse volumique de l'aliment pesé est le plus souvent assimilée à 1 g/mL.

Les choix de la masse pesée et du volume de suspension mère réalisée dépendent du critère fixé et de la méthode utilisée.

Dans le cas où le critère est : « absence du microorganisme dans m grammes », la pesée de m g et la recherche du microorganisme dans la totalité de la masse sont obligatoires.

EXEMPLE

Recherche de *Salmonella* dans les produits végétaux crus ensaucés : absence dans 25 g.

Dans d'autres cas, la méthode impose la masse à peser et le volume de la suspension mère à réaliser.

EXEMPLE

Dénombrement des microorganismes aérobies dans des algues alimentaires. La méthode impose : m = 10 g ; volume de suspension mère SM = 300 mL. Soit :

$$N = N_{SM} \cdot \frac{300}{10}$$

N = nombre de microorganismes/g de produit

N_{SM} = nombre de microorganismes/mL de suspension mère.

La suspension mère peut ensuite être diluée : tout dépend de la concentration de la population recherchée.

Enfin, lorsque ni le critère ni la méthode n'imposent de masse ou de volume de suspension mère, la suspension réalisée a généralement un volume égal à 10 fois la masse m :

$$m = 10 \text{ g et } V_{SM} = 100 \text{ mL.}$$

Dans le cas d'un aliment liquide, le prélèvement de V mL est indiqué dans la méthode. Il est souvent de 1 mL, parfois de 100 mL, et il est alors réalisé en 10 fois 10 mL, ou nécessite une technique particulière de concentration.

C'est également le cas lorsque le volume imposé est très grand (Exemple : absence de *Salmonella* dans 5 L d'eau destinée à la consommation).

1.1.1.2. Homogénéisation de la prise d'échantillon pour essai

L'échantillon prélevé doit être un témoin convenable de la population de l'aliment dans son ensemble ou de la portion d'aliment analysé. Il faut donc homogénéiser l'aliment sans entraîner de destruction des microorganismes présents.

Dans le cas d'un aliment liquide, l'homogénéisation se fait par agitation et/ou retournement, puis prélèvement immédiat.

Dans le cas d'un aliment solide, deux types d'appareils sont utilisés :

- un broyeur à grande vitesse (turax), qui broie l'aliment dans son diluant ;
- le malaxeur de type Stomacher : on introduit l'aliment prélevé et son diluant dans un sac plastique puis on comprime vigoureusement ce sac entre deux plaques ; il en résulte le passage dans le diluant des microorganismes présents.

Les résultats obtenus avec les deux techniques sont relativement similaires, avec cependant souvent un facteur 10 entre les dénombrements après homogénéisation par malaxeur (x1) et les dénombrements après homogénéisation par broyage (x10).

Par ailleurs, on constate moins de mortalité par Stomacher pour certains microorganismes tels *E. coli*.

Les avantages du malaxage par Stomacher par rapport au broyage sont les suivants :

- pas d'échauffement pendant le broyage, ce qui entraîne une diminution de la létalité ;
- possibilité de conserver la suspension mère ainsi réalisée dans le sac plastique, de la congeler en vue de tests futurs ;
- possibilité de réaliser des suspensions de 40 à 400 mL.

REMARQUE

Dans le cas particulier d'une recherche de surface d'un aliment solide, le prélèvement se fait alors par écouvillonnage de surface et mise en suspension, ou par application d'une membrane humide. Ces prélèvements seront détaillés lors des manipulations ayant trait à ce type de contrôle.

1.1.2. Dilutions du prélèvement ou de la suspension mère

1.1.2.1. Nature du diluant

Eau physiologique (pour la plupart des aliments liquides)		
Milieu tryptone sel	Milieu peptone sel	Eau peptonée tamponnée
Tryptone 1 g Na Cl 8,5 g Eau distillée 1 000 mL pH 7	Peptone pancréatique de caséine ... 1 g Na Cl 8,5 g Eau distillée 1 000 mL pH 7	Peptone pepsique de viande 10 g Na Cl 5 g Na ₂ PO ₄ 9 g KH ₂ PO ₄ 1,5 g Eau distillée 1 000 mL pH 7,2
Phosphate dipotassique à 2 % : pH 7,4-7,6		
Ringer dilué au 1/4		

Tableau 1 - Composition des diluants les plus couramment utilisés

Pour les méthodes officielles, les diluants sont précisés à l'annexe 2 de l'arrêté du 21 décembre 1979 « relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale » ; certains diluants spécifiques sont donnés dans les normes spécifiques des produits.

1.1.2.2. Technique des dilutions

La technique des dilutions figure dans la norme AFNOR NF V 08 010 de mars 1996 (remplace la norme AFNOR NF V 08 010 de juin 1982) ; il existe parallèlement une norme ISO 6887 de 1983.

Les dilutions sont presque toujours des dilutions successives décimales de raison 10 : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ...

Si les dilutions sont réalisées dans un volume de 9 mL de diluant en tube à essais, les prélèvements sont faits soit à la pipette stérile à usage unique de 1 mL, soit à l'aide d'une pipette automatique prélevant et délivrant 1 000 μ L ; le volume final est de 10 mL. Si elles sont réalisées dans un volume plus faible, par exemple 0,9 mL ou 900 μ L en tube à hémolyse, le prélèvement se fait alors à la pipette automatique prélevant et délivrant un volume de 100 μ L ; le volume final est de 1 mL.

L'incertitude des mesures des volumes ne doit pas excéder 2 %.

Entre la préparation de la suspension, ses dilutions et la mise en culture, il ne doit pas s'écouler plus de 45 minutes.

Technique de dilution

- Marquer les tubes de diluant (Exemple : 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}).
- Prélever aseptiquement 1 mL de la suspension mère à l'aide d'une pipette graduée stérile de 1 mL munie d'une poire à aspiration ; l'homogénéisation du prélèvement se fait par aspiration et refoulement trois fois, ou par l'utilisation d'un homogénéisateur (norme NF ISO 7218).
- Transférer aseptiquement le mL prélevé dans le premier tube 10^{-1} , la pipette ne devant pas pénétrer dans les 9 mL de diluant.
- Jeter la pipette utilisée dans un conteneur approprié. À l'aide d'une deuxième pipette stérile de 1 mL, procéder de même du tube 10^{-1} au tube 10^{-2} .
- Faire de même pour les deux derniers tubes, en utilisant à chaque prélèvement une pipette nouvelle.

1.1.2.3. Choix des dilutions réalisées et testées

Ce choix dépend du critère fixé et de la méthode utilisée.

Il s'agit de savoir si l'aliment répond au critère fixé, donc si la population recherchée est inférieure à celle donnée par le critère, autorisant la consommation de l'aliment.

Lorsque le nombre de microorganismes attendu dans l'échantillon est très faible, certains aliments ne nécessitent pas de dilution.

Si des dilutions sont nécessaires, celles-ci dépendent de la méthode choisie : du volume d'inoculum, de la limite de dénombrement.

EXEMPLES

DÉNOMBREMENT RÉALISÉ EN MILIEU SOLIDE

Dénombrement de la flore totale mésophile aérobie du lait cru destiné à la consommation en l'état.

D'après l'arrêté du 30 mars 1994, le critère microbiologique est le suivant :

$$N < 5 \cdot 10^4 \text{ microorganismes/mL de lait.}$$

Les laits analysés contiennent-ils plus ou moins de $5 \cdot 10^4$ germes mésophiles aérobies par mL ?

On considère un lait satisfaisant au critère (lait n° 1) et un lait ne satisfaisant pas au critère (lait n° 2).

Dans chacun des cas, pour un inoculum de 1 mL des dilutions réalisées, les résultats attendus (nombre de colonies par boîte) sont les suivants :

Dilutions lait cru	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Nombre de colonies							
Lait n° 1	$< 5 \cdot 10^4$	$< 5 \cdot 10^3$	$< 5 \cdot 10^2$	< 50	< 5	$< 0,5$	0
Lait n° 2	$> 5 \cdot 10^4$	$> 5 \cdot 10^3$	$> 5 \cdot 10^2$	> 50	> 5	$> 0,5$	0

Sachant que le dénombrement se réalise à partir de boîtes donnant un nombre de colonies compris entre 15 et 300, les dilutions $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}$ ne permettront pas de différencier les deux laits, pour ce qui concerne la concentration en microorganismes.

La dilution 10^{-3} peut, à elle seule, permettre d'obtenir une réponse ; la dilution 10^{-4} peut permettre un dénombrement dans le cas d'un lait dont la concentration en microorganismes dépasse le critère fixé. Les dilutions 10^{-5} et 10^{-6} sont inutiles.

Il s'agira donc d'ensemencer les dilutions $10^{-3}, 10^{-4}$ et, éventuellement, 10^{-2} .

DÉNOMBREMENT RÉALISÉ EN MILIEU LIQUIDE

Dénombrement des coliformes dans une crème pâtissière.

Le critère microbiologique est le suivant : $N < 10^3$ microorganismes coliformes par gramme.

La crème contient-elle plus ou moins de 10^3 coliformes par gramme ?

Un échantillon de 1 g est pesé et homogénéisé dans le diluant.

La suspension mère est réalisée sous un volume de 100 mL.

La relation entre la concentration en microorganismes de la crème et de la concentration en microorganismes de la suspension mère est la suivante :

$$N = N_{SM} \cdot \frac{100}{1}$$

N : nombre de microorganismes/g de produit.

N_{SM} : nombre de microorganismes/mL de suspension mère.

si $N = 10^3$ coliformes par gramme, alors :

$$N_{SM} = 10^3 \cdot \frac{1}{100} = 10^1 \text{ coliformes par mL de suspension mère.}$$

On considère une crème satisfaisant au critère (crème n° 1) et une crème ne satisfaisant pas au critère (crème n° 2).

Dans chaque cas, la concentration de microorganismes contenus dans une prise d'essai de 1 mL des dilutions réalisées est la suivante :

Dilutions suspension mère	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Nombre de microorganismes par mL				
Crème n° 1	< 10	< 1	$< 0,1$	0
Crème n° 2	> 10	> 1	$> 0,1$	0

Lorsque le dénombrement est réalisé en milieu liquide en tube, on peut conclure à la présence (trouble) ou à l'absence du microorganisme recherché (absence de trouble). Mais la présence d'un trouble peut signifier présence de un ou de plusieurs microorganismes.

Seule la dilution 10^{-1} est discriminante puisqu'elle permet de différencier :

- une réponse positive : plus de 1 microorganisme, donc apparition d'un trouble ou d'une modification du milieu ;
- une réponse négative : moins de 1 microorganisme, donc ni trouble ni modification du milieu.

L'exploitation statistique des résultats nécessite de traiter trois dilutions successives au moins.

1.1.3. Choix des milieux de dénombrement

Les milieux solides sont beaucoup plus largement utilisés que les milieux liquides. Ces derniers le sont essentiellement pour des microorganismes dont la culture directement sur milieu solide présenterait des difficultés, au sortir de leur milieu d'origine.

Les milieux solides permettent quant à eux une différenciation des types de microorganismes dénombrés, par l'aspect différent des colonies obtenues, résultant de l'utilisation d'un composant du milieu ou de la production d'un métabolite spécifique.

Dans le cas où les germes que l'on cherche à dénombrer représentent une population globale, le milieu de dénombrement choisi est suffisamment riche pour permettre la croissance de la plupart des microorganismes potentiellement présents.

Dans le cas où les microorganismes que l'on cherche à numérer représentent une population spécifique, le milieu de dénombrement choisi permet la culture de cette population mais aussi, le plus souvent, sa sélection par rapport aux autres germes présents dans l'aliment, et sa caractérisation selon un caractère mis en évidence sur le milieu.

Population dénombrée	Nom du milieu	Cible	Composition du milieu
Globale	Gélose au lait écrémé	Flore mésophile aérobie du lait et des produits laitiers.	Peptone pancréatique de caséine 5 g Extrait de levure 2,5 g Glucose anhydre 1,0 g Lait écrémé en poudre exempt de substances inhibitrices 1,0 g Agar 12 à 18 g Eau distillée qsp 1 000 mL
Globale	Gélose Wallerstein (WL) nutritive	Microorganismes des boissons fermentées.	Extrait de levure 4 g Caséine hydrolysée 5 g Glucose 0 g Dihydrogénophosphate de potassium 0,5 g Chlorure de potassium 0,425 g Chlorure de calcium 0,125 g Sulfate de magnésium 0,125 g Chlorure de fer 0,0025 g Sulfate de manganèse 0,0025 g Vert de bromocrésol 0,022 g Agar 17 g Eau distillée qsp 1 000 mL Eau distillée qsp 1 000 mL
Spécifique	Gélose lactosée au désoxycholate de sodium	Coliformes et Coliformes thermotolérants.	Peptone pancréatique de caséine 10 g Lactose 10 g Désoxycholate de sodium 0,5 g Citrate de sodium 2 g Chlorure de sodium 5 g Rouge neutre 0,03 g Agar 12 à 18 g Eau distillée qsp 1 000 mL
Spécifique	Gélose Baird-Parker	<i>Staphylococcus aureus</i> .	Peptone pancréatique de caséine 10 g Extrait de levure 1 g Extrait de viande 1 g Glycine 12 g Chlorure de lithium 5 g Agar 12 à 18 g Eau distillée qsp 1 000 mL Pour 90 mL de milieu en surfusion ajouter : Tellurite de potassium 1 % 1 mL Pyruvate de sodium 20 % 5 mL Émulsion de jaune d'œuf 20 % 5 mL

Tableau 2 - Milieux de dénombrement en fonction de la cible

La gélose lactosée au désoxycholate de sodium est utilisée pour le dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants dans la plupart des aliments (laits pasteurisés). La sélection se fait par la présence de désoxycholate, la caractérisation se fait par la mise en évidence de la fermentation du lactose présent.

La gélose Baird-Parker est utilisée pour le dénombrement des *Staphylococcus aureus* dans la plupart des aliments. La sélection est assurée par le tellurite, la caractérisation se fait par la réduction du tellurite en tellure et par la production d'exoenzymes agissant sur les composants du jaune d'œuf.

1.1.4. Choix des conditions d'incubation

Le but est d'obtenir un résultat, c'est-à-dire un développement des microorganismes présents dans des délais relativement brefs, donc d'assurer des conditions de développement optimal ou des conditions sélectives.

1.1.4.1. Oxygénation

Les microorganismes aérobies stricts ou aérobies facultatifs sont cultivés indifféremment en milieu liquide ou solide en atmosphère ordinaire.

Les germes anaérobies stricts nécessitent une atmosphère sans oxygène :

- soit par une culture dans la profondeur d'un milieu préalablement régénéré, c'est-à-dire privé d'oxygène par ébullition pendant 30 minutes et laissant, lors de l'incubation, peu pénétrer l'oxygène par dissolution. Ceci est obtenu par le maintien d'une faible surface de contact milieu – atmosphère (culture en tube) ;
- soit par un développement de culture en atmosphère privée d'oxygène par un mécanisme chimique permettant la transformation de l'oxygène présent dans l'enceinte close, et la production de gaz carbonique (jarre d'anaérobiose et système de production de CO₂).

1.1.4.2. Température d'incubation

Les températures d'incubation sont fixées par les normes établies (exemple : NF V 08 019 de décembre 1985/ISO 7937) pour chaque dénombrement et correspondent :

- soit à la température optimale de développement de chaque germe :
 - flore mésophile aérobique : 30 °C +/- 1 °C,
 - coliformes : 30 °C +/- 1 °C ou 35 °C ou 37 °C,
 - *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* : 37 °C +/- 1 °C,
 - anaérobies sulfitoréducteurs : 37 °C ;
- soit à une température sélective : coliformes thermotolérants : 44 °C +/- 0,5 °C (à 44 °C, seuls ces coliformes sont capables de fermenter le lactose en produisant du gaz et ce caractère sert à leur dénombrement).

Certains dénombrements sont réalisés à des températures qui leur sont spécifiques : ainsi le dénombrement des bactéries aérobies revivifiables de l'eau destinée à la consommation humaine se réalise, selon l'arrêté du 20 février 1990 :

- en 3 jours à 22 °C, norme AFNOR NF T 90 402 : conditions optimales pour la plupart des bactéries saprophytes banales ;
- en 24 heures à 37 °C, norme AFNOR NF T 90 401 : conditions optimales pour les bactéries d'origine animale et humaine.

1.1.4.3. Durée d'incubation

Elle varie en fonction du germe et de la technique utilisée pour son dénombrement.

D'une façon générale, une lecture après 24 heures permet un résultat (par exemple : coliformes, dénombrement en milieu gélosé).

D'autres dénombrements se lisent indifféremment, après une incubation allant de 24 à 48 heures (par exemple : streptocoques du groupe D en milieu gélosé).

Certains dénombrements nécessitent une première lecture à 24 heures, confirmée par une seconde à 48 heures ; d'autres nécessitent une lecture à 3 puis 5 jours (levures et moisissures).

1.2. Méthodes en milieu solide : estimation de la flore viable

Le principe de ces méthodes s'appuie sur le fait qu'un microorganisme présent dans un aliment ou dans une suspension de cet aliment, mis en culture, dans des conditions optimales, en milieu solide convenable, s'y développe en formant une colonie ou une microcolonie.

Il s'agit de faire correspondre un microorganisme à une UFC (unité formant colonie) puisque, dans certains cas, le développement de plusieurs bactéries groupées peut conduire à une unique colonie.

Sur ce principe, plusieurs techniques sont pratiquées tant dans les laboratoires industriels pour la réalisation des autocontrôles que dans les laboratoires chargés de contrôler l'application des critères établis par les textes officiels. Ces méthodes sont soit des méthodes horizontales, dites de référence, et des méthodes horizontales dites de routine, applicables à toute flore et à tout produit, soit des méthodes spécifiques à une flore et à un produit.

1.2.1. Méthode standard : culture dans la masse d'en milieu gélosé

Cette méthodologie a de multiples applications : elle est particulièrement utilisée pour les dénombrements des microorganismes mésophiles aérobies.

1.2.1.1. Méthode standard : *plate count agar* (PCA)

Les étapes de cette méthode sont les suivantes :

- inoculation de 1 mL de suspension ou de ses dilutions dans le fond d'une boîte de Petri. Chaque essai est testé deux fois au minimum ;
- homogénéisation dans V mL de milieu de culture approprié et maintenu en surfusion ;
- incubation à t °C pendant x h ;
- dénombrement des colonies :
 - en surface : elles ont un aspect « normal »,
 - en profondeur : elles ont un aspect lenticulaire.

Technique d'ensemencement dans la masse

- Marquer les boîtes de Petri vides (exemple : 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).
- Homogénéiser les tubes de dilution.
- À l'aide d'une pipette stérile de 1 mL, transférer aseptiquement, en double, 1 mL de la dilution 10^{-4} sous forme de gouttes dans le fond de chacune des deux boîtes de Petri.
- Avec cette même pipette, procéder identiquement pour les dilutions 10^{-3} puis 10^{-2} .
- Couler dans la zone d'aseptie 15 mL de milieu gélosé maintenu à 47 °C dans chaque boîte de Petri ; cette addition doit avoir lieu au plus tard 15 minutes après le dépôt des gouttes.
- Mélanger l'inoculum au milieu, par rotation délicate dans les deux sens.
- Laisser le milieu prendre en masse : les boîtes sont sur une surface plane, non chaude, dans la zone de stérilité, le couvercle légèrement déplacé (ne pas excéder 10 mm).
- Une fois le milieu solidifié, retourner les boîtes et les incuber dans l'étuve à la température convenable pendant le temps indiqué.

1.2.1.2. Variantes de la méthode standard

Pour éviter le développement en surface, il est possible de poursuivre l'étape 2 par l'addition d'une couche d'agar non nutritif ou d'une couche de milieu identique au milieu de culture : c'est la technique de la double couche.

Culture en gouttelettes d'agar (Fig. 1) : la suspension mère ou une dilution est inoculée (1 mL) dans 9 mL d'un milieu gélosé convenable maintenu en surfusion. À partir de ce tube, on dépose, à l'aide de pipettes calibrées, 0,1 mL de milieu inoculé sur le fond d'une boîte de Petri ; ce dépôt forme une gouttelette. On pratique ensuite des dilutions successives à partir du premier tube dans deux autres tubes de milieu gélosé. On dénombre ensuite les microcolonies qui se sont développées.

L'avantage que présente cette méthode par rapport à la méthode standard est d'une part le développement plus rapide pour les germes aérobies, d'autre part la possibilité de tester plusieurs essais (ici quatre) par dilution, et plusieurs dilutions par produit sur chaque boîte.

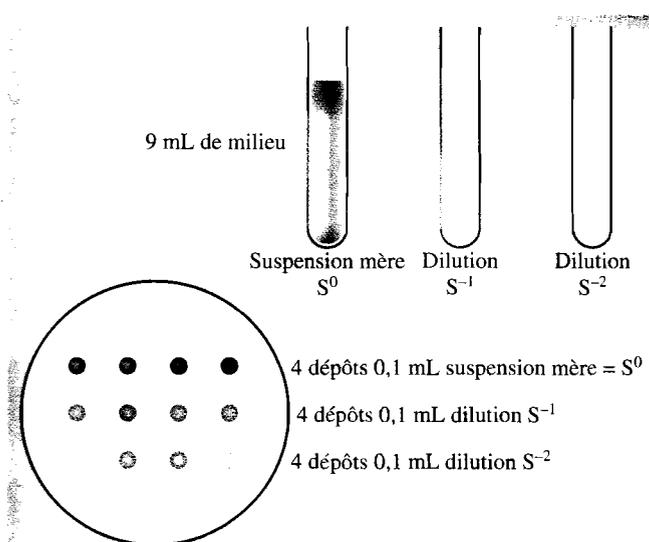


Fig. 1 - Culture en gouttelettes d'agar

1.2.2. Méthode standard : culture en surface d'un milieu gélosé

Cette méthode, dite *Surface count*, est conseillée pour les germes thermosensibles risquant une destruction ou une altération lors de l'homogénéisation en milieu gélosé en surfusion (47 à 50 °C). Elle est aussi recommandée lorsque la description des colonies peut être utile à l'identification des germes dénombrés.

On l'utilise également lorsque le dénombrement se fait sur milieu sélectif avec mise en évidence d'un caractère particulier. C'est enfin la technique indispensable si le dénombrement est suivi d'un repiquage des colonies « présumées » pour une identification.

Les étapes sont les suivantes :

- le milieu gélosé convenable est coulé en boîte de Petri ;
- l'inoculum (0,1 ou 0,2 mL) est déposé puis étalé à l'aide d'un étaleur de verre (« pipette râteau ») ou par agitation de billes de verre. Les essais sont doublés ;
- incubation à t °C pendant x h ;
- dénombrement des colonies.

Technique d'ensemencement en surface

- Marquer les boîtes de milieu gélosé (exemple : 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}).
- Homogénéiser les tubes de suspension mère et de dilution.
- À l'aide d'une pipette stérile de 1 mL, transférer aseptiquement, en double, 0,1 mL de la dilution 10^{-2} à la surface de chacune des deux boîtes de milieu gélosé séchées.
- Avec cette même pipette, procéder de manière identique pour la dilution 10^{-1} puis 10^0 .
- Étaler l'inoculum, avec soin et rapidement, à la surface du milieu gélosé, à l'aide d'un étaleur stérile en évitant de toucher les parois de la boîte, ou à l'aide de billes de verre agitées énergiquement et ensuite éliminées.
- Laisser sécher 15 minutes à température du laboratoire.
- Incuber les boîtes retournées à l'étuve, à la température convenable, pendant le temps indiqué.

1.2.3. Méthode standard : culture en profondeur d'un milieu gélosé

Cette méthodologie est utilisée pour les microorganismes anaérobies stricts ou pour des microorganismes à métabolisme fermentaire dont le développement est favorisé par l'anaérobiose.

Elle est également pratiquée lorsque doivent être dénombrées dans un produit les spores de microorganismes anaérobies stricts.

Les étapes sont les suivantes :

- le milieu gélosé est coulé à raison de 10 mL en tube en verre ; il est régénéré avant d'être ensemencé et est maintenu en surfusion jusqu'à son ensemencement ; le milieu peut être en concentration double pour les inoculum de 10 mL, ceci afin de ne pas trop diluer les nutriments contenus dans le milieu ;
- l'inoculum et ses dilutions sont introduits dans des tubes en verre (ils seront éventuellement soumis à un traitement thermique si, seules, les spores thermorésistantes sont dénombrées). L'inoculum peut être de 10 mL et de 1 mL pour la suspension mère, il est de 1 mL pour les dilutions de cette suspension ;
- l'ensemencement des tubes contenant l'inoculum par le milieu régénéré et l'homogénéisation qui suit ne doivent pas introduire de bulles d'air dans le milieu ;
- l'incubation, après solidification du milieu, se fait à t °C pendant x heures ;
- le dénombrement des colonies dans la profondeur de la gélose est réalisé après incubation.

1.2.4. Exploitation des résultats des dénombrements par les méthodes standard

Dans les méthodes standard, le dénombrement des colonies se fait après une incubation allant de 18 à 72 heures.

Les essais ne sont validés que si au moins une boîte présente plus de 15 colonies.

On estime qu'à 1 UFC (unité formant colonie) correspond 1 microorganisme.

Le résultat final est donné en concentration en microorganismes par unité de volume ou de masse de la prise d'essai.

1.2.4.1. Choix des essais servant au calcul

Seuls les essais, ici boîtes inoculées et incubées, comportant de 15 à 300 colonies sont utilisés.

En fait, cette règle subit quelques modifications indiquées dans les normes correspondantes, par exemple :

- le dénombrement de la flore aérobie du lait pasteurisé peut se faire à l'aide d'essais présentant de 10 à 300 colonies ;
- le dénombrement des coliformes du lait pasteurisé se fait à l'aide d'essais présentant moins de 150 colonies.

Seules les colonies ayant un diamètre supérieur à 0,5 mm après la durée d'incubation convenable sont prises en compte pour la numération. Deux essais par dilution sont testés.

Cas particulier : dans le cas où l'on a effectué le dénombrement en gouttelettes d'agar ou par gouttes calibrées, le dénombrement se réalise uniquement sur les essais présentant moins de 20 microcolonies.

1.2.4.2. Calcul du nombre de microorganismes par unité d'échantillon

• Cas général sans identification d'après la norme ISO 7218 de mai 1996

On considère deux dilutions successives ayant donné au moins une boîte contenant plus de 15 colonies.

On calcule le nombre N de microorganismes présents dans l'unité de mesure de l'échantillon, selon la formule :

$$N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{V_{SM}}{V_{pr}}$$

Σc = nombre total de colonies comptées sur les boîtes retenues.

n_1 = nombre de boîtes comptées à la dilution retenue la plus faible (10^{-1} dans l'exemple ci-après).

n_2 = nombre de boîtes comptées à la seconde dilution retenue.

d = facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages sont réalisés : dilution la plus faible (10^{-1} dans l'exemple ci-après).

V = volume de prise d'essai inoculé en mL.

V_{SM} = volume de la suspension mère en mL.

V_{pr} ou m_{pr} ou S_{pr} = volume de produit (mL) ou masse de produit (g) ou surface de produit (cm²) ayant constitué la suspension mère.

DÉNOMBREMENT EN PROFONDEUR

$V = 1$ mL

Produit = suspension mère, donc $V_{SM}/V_{pr} = 1$

Dilution	10^{-1}	10^{-2}
Colonies	168	25
Colonies	215	14

$$N = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-1}} \cdot \frac{1}{1} \cdot \frac{1}{1} = 1\,918$$

Lorsque pour une dilution (exemple : dilution 10^{-2}), une boîte contient au moins 15 colonies, il faut prendre en compte les autres boîtes de la même dilution.

On ne retient que deux chiffres significatifs :

– si le 3^e chiffre est < 5 → le 2^e chiffre n'est pas modifié ;

– si le 3^e chiffre est ≥ 5 → le 2^e chiffre est augmenté d'une unité.

Le résultat est exprimé par un nombre compris entre 1,0 et $9,9 \cdot 10^n$.

Exemple :

– 3 240 → $3,2 \cdot 10^3$;

– 3 260 → $3,3 \cdot 10^3$.

Ici : 1918 → 1920 → $1,9 \cdot 10^3$ ⇒ $N = 1,9 \cdot 10^3$ microorganismes par mL d'échantillon.

DÉNOMBREMENT EN SURFACE

$V = 0,1$ mL

Produit = suspension mère, donc $V_{SM}/V_{pr} = 1$

Dilution	10^{-1}	10^{-2}
Colonies	126	18
Colonies	145	16

$$N = \frac{126 + 145 + 16 + 18}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-1}} \cdot \frac{1}{0,1} \cdot \frac{1}{1} = 13\,863$$

On ne retient que deux chiffres : ici 13 863 → 13 900 → 14 000.

$N = 1,4 \cdot 10^4$ microorganismes par mL d'échantillon.

• **Cas après identification d'après la norme ISO 7218 de mai 1996**

Dans le cas où la méthode utilisée nécessite une identification des colonies précédemment dénombrées, on repique A colonies (en général A = 5) de chaque boîte retenue pour le dénombrement, sur un milieu d'identification approprié :

- soit C = le nombre total de colonies pour une boîte de dénombrement ;
- soit A = le nombre de colonies repiquées pour cette boîte de dénombrement ;
- soit b = le nombre de colonies repiquées et effectivement identifiées.

Alors on déduit : $a = b \cdot \frac{C}{A}$ avec a = nombre total calculé de colonies confirmées.

Le nombre N de microorganismes identifiés présents dans l'unité d'échantillon est calculé selon la formule :

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{V_{SM}}{V_{pr}}$$

EXEMPLE

Dilution	C	A	b	a	C	A	b	a
10 ⁻¹	168	5	4	134	215	5	5	215
10 ⁻²	25	5	3	15	14	5	4	11

Les nombres sont entiers, arrondis selon les règles données ci-dessus.

Dans le cas où V = 1 mL et produit = suspension mère, donc $V_{SM}/V_{pr} = 1$

$$N = \frac{134 + 15 + 215 + 11}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-1}} \cdot \frac{1}{1} \cdot \frac{1}{1} = 1\,705$$

N = 1,7.10³ microorganismes identifiés par mL d'échantillon.

• **Cas des petits nombres d'après la norme ISO 7218 de mai 1996**

Si les deux boîtes de la dilution la plus faibleensemencées par 1 mL d'échantillon contiennent moins de 15 colonies, on fait la moyenne arithmétique des colonies dénombrées. Soit y cette moyenne :

N = y microorganismes par mL d'échantillon.

Si les deux boîtes de la dilution la plus faible ne contiennent aucune colonie, exprimer le résultat par :

N = moins de 1 microorganisme par mL d'échantillon.

• **Autres méthodes de calcul**

La norme FIL (Fédération internationale de Laiterie) 100 A 1984 (agrée ISO) figure à l'annexe de la norme AFNOR NF V 04 016.

La formule de calcul est identique à celle de la norme AFNOR. Il existe cependant deux cas particuliers :

- si les essais contiennent moins de 10 colonies, le résultat exprimé sera : N < 10.d (d étant le facteur de dilution le plus faible) ;
- si les essais contiennent plus de 300 colonies, on réalise le dénombrement sur la dilution la plus forte et le résultat exprimé sera accompagné de « nombre estimé » de...

• **La norme AFNOR V 04 016 de 1985**

Cette norme n'est plus en vigueur, ses règles ne sont données ici qu'en matière de comparaison avec la norme actuelle.

EXEMPLE 1

Il existe au niveau d'une seule et même dilution deux boîtes contenant entre 30 et 300 colonies, ou une boîte contenant entre 30 et 300 et l'autre moins de 30.

On calcule la moyenne du nombre de colonies comptées dans les deux boîtes.

Si une seule boîte contient entre 30 et 300 colonies, on ne dénombre que cette boîte et on ne retient alors que deux chiffres significatifs.

Soit n le nombre retenu :

$$N = n \cdot \frac{1}{d \cdot V}$$

d = facteur de la dilution.

V = volume de l'inoculum en mL.

N = concentration en microorganismes/mL.

EXEMPLE 2 D'APPLICATION DU CALCUL

Dilution	Colonies	Colonies	Σc
10^{-1}	16	12	32
10^{-2}	1	3	

$$\delta = \frac{32 + 1,92 \pm 1,96\sqrt{32}}{2,2 \cdot 10^{-1}} \cdot \frac{1}{1}$$

$$\delta = 205 \quad \text{et} \quad \delta = 104$$

$$N = \frac{16 + 1 + 12 + 3}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-1}} \cdot \frac{1}{1}$$

$N = 1,5 \cdot 10^2$ microorganismes/mL d'échantillon.

Les limites de l'intervalle de confiance sont : $1,0 \cdot 10^2$ et $2,1 \cdot 10^2$ microorganismes par mL d'échantillon.
Ces limites calculées en pourcentage sont de - 28 % et + 41 %.

Expression du résultat : $1,0 \cdot 10^2 < N < 2,1 \cdot 10^2$
-28 % + 41 %

REMARQUE

Dans l'annexe A de la norme ISO 7218 figurent des tableaux donnant les limites de l'intervalle de confiance pour l'estimation de petits nombres : moins de 15 colonies par boîte de dénombrement.

1.2.5. Variantes de la méthode standard de dénombrement en surface d'un milieu gélosé

1.2.5.1. Développement en surface après filtration sur membrane

Cette méthodologie est particulièrement utilisée pour effectuer des dénombrements dans des liquides alimentaires pour lesquels la concentration en microorganismes recherchés est relativement faible et/ou pour lesquels le dénombrement sur un grand volume est nécessaire.

La prise d'essai est filtrée à travers une membrane retenant les microorganismes ; cette membrane est ensuite déposée sur un milieu de culture permettant le développement des microorganismes recherchés.

• Principe et mise en œuvre de la méthode

L'échantillon, souvent de 100 mL, parfois de 10 mL, a été filtré sur une membrane permettant la concentration des microorganismes présents dans l'échantillon.

Le filtre membrane est le plus souvent un mélange d'acétate et de nitrate de cellulose, biologiquement inerte :

- filtre type MF (Millipore) série HA : pores de $0,45 \mu\text{m}$ de diamètre (Fig. 2 et fig. 3) ;
- filtre type MF (Millipore) série HC : pores de $2,4 \mu\text{m}$ en surface se resserrant jusqu'à $0,7 \mu\text{m}$. Ce filtre est particulièrement adapté aux eaux contenant des particules colmatantes et au dénombrement des coliformes pouvant avoir été endommagés par le chlore des traitements.

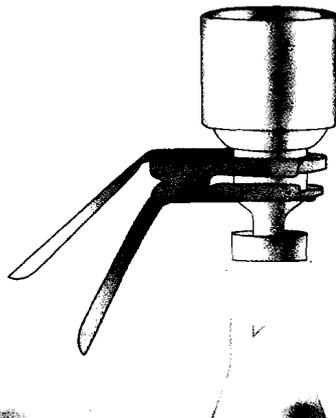


Fig. 2 – Montage du système de filtration (Millipore)

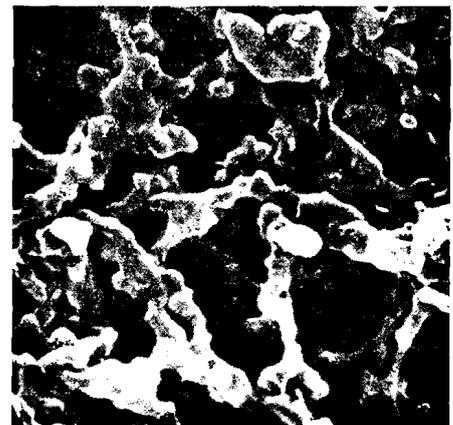


Fig. 3 – Photographie d'une membrane $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore)

La dimension de la membrane est adaptée à la dimension de la boîte de Petri contenant le milieu. La membrane est ensuite déposée en surface d'un milieu gélosé, et le tout est incubé 18 à 24 heures. Les nutriments du milieu traversent la membrane par capillarité et permettent le développement des bactéries.

Le dénombrement est facilité par la présence de quadrillage sur la membrane.

Un préfiltre peut être utilisé pour protéger le filtre membrane et en éviter le colmatage : il est composé de polymères de cellulose, homogènes et microporeux (exemple : filtre membrane AW 03 ou AW 06 de chez Millipore).

• Exploitation des résultats

– Cas général sans identification

Chaque colonie est considérée comme ayant été engendrée par un microorganisme.

Seules les membranes comportant au plus 100 colonies sont utilisables : ceci pour des filtres membranes adaptés à des petites boîtes de Petri de 6 cm de diamètre.

La formule permettant le calcul du nombre de microorganismes par unité d'échantillon est la suivante : $N = n \cdot \frac{1}{V}$

n = nombre de colonies identifiées et comptées sur la membrane.

V = volume en mL de l'échantillon, ou de sa dilution, filtré.

Si une dilution de l'échantillon a été nécessaire, ce résultat sera multiplié par l'inverse du taux de dilution pratiqué.

– Cas après identification

On repique A colonies selon la règle suivante : – si $n < 5$: $A = n$

– si $5 < n < 25$: $A = 5$

– si $n > 25$: $A = n^{1/2}$

Soit b = le nombre de colonies repiquées effectivement identifiées : $N = (n.b) \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{V}$

• Méthodes dérivées

On peut obtenir un dénombrement anticipé en 5 heures par numération des microcolonies après transparisation de la membrane et traitement permettant de visualiser les microcolonies. Il faut alors utiliser des membranes adaptées type MF transparisables par un mélange acétone triacétine ou diméthylphthalate diméthoxyylate. Pour les contrôles de produits liquides, des échantillonneurs ont été développés.

La membrane filtrante ($0,45 \mu\text{m}$) peut être solidaire d'un tampon absorbant contenant un milieu nutritif déshydraté (Fig. 4). L'ensemble est plongé dans l'échantillon liquide ; la capacité d'absorption du tampon est de 1 mL. Le liquide est filtré à travers la membrane et les microorganismes y sont retenus. Le liquide réhydrate le milieu et les microorganismes se développent grâce aux substances nutritives contenues dans le tampon. Après incubation pendant 24 heures, on dénombre des colonies, le plus souvent par comparaison avec des échantillonneurs étalons (Fig. 5).

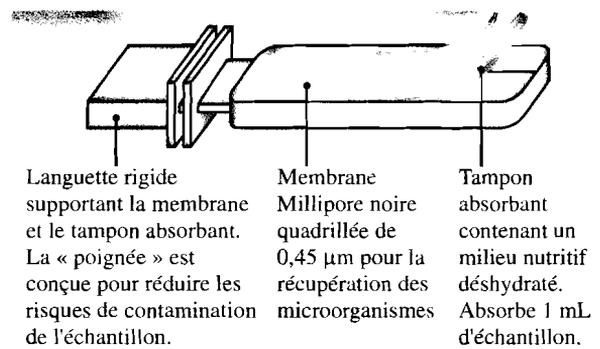


Fig. 4 – Échantillonneur (Millipore)

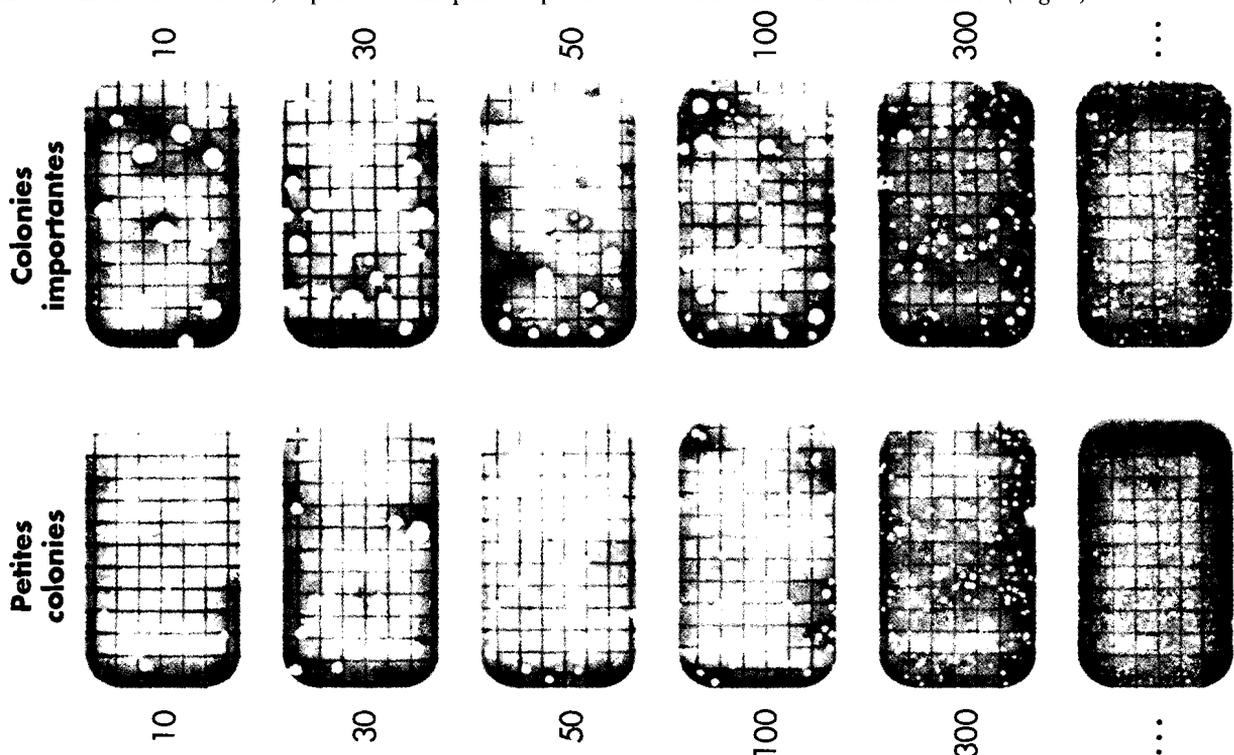


Fig. 5 – Échantillonneurs étalons (Millipore)

1.2.5.2. Petrifilm Système 3M

• Principe

Le Petrifilm est constitué d'un film rigide quadrillé, dessinant des carrés de 1 cm² de surface, qui sert de support à un milieu gélatinisé approprié.

Il existe plusieurs applications, chacune différant par le milieu supporté par le film inférieur (Fig. 6).

Le milieu est protégé par un film souple, qui est soulevé lors de l'inoculation ; l'inoculum (1 mL) est déposé au centre du film rigide quadrillé.

Le film souple protecteur est rabattu et un diffuseur est appliqué sur le tout pour que l'inoculum soit réparti sur toute la surface du quadrillage, soit 20 cm².

Les deux films sont perméables à l'oxygène.

Après l'incubation, le dénombrement des colonies obtenues se fait à l'œil nu et se trouve facilité par le quadrillage ; on dénombre les films comprenant entre 30 et 300 colonies.

• Applications

– Petrifilm flore totale

Le milieu de culture est un milieu PCA (*plate count agar*) additionné de TTC (2,3,5 chlorure de triphényltétrazolium). Le milieu convient au développement de la plupart des microorganismes : l'indicateur coloré est réduit par ces derniers, les colonies sont alors colorées en rouge.

• Justesse

La droite de calibrage entre les résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus par la méthode de référence (méthode de dénombrement après culture) est :

$$\log(\text{méthode réf}) = 0,99 \log(\text{méthode rapide}) + 0,04$$

La différence entre les résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus par la méthode de référence ne dépassera pas la valeur de précision d'estimation (PE) plus d'une fois sur vingt :

$$\text{PE} = \pm 0,68 \log$$

$$10 \log^{N-0,68} < N < 10 \log^{N+0,68}$$

Les résultats, légèrement inférieurs pour un même échantillon, s'expliquent :

- par la présence du TTC qui peut être inhibiteur (son taux d'inhibition varie entre 10 et 20 %) ;
- par le développement d'espèces psychrophiles habituellement détruites par l'utilisation de gélose en surfusion dans les méthodes de dénombrement en PCA.

Ce développement « en excès » compense l'effet « par défaut » du TTC ; néanmoins, les résultats obtenus par cette méthode sont inférieurs à ceux obtenus par la méthode de référence.

• Fidélité

- Répétabilité : la différence entre deux résultats obtenus, sur une matière identique par cette méthode, ne dépassera pas la valeur de répétabilité r plus d'une fois sur vingt :

$$r = 0,212 \log (r = 0,246 \text{ pour la méthode de référence})$$

- Reproductibilité : la différence entre les résultats obtenus, par cette méthode dans deux laboratoires différents, ne dépassera pas la valeur de reproductibilité R plus d'une fois sur vingt :

$$R = 0,588 \log$$

Cette méthode a reçu une validation pour tous produits d'alimentation humaine : attestation de validation de méthodes rapides d'analyse suivant la norme NF V 03 100 (AFNOR : numéro d'attestation 3M 01/1-09/89).

– Petrifilm *E. coli*

Le milieu de culture est un milieu sélectif VRBL (cristal violet, rouge neutre, bile, lactose) avec deux indicateurs : TTC et BCIG (5 bromo-4 chloro-3 indoxyl β D glucuronide). Par action de la β -D-glucuronidase, enzyme spécifique de *E. coli*, à partir du BCIG un précipité bleu se forme.

La production de gaz résultant de la fermentation du lactose se caractérise par la présence de bulles (au niveau des colonies) coincées entre le milieu et le film plastique (Fig. 6).

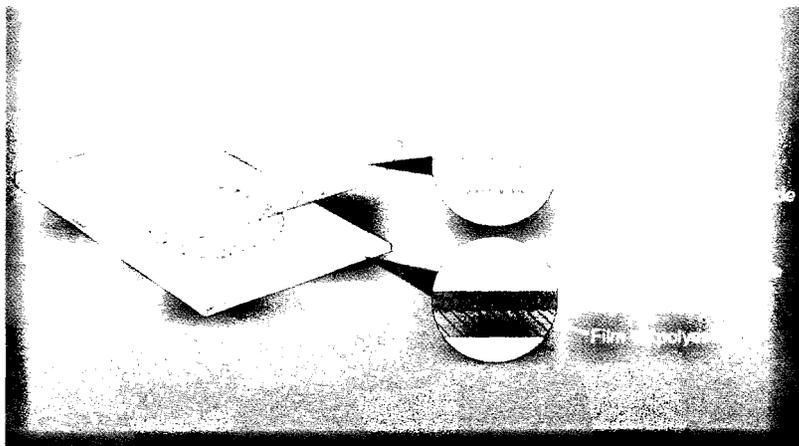


Fig 6 – Schéma du Petrifilm pour *E. coli* (document 3M)

- Justesse

La droite de calibrage entre les résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus par la méthode de référence (dénombrement après culture) est :

$$\log(\text{méthode de réf.}) = 0,89 \log(\text{méthode rapide}) + 0,03, \text{ pour les produits laitiers}$$

avec PE = 1,01 log ;

$$\log(\text{méthode de réf.}) = 1,06 \log(\text{méthode rapide}) + 0,19 \text{ pour les produits carnés}$$

avec PE = $\pm 0,54$ log.

- Fidélité

- Répétabilité : elle est différente selon les produits auxquels elle s'applique :
 - produits carnés et végétaux : $r = 0,44$ log ($r = 0,33$ log pour la méthode de référence) ;
 - produits laitiers : $r = 0,32$ log ($r = 0,23$ log pour la méthode de référence).
- Reproductibilité : R est compris entre 0,22 log et 1,25 log.

Cette méthode a reçu une validation pour tous produits d'alimentation humaine : attestation de validation de méthodes rapides d'analyse suivant la norme NF V 03 100 (AFNOR : numéro d'attestation 3M 01/4-09/92)

– Petrifilm coliformes

Le milieu de culture est un milieu VRBL contenant des inhibiteurs : sels biliaires et cristal violet, additionné d'un indicateur TTC dont la réduction par les coliformes non inhibés donne une coloration rouge aux colonies.

- Justesse

La droite de calibrage entre les résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus par la méthode de référence est :

$$\log(\text{méthode réf.}) = 1,01 \log(\text{méthode rapide}) + 0,14, \text{ pour les produits laitiers avec PE} = \pm 0,52 \text{ log}$$

$$\log(\text{méthode réf.}) = 0,82 \log(\text{méthode rapide}) + 0,52, \text{ pour les autres produits avec PE} = 1,10 \text{ log}$$

- Fidélité

- Répétabilité : elle est différente selon les produits auxquels elle s'applique :
 - produits carnés et végétaux :
 - $r = 0,48$ log ($r = 1,04$ log pour la méthode de référence)
 - produits laitiers :
 - $r = 0,30$ log ($r = 0,38$ log pour la méthode de référence)

- Reproductibilité : R = 0,84 log.

Cette méthode a reçu une validation pour tous produits d'alimentation humaine : attestation de validation de méthodes rapides d'analyse suivant la norme NF V 03 100 (AFNOR : numéro d'attestation 3M 01/2-09/89).

– Autres Petrifilms

- Petrifilm pour la numération des *Enterobacteriaceae*.
- Petrifilm haute sensibilité pour la numération des coliformes en faible nombre (HSCC).
- Petrifilm Série 2000 pour la numération rapide des coliformes.
- Petrifilm levures et moisissures : celui-ci utilise un milieu OGA (oxytétracycline-glucose-agar) et un gel soluble à l'eau froide ainsi que des antibactériens et un indicateur coloré BCIP (5 bromo-4 chloro-3 indoxyl phosphate) qui précipite sous forme d'un composé bleu, par action de la phosphatase, enzyme produite par les levures et moisissures. Les levures donnent donc des petites colonies bleu-vert et les moisissures des colonies larges aux couleurs variables et possédant un centre plus foncé.

Ces dernières applications n'ont pas reçu d'attestation AFNOR.

1.2.5.3. Ensemenceur spiral®

- Principe

C'est un système semi-automatique qui consiste à déposer l'inoculum, par l'intermédiaire d'un stylet creux, au centre de la boîte contenant le milieu gélosé, puis à déplacer en spirale (spirale d'Archimède) ce stylet distributeur d'inoculum ; au total, 50 μL sont déposés. La densité du dépôt varie dans un rapport de 1 à 10^3 ou 10^4 depuis le centre jusqu'à la périphérie ; cette décroissance permet la séparation des colonies en périphérie (Fig. 7).

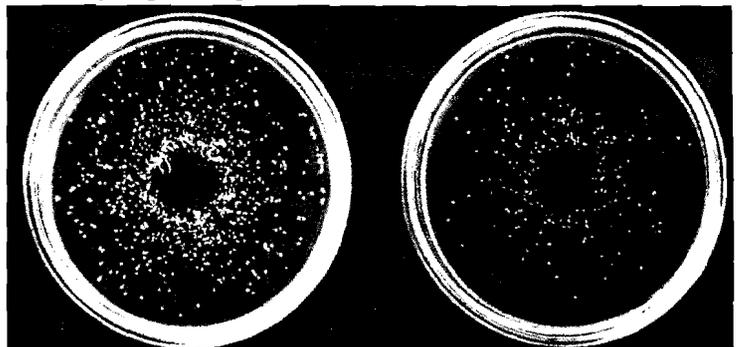


Fig. 7 – Exemples de répartition des colonies
(photographies fournies par Interscience)

Après incubation, la concentration est déterminée par le rapport entre le nombre de colonies et le volume de l'échantillon contenu dans le secteur de la boîte où le dénombrement a été fait.

• **Dénombrement**

Seuls servent au dénombrement les secteurs où les colonies sont convenablement espacées ; le comptage est réalisé manuellement à l'aide d'une grille qui divise la surface de la boîte en secteurs concentriques de plus ou moins grande surface (Fig. 8).

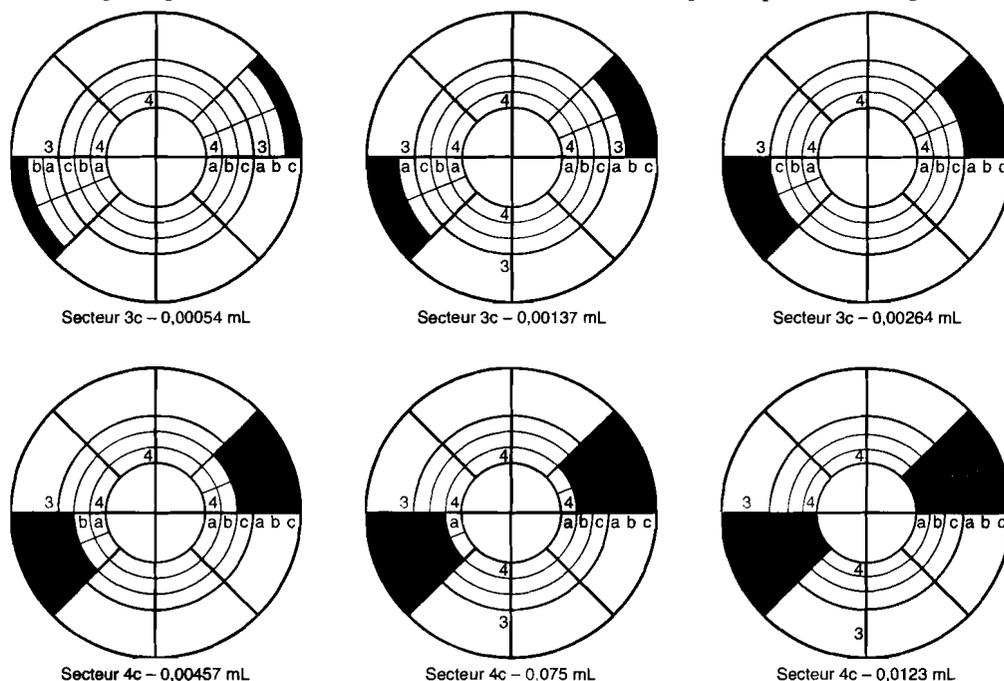


Fig 8 – Grille de comptage (schéma fourni par Interscience)

À chaque surface délimitée par la grille correspond un volume d'échantillon.

Afin de compenser toute irrégularité dans la distribution des colonies, les surfaces équivalentes des secteurs opposés sont comptées. On dénombre les colonies du secteur choisi. Si le nombre de colonies du secteur est supérieur à 20, ce nombre est noté pour le volume du secteur. Si le nombre de colonies du secteur choisi est inférieur à 20, on continue sur le secteur suivant et le nombre trouvé correspond au volume des deux secteurs.

EXEMPLES

Si pour le secteur 3c on dénombre $N = 28$ colonies, ces 28 colonies proviennent de $V = 0,54 \mu\text{L}$.
 Si pour le secteur 3c on dénombre 15 colonies, on poursuit la numération sur le secteur 3b ;
 on dénombre alors $15 + 19 = 34$ colonies provenant d'un volume de $1,37 \mu\text{L}$.

• **Expression du résultat**

Soit n_1 et n_2 colonies dénombrées sur une surface correspondant à V mL,
 alors N (nombre de microorganismes par mL d'échantillon) s'exprime par :

$$N = (n_1 + n_2) \cdot \frac{1}{V}$$

EXEMPLE

21 et 16 colonies sur secteur 4a de $12,3 \mu\text{L}$:

$$N = 37 \cdot \frac{1}{0,0123}$$

$$N = 3 \cdot 10^3 \text{ colonies/mL}$$

Un compteur laser peut être associé à l'Ensemenceur spiral® et, dans ce cas, le dénombrement se réalise automatiquement par détermination de la surface contenant 100 colonies numérees.

• **Applications**

Cette méthode a été normalisée par l'AFNOR : « Ensemencement et dénombrement des microorganismes à l'aide du système spiral » (norme NF V 08 100, octobre 1987)

Elle présente une grande concordance avec la méthode de référence : moins de 5 % de risque d'erreur entre la méthode avec Enseigneur spiral® et la méthode de dénombrement en surface d'un milieu gélosé, et ce pour différents microorganismes.

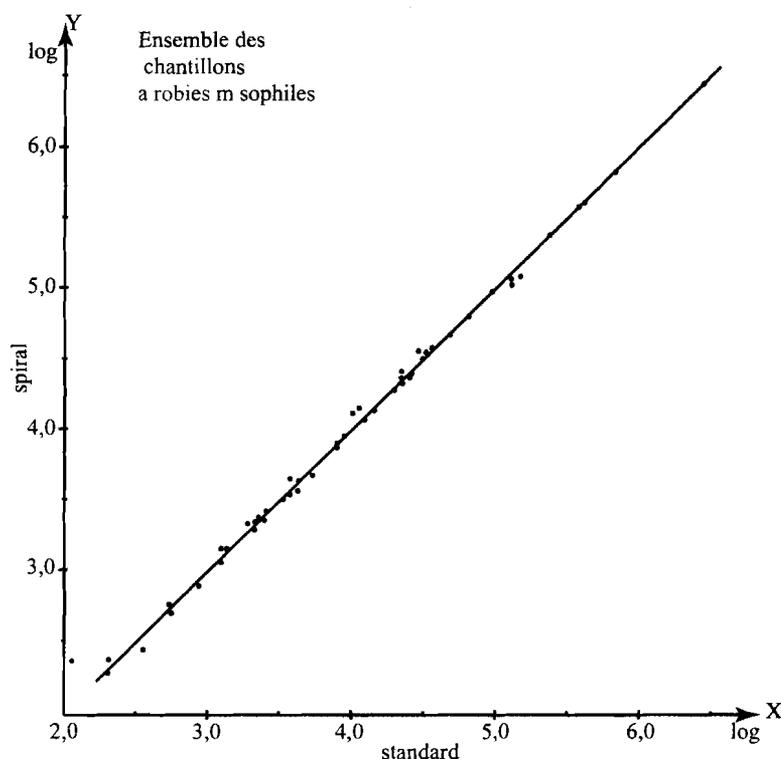


Fig. 9 – Droite de concordance entre des dénombrements d'aérobies mésophiles par l'Enseigneur spiral® et par la méthode standard (courbe fournie par Interscience)

De plus, la méthode est reproductible. Pour 20 essais réalisés en parallèle par la méthode de référence et par la méthode de l'Enseigneur spiral®, l'écart type est de 0,066 pour la première et de 0,069 pour la seconde, avec une moyenne identique. Le maximum de sensibilité est obtenu pour des populations inférieures à $10^5 - 10^6$ microorganismes/mL.

C'est une méthode très adaptée pour les prélèvements d'aliments liquides homogènes, mais qui a été étendue à tous produits d'alimentation humaine.

Elle présente l'avantage d'éviter les dilutions successives de l'échantillon et assure une rapidité de distribution de l'échantillon.

AES Laboratoire commercialise un enseigneur automatique en spirale WASP.

1.2.5.4. Autres méthodes dérivées de la méthode standard

• Méthode des gouttes

Il s'agit de déposer, à la surface d'un milieu gélosé convenable et bien sec, des microgouttes calibrées (de 10 à 15 μL) des dilutions choisies de l'échantillon (8 microgouttes au maximum par boîte de 90 mm de diamètre).

Le dénombrement des petites colonies se fait après incubation de 18 heures environ.

L'avantage de cette méthode est de réduire le nombre de boîtes de milieu gélosé nécessaires au dénombrement.

La limite de comptage est de 50 microcolonies par goutte.

• Lames et bandes immergées

Les milieux gélosés sont placés à la surface d'une lame ou d'une bande, le tout étant conservé en tube protecteur stérile. La lame est immergée dans l'échantillon à analyser, la capacité d'absorption du milieu est connue ; si l'échantillon à examiner est peu abondant, il peut être répandu sur le support (lame ou bande).

Les milieux de culture permettent soit le développement des « microorganismes totaux », soit le développement sélectif des coliformes, soit le développement sélectif des levures et moisissures.

Sur une même lame peuvent être combinés deux milieux.

L'incubation dans le tube stérile est de 24 à 48 heures pour les bactéries ; de 48 à 72 heures pour les levures et moisissures.

Le dénombrement des colonies se fait par comparaison avec des lames ou bandes témoins de contamination présentant des populations allant de $10^2/\text{mL}$ à $10^5/\text{mL}$ pour les bactéries, de 10^2 à $10^4/\text{mL}$ pour les levures et moisissures.

Les avantages sont évidemment la simplicité (ne nécessite pas d'équipement lourd) et la rapidité.

1.3.2. Méthode standard

C'est une méthode techniquement très lourde mais utilisée lorsque les bactéries cultivent difficilement en milieu gélosé, lorsque le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon est faible et nécessite que soient testés des grands volumes. Dans cette technique, on peut choisir 10 mL comme volume de prélèvement en utilisant alors un milieu double concentration.

- **Choix du mode opératoire**

Il figure dans les directives générales pour les examens microbiologiques NF ISO 7218 de mai 1996.

- Choix du volume de prélèvement inoculé : très souvent 1 mL, parfois 10 mL – on utilise alors un milieu deux fois concentré afin d'éviter une trop forte dilution du milieu.
- Choix du milieu :
 - soit simple milieu de croissance sans indicateur particulier ; la présence de germes se traduit par un trouble ;
 - soit milieu d'identification rendu sélectif du microorganisme à quantifier ; sa présence se manifeste par le virage d'un indicateur traduisant, par exemple, l'acidification du milieu.
- Choix des dilutions à tester : il dépend de la population estimée, le but étant d'obtenir une dilution contenant moins de 1 microorganisme et une dilution contenant plus de 1 et moins de 10 microorganismes.
- Choix du nombre d'essais par dilution : en général 3, parfois 5 si une précision plus importante est demandée.

1.3.3. Résultats

1.3.3.1. Combinaisons caractéristiques

Résultats bruts :

Dilution	10^{-n}	$10^{-(n+1)}$	$10^{-(n+2)}$	$10^{-(n+3)}$	$10^{-(n+3)}$
Résultats	+++	+++	++-	+--	---

On regroupe les résultats obtenus pour chaque dilution et on affecte le chiffre 1 à chaque réponse +, le chiffre 0 à chaque réponse -.

Dilution	10^{-n}	$10^{-(n+1)}$	$10^{-(n+2)}$	$10^{-(n+3)}$	$10^{-(n+3)}$
Résultats	3	3	2	1	0

C'est l'assemblage par trois de ces chiffres caractéristiques qui permet d'utiliser la table statistique : 3 3 2 1 0 peut donner : 332 ; 321 ; 210.

Comment choisir la combinaison de trois chiffres permettant d'utiliser la table ? Plusieurs règles existent.

- **Une dilution au moins présente trois tubes positifs**

Choisir la plus forte dilution donnant 3 et les deux suivantes, la combinaison de trois chiffres commence donc par trois. Dans l'exemple : 3 3 2 1 0. On choisit 3 2 1.

Si l'on a choisi la plus forte dilution donnant 3 et les deux suivantes et qu'il existe une dilution plus forte donnant un chiffre différent de 0, on ajoute ce chiffre à celui obtenu pour la dilution précédente : 3 3 2 1 1 0.

On choisit 3 2 1 + 1, soit 3 2 2 (*ne figure pas dans la norme ISO mais dans la norme AFNOR spécifique eau NF T 90 413*).

Si l'on n'a pas été préparé suffisamment de dilutions au-delà de la dilution la plus forte donnant trois tubes positifs, on choisit alors les trois dilutions les plus fortes : 3 3 3 1. On choisit 3 3 1.

- **Aucune dilution ne révèle trois tubes positifs**

Choisir les trois dilutions les plus fortes dont au moins une présente un résultat positif : 2 2 1 1 0. On choisit 1 1 0.

Si aucune dilution ne donne 3, choisir les trois dernières dilutions donnant un résultat non nul : 2 2 2 0 0.

On choisit 2 2 2 (*n'existe plus dans la norme ISO*).

Si une seule dilution donne un résultat non nul, la choisir ainsi que la suivante : 0 1 0 0. On choisit 10 (*n'existe plus dans la norme ISO*).

- **Au moins deux dilutions révèlent trois tubes négatifs**

Choisir la dilution la moins forte donnant un résultat nul et les deux dilutions précédentes.

EXEMPLES

Exemple : 3 2 1 0 0. On choisit 2 1 0.

Exemple : 2 2 0 1 0. On choisit 2 2 0.

- **Seule la première dilution révèle un ou des tubes positifs**

Choisir cette dilution et les deux suivantes : 2 0 0 0 0. On choisit 2 0 0.

1.3.3.2. Détermination du NPP

• Analyse de la séquence de chiffres obtenue

Les séquences de trois chiffres sont classées en quatre catégories selon leur probabilité de « sortie » ou probabilité d'occurrence : la catégorie 1 concerne les résultats ayant le plus de chance d'être obtenus, puis, dans l'ordre, les catégories 2 et 3 ; la catégorie 0 concerne les résultats qui n'ont qu'une « chance » infime d'être obtenus.

EXEMPLE

3 2 1 est en catégorie 1, de même que 2 1 0 ou 1 0 0, alors que 1 3 0 ou 2 3 1 sont en catégorie 2 ou 3.

La séquence de trois chiffres qui a été obtenue permet-elle de déterminer un résultat statistiquement valable ? Cela dépend du nombre de tests réalisés sur l'échantillon sur lequel est pratiqué le dénombrement, et de la décision d'accepter ou non des résultats de catégorie 2 ou 3.

EXEMPLE

1 0 0 ou 2 0 0 ou 3 1 1 sont toujours, quel que soit le nombre de tests réalisés, en catégorie 1, le résultat est toujours statistiquement acceptable.

2 2 1 est :

- en catégorie 1 lorsque 10 tests ont été réalisés et ont donné la séquence 221 ;
- en catégorie 2 lorsque 5, 3, ou 2 tests ont été réalisés et ont donné la séquence 221 ;
- en catégorie 3 lorsque un seul test a été réalisé et a donné la séquence 221.

Ce résultat permettra donc de déterminer un NPP selon la décision d'accepter ou de refuser les catégories 2 et 3.

• Lecture du NPP dans la table

Le NPP est lu dans une table ; il correspond à un nombre de microorganismes dans un volume donné qui est précisé dans les formules de calcul.

Cas le plus général de trois essais par dilution testée, on peut utiliser le tableau B1 de l'annexe de la norme ISO 7218.

Nombre de résultats positifs			NP	Catégorie lorsque le nombre d'essais est de					Limites de confiance			
				1	2	3	5	10	> 95 %	> 95 %	> 99 %	> 99 %
0	0	0	< 0,30						0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	0	0,30	3	2	2	2	1	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	1	1	1	1	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	3	3	3	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	2	2	2	1	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0	0	0	3	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	1	1	1	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	2	1	1	1	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0	0	3	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	1	1	1	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	3	2	2	2	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	1	1	1	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	1	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2,0	0	3	3	3	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	1	1	1	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	2	1	1	1	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	1	1	1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0	0	0	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	1	1	1	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	3	2	2	2	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	1	1	1	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1	1	1	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3	1	3	16	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1	1	1	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3	2	3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3	3	0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3	3	1	46	1	1	1	1	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3	3	3	>110									

Note : Les limites de confiance données dans le tableau B1 ne sont destinées qu'à fournir quelques notions de l'influence des variations statistiques sur les résultats. Il existera toujours d'autres sources de variations qui pourront, quelquefois, être importantes.

Tableau 3 – Tableau B1 de l'annexe de la norme ISO 7218

À une séquence de trois chiffres correspond un NPP.

EXEMPLE

Séquence	→ NPP
220	→ 2,1
3 3 1	→ 46

• **Expression du résultat**

Elle peut différer selon la norme utilisée.

Selon la norme NF ISO 4831 directives générales pour le dénombrement des coliformes de juillet 1991 (classement V 08 016).

$$N_{SM} = \text{NPP} \cdot \frac{1}{d \cdot V}$$

N_{SM} = NPP lu sur la table.

d = dilution correspondant au premier chiffre caractéristique : dilution la plus faible.

V = volume de la prise d'essai en mL.

N_{SM} = nombre de microorganismes par mL de suspension mère.

EXEMPLE

Dilutions	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Chiffres caractéristiques	3	3	1

Chiffres retenus : 331.

NPP = 46.

V = 1 mL.

Application numérique : $N = 46 \cdot \frac{1}{10^{-1} \cdot 1} = 4,6 \cdot 10^2$

Suspension mère réalisée par dissolution dans $V_{SM} = 100$ mL de $m = 1$ g de produit :

$$N = 4,6 \cdot 10^2 \cdot \frac{100}{1} = 4,6 \cdot 10^4 \text{ microorganismes/g de produit}$$

Selon la norme ISO 7218 de mai 1996 :

$$C_s = M \cdot F \cdot V_s \cdot \frac{1}{d_0}$$

C_s = NPP de microorganismes dans le volume de référence V_s .

V_s = volume de référence choisi pour exprimer la concentration en microorganismes (1 mL ou 100 mL).

d_0 = dilution de base : dilution la plus faible de la suspension mère (celle du premier chiffre retenu pour le coefficient NPP).

M = NPP lu dans le tableau, et ce pour la dilution d_0 .

F = taux de dilution correspondant à la dilution de la suspension mère, exprimable par :

$$F = V_{SM} \cdot \frac{1}{V} \quad \text{ou} \quad F = V_{SM} \cdot \frac{1}{m}$$

avec V et m respectivement volume ou masse du prélèvement ayant servi à constituer la suspension mère. La formule devient alors :

$$C_s = M \cdot V_s \cdot \frac{V_{SM}}{V} \cdot \frac{1}{d_0} \quad \text{ou} \quad C_s = M \cdot V_s \cdot \frac{V_{SM}}{m} \cdot \frac{1}{d_0}$$

EXEMPLE

Dilutions	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Chiffres caractéristiques	3	3	1	0

Chiffres retenus : 310

Catégorie 1.

M = NPP 4,3.

d_0 = dilution de base (dans l'exemple = 10^{-2}).

$V_s = 1$ mL.

F = 1 suspension mère = échantillon pour essai.

$$C_s = 4,3 \cdot 1 \cdot 1 \cdot \frac{1}{10^{-2}}$$

$$C_s = 4,3 \cdot 10^2 \text{ mL}^{-1}.$$

- Dans le cas où la dilution de base correspond à la dilution préparée par ensemencement de 10 mL dans un milieu double concentration, diviser préalablement M par 10.
- Si aucune dilution n'a donné de résultat positif, coefficient NPP < 0,3. Le résultat est exprimé par : moins de 1 microorganisme dans 1 mL.

• **Limites de confiance**

Elles donnent l'encadrement du NPP obtenu avec une probabilité de 95 % ou de 99 % (probabilités données par le tableau B1 de la norme ISO).

EXEMPLE

Pour un NPP de 2,1 : 0,5 à 4,0 avec une probabilité de 95 % ;
0,2 à 5,6 : avec une probabilité de 99 % ;
et ce pour trois essais par dilution.

On peut resserrer les limites de confiance en augmentant le nombre d'essais par dilution.

EXEMPLE

Pour un NPP de 2,1 : 0,7 à 3,9 avec une probabilité de 95 % ;
0,5 à 5,2 avec une probabilité de 99 % ;
et ce pour cinq essais par dilution.

C'est une méthode moins précise que les méthodes de dénombrement après culture en milieu solide mais plus sensible puisqu'elle permet de détecter 1 microorganisme.

1.3.4. Variantes de la méthode standard

La méthode peut être miniaturisée en microplaque. L'avantage par rapport à la méthode standard est que l'on peut multiplier le nombre d'essais par dilution (8 ou 12) et adapter les dilutions (niveaux et raison) : flexibilité et rapidité. Application : coliformes en eau de rivière.

1.3.5. Application du dénombrement en milieu liquide

Se reporter à la manipulation 7 : Dénombrement après culture en milieu liquide des coliformes dans les quenelles fraîches.

2. Dénombrement direct des cellules à l'aide d'un microscope : la cytométrie

Les différentes méthodes de cytométrie ont pour finalité de mesurer certaines caractéristiques des cellules vivantes ou mortes et également de les dénombrer. La cytométrie permet, en particulier, de dénombrer les levures et les bactéries présentes dans une suspension. La cytométrie fait appel à divers types de matériel : les modalités de présentation des cellules à dénombrer changent selon les méthodes ainsi que les systèmes de récupération et d'analyse de l'information. La présentation des cellules peut se faire sur lame (microscopie classique), sur filtre (cytométrie sur filtre ou CSF), en tube capillaire (cytométrie en flux ou CMF). Compte tenu de la taille microscopique des cellules, il est toujours nécessaire d'effectuer un grossissement à l'aide d'un microscope optique pour pouvoir les observer et les dénombrer. Il est possible de différencier les cellules vivantes des cellules mortes par utilisation d'un fluorochrome et analyse par un microscope à épifluorescence. Toutes ces méthodes requièrent de travailler sur un échantillon représentatif de la suspension, obtenu par prélèvement après homogénéisation, éventuellement sur plusieurs échantillons si une grande précision est recherchée.

2.1. Dénombrement en cellule (ou lame) de comptage

2.1.1. Principe

Le principe du dénombrement consiste à prélever l'échantillon à numérer et à le placer dans un volume connu contenu dans une cellule de comptage d'une lame microscopique en verre, délimité par la fixation d'une lamelle plane.

Le volume total de la cellule est précis, connu et déterminé par la surface totale s du quadrillage ($s = 1 \text{ mm}^2$ par exemple), et par la profondeur entre le quadrillage et la lamelle ($p = 0,1 \text{ mm}$ par exemple). On peut y emprisonner un volume de suspension ($V_{\text{tot}} = p.s = 0,1 \text{ mm}^3$ dans cet exemple). Les lames diffèrent par la valeur de la profondeur et la nature du quadrillage (n : nombre de volumes unitaires définis par la surface unitaire du quadrillage et la profondeur). Sur la surface totale s de la cellule est tracé un quadrillage défini pour chaque type de cellule.

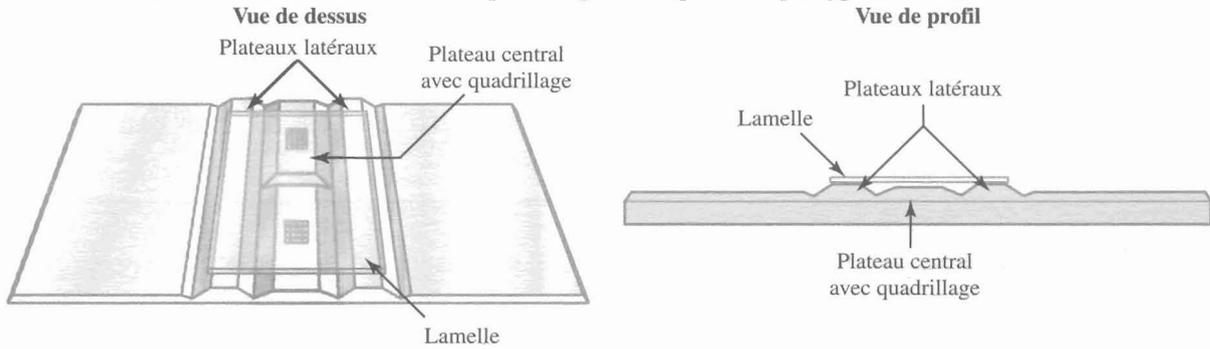


Fig. 10 – Schéma d'une cellule à numération avec deux quadrillages

Il suffit de compter sur un échantillon représentatif de volumes unitaires et de faire la moyenne.

Il est, de plus, possible de différencier les cellules vivantes des cellules mortes par l'utilisation de colorants comme le bleu de méthylène de Funk. Ce colorant pénètre dans les cellules : il sera réduit sous forme incolore dans les cellules en activité. Les cellules mortes, ne possédant pas d'activité réductasique, ne modifieront pas le bleu de méthylène qui restera bleu.

2.1.2. Matériel et méthodologie

Les cellules les plus fréquemment utilisées sont **la cellule de Malassez et la cellule de Thoma.**

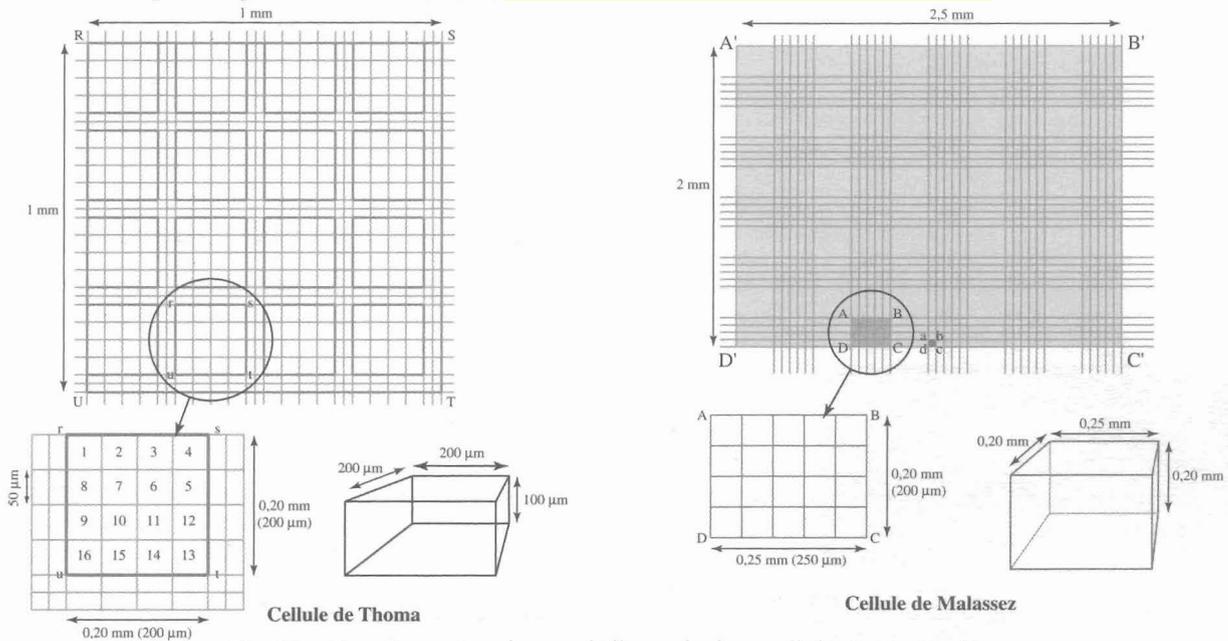


Fig. 11 – Représentation des quadrillages de deux cellules à numération

2.1.2.1. Caractéristiques des cellules à numération

	p (mm)	s_{tot} (mm ²)	V_{tot} (mm ³)	n	Seuil (unités/mL)
Cellule de Malassez (rectangles)	0,2	5	1	100	10^5
Cellule de Thoma (carrés)	0,1	1	0,1	400	10^6

n : nombre de volumes unitaires contenus dans le volume total de la cellule correspondant aux « rectangles » ou « aux carrés » unitaires du quadrillage.

s_{tot} (mm²) : surface totale du quadrillage.

p (mm) : profondeur.

$V_{\text{tot}} = p.s_{\text{tot}}$: volume total de la cellule de comptage (mm³).

Le seuil de détection est la concentration minimale en microorganismes permettant une détermination satisfaisante. Le quadrillage de la cellule de Malassez possède 100 rectangles dont 25 sont divisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage.

2.1.2.2. Mode opératoire

- Prévoir de diluer la suspension de façon à obtenir 10 à 100 cellules par rectangle ou carré unitaire du quadrillage. Il est possible d'utiliser un agent mouillant (Tween, laurylsulfate de sodium) pour éviter les agrégats : c'est le cas des bactéries en amas (*Staphylococcus*) ou celui des levures.
- Ajouter du formol à 10 % pour immobiliser les bactéries mobiles.
- Colorer éventuellement la suspension avec du bleu de méthylène de Funk dont la composition est la suivante :
 - Bleu de méthylène à 0,2 % pour coloration vitale : 100 mL
 - Tampon phosphate pH 7 : 100 mL
(Tampon phosphate pH 7 : volume de KH_2PO_4 à 0,1 mol. L^{-1} soit 13,617 g. L^{-1} ; 2 volumes de Na_2HPO_4 à 0,1 mol. L^{-1} soit 17,814 g. L^{-1})

Technique d'utilisation de la cellule de comptage

- Faire adhérer la lamelle aux plateaux latéraux en appuyant avec les pouces et en pratiquant un mouvement de va-et-vient jusqu'à perception d'une résistance (franges irisées).
- La suspension, après homogénéisation, est introduite par capillarité en plaçant la pointe de la pipette inclinée près de la lamelle.
- Une observation à l'état frais à l'aide d'un microscope optique (objectif 40) est ensuite effectuée.
- Vérifier la répartition homogène des cellules en comptant dans les quatre angles et au centre du quadrillage.
- Effectuer le dénombrement sur une dizaine de carrés ou rectangles unitaires, en comptant les éléments à cheval sur les limites dans deux des limites sur les quatre.

2.1.2.3. Dénombrement – Avantages et inconvénients de la méthode

Pour obtenir un résultat statistique satisfaisant, on compte au moins 10 et au plus 100 cellules par unité de surface (« rectangle ») sur une dizaine de carrés.

La moyenne est ensuite effectuée, et on calcule la concentration en microorganismes de la suspension par la formule suivante :

$$N = \frac{n_{\text{moy}} \cdot n \cdot 10^3}{V_{\text{tot}}}$$

n_{moy} : nombre moyen de cellules par rectangle.

n : nombre de volumes unitaires contenus dans le volume total de la cellule correspondant aux « rectangles » ou « aux carrés » du quadrillage.

$V_{\text{tot}} = p \times s$: volume total de la cellule de comptage (mm^3).

N : nombre de microorganismes par mL.

Le seuil de détection est plus ou moins petit selon la cellule utilisée.

Cette méthode est plus adaptée pour des cellules de grande taille comme les levures, car les bactéries sont difficiles à observer à l'objectif 40. Cette méthode est rapide à mettre en œuvre et nécessite peu de matériel spécifique. Elle est cependant un peu laborieuse lorsqu'il s'agit de dénombrer des bactéries.

Les erreurs sont essentiellement dues à une mauvaise homogénéisation de la suspension.

2.2. Méthode de Breed : DMC (*Direct Microscopic Count*)

2.2.1. Principe

Cette méthode consiste à déposer un volume connu $V = 0,01$ mL, soit 10 μL , de suspension prélevés à l'anse calibrée sur une surface délimitée de la lame et de réaliser un frottis ($S_{\text{frottis}} = 1 \text{ cm}^2$).

2.2.2. Mode opératoire

Après fixation et coloration, différentielle ou non, du frottis (Gram ou bleu de méthylène), on ajoute de l'huile à immersion ; la lame est observée à l'objectif x 100. Le nombre de bactéries par champ est compté sur un nombre de champs compris entre 20 et 50.

Il faut déterminer la surface réelle d'un champ microscopique. On peut utiliser une lame micrométrique qui permet de mesurer le diamètre D du champ microscopique à l'objectif 100 (D en cm de l'ordre de $0,13 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$ à $0,21 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$).

On détermine le nombre moyen de microorganismes par champ (n_{moy}).

2.2.3. Dénombrement – Avantages et inconvénients de la méthode

Le résultat peut s'exprimer à partir de la formule suivante :

$$N = \frac{n_{\text{moy}} \cdot S_{\text{frottis}}}{V \cdot S_{\text{champ}}}$$

n_{moy} : nombre moyen de cellules par champ (microorganismes).

S_{champ} : $\frac{\pi \cdot D^2}{4}$ exprimé en cm^2 ; D est le diamètre du champ (cm).

S_{frottis} : surface d'étalement du frottis (cm^2) ; $S_{\text{frottis}} = 1 \text{cm}^2$.

V : volume de prélèvement (mL).

N : concentration en microorganismes/mL.

Cette méthode, pour être utilisée, présente quelques points délicats à respecter :

- la suspension doit être bien homogénéisée avant le prélèvement ;
- la distribution est rarement homogène sur toute la surface, il est donc important de compter sur un nombre suffisant de champs ;
- elle ne permet pas de différencier les bactéries mortes des vivantes. Il peut aussi exister des confusions avec des particules de l'aliment étudié, entraînant une erreur par excès ;
- les résultats sont toujours supérieurs à ceux obtenus par la méthode de référence (dénombrement par culture sur milieu solide).

Le seuil de détection par cette méthode peu sensible est de 10^5 à 10^6 microorganismes/mL. (pour $n = 1$ et $s = 10^{-3} \text{cm}^2$).

Cette méthode a été appliquée pour le contrôle du lait cru, pour dénombrement de la flore totale.

Elle présente l'avantage évident d'être rapide et simple à mettre en œuvre, sans appareillage particulier ni incubation ; elle engendre cependant un fatigue oculaire importante. Elle peut être améliorée par des sondes fluorescentes spécifiques et l'observation au microscope à épifluorescence.

La mauvaise sensibilité de cette technique est un inconvénient : elle ne permet pas de détecter une faible contamination. C'est également une méthode peu précise, qui manque de reproductibilité. Le résultat doit être considéré comme une estimation du nombre de microorganismes.

Cependant, la rapidité du résultat par observation directe au microscope a stimulé la mise au point de techniques permettant de détecter par observation directe des produits faiblement contaminés.

2.3. Méthode par cytométrie sur filtre (CSF) et observation par épifluorescence DEFT (*Direct Epifluorescent filter technique*)

2.3.1. Principe

2.3.1.1. Filtration sur membrane en polycarbonate

Comme pour les méthodes de dénombrement après culture, il est possible de tester un grand volume d'échantillon afin d'améliorer la sensibilité et de pouvoir détecter des faibles concentrations en microorganismes.

Il existe une méthode de filtration sur membrane en acétate de cellulose de porosité 0,2-0,6 μm retenant les bactéries et utilisant un dénombrement après culture, car la membrane est déposée sur un milieu de culture adéquat. Après incubation, les bactéries forment des colonies qui sont alors comptées.

Cependant, ces membranes en acétate de cellulose ne permettent pas une lecture directe au microscope avant culture, car l'observation des bactéries est délicate du fait d'une part de la structure non plane de ces filtres qui entraîne une mise au point difficile, et d'autre part de la difficulté d'obtenir un contraste suffisant entre le filtre et les bactéries.

Pour être appliquée à une observation microscopique directe, on utilise aujourd'hui des membranes filtrantes planes microporeuses en polycarbonate. La structure de ces filtres est très différente de celle des membranes en acétate de cellulose (Fig. 12) ; dans ces dernières, 50 % des bactéries pénètrent dans l'épaisseur de la membrane. Sur la membrane en polycarbonate, toutes les bactéries sont retenues à la surface. De plus, la taille des pores est beaucoup plus régulière et ces derniers se situent tous dans un même plan.

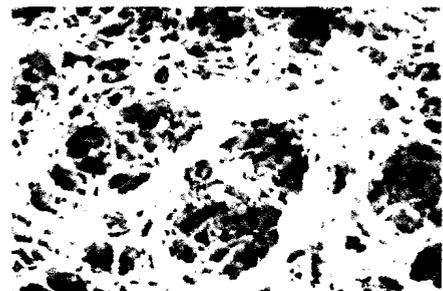
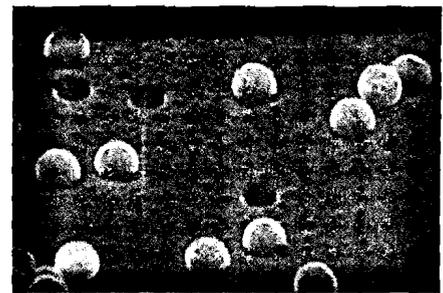


Fig. 12 – Vue en microscopie électronique d'une membrane en polycarbonate et d'une membrane en acétate

Il devient donc relativement aisé d'observer au microscope les bactéries retenues à la surface de ces membranes, car ces bactéries se trouvent toutes sur le même plan focal. Cette filtration nécessite un appareillage de filtration sous vide particulier car les filtres commercialisés sont de 2 cm de diamètre.

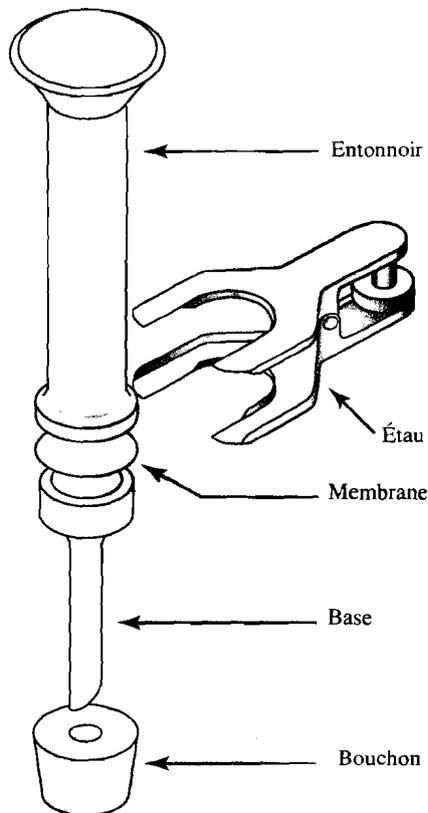


Fig. 13 – Appareil de filtration pour DEFT Nucléopore®

Le système est analogue à ceux utilisés pour le dénombrement par culture après filtration sur membrane suivie de culture.

2.3.1.2. Amélioration du contraste par coloration avec un fluorochrome

Pour améliorer le contraste qui permet une bonne lecture « à l'œil », des techniques de coloration par un fluorochrome, l'acridine orange, suivies d'observation à l'aide d'un microscope à épifluorescence, ont été mises au point. L'acridine orange donne de bons résultats quant à la sensibilité du comptage, elle est de 6 000 microorganismes par gramme d'aliment. Ce fluorochrome excité à 490 nm (couleur bleue) permet de distinguer les cellules mortes ou inactives : la structure secondaire des acides nucléiques modifie la longueur d'onde d'émission du fluorochrome lorsqu'il s'intercale entre les bases azotées. La longueur d'onde d'émission dépend notamment de la structure monocaténaire ou bicaténaire des acides nucléiques :

- les ADN bicaténaires fluorescent en vert et sont majoritaires dans les cellules inactives ou mortes : le rapport ARN/ADN est faible ;
- les ARN monocaténaires fluorescent en orange et sont majoritaires dans les cellules en croissance : le rapport ARN/ADN est élevé.

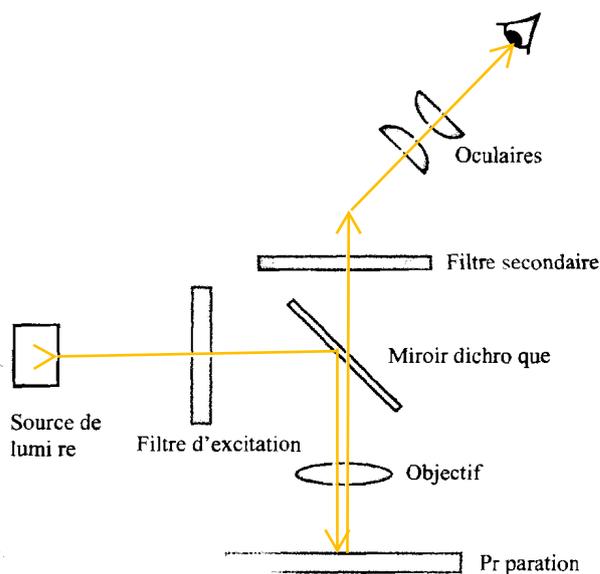


Fig. 14 – Représentation schématique d'un microscope à épifluorescence

L'utilisation d'un microscope à épifluorescence (la lumière incidente est dirigée sur la préparation et ne la traverse pas) permet de séparer la lumière incidente de la lumière émise. Ce microscope est équipé d'un miroir dichroïque ou filtre dichroïque. Ce filtre fonctionne soit comme miroir, soit comme filtre, selon la longueur d'onde du rayon lumineux. Il réfléchit la lumière incidente vers la préparation et laisse passer la lumière fluorescente émise par la préparation, jusqu'à un oculaire ou un tube photomultiplicateur (Fig. 14).

2.3.2. Mode opératoire

- Une prise d'essai (V mL) d'une dilution convenable de l'échantillon, réalisée en fonction de la richesse de la suspension à analyser, est filtrée sur une membrane de surface totale S_{membrane} adaptée au système de filtration. La filtration est effectuée sous vide.
- Mettre en contact pendant 2 minutes la solution d'acridine orange à 0,25 mg/L en tampon pH6,6, puis effectuer une percolation à travers la membrane.
- Laver avec un tampon citrate à pH3 (et à l'isopropanol si l'échantillon a été prétraité au triton X100).
- Sécher la membrane.
- Sur une lame propre, déposer une goutte d'huile à immersion, puis la membrane, puis une goutte d'huile à immersion, et enfin une lamelle.
- Observer sous huile à l'objectif x100.

Pour le lait cru, il est nécessaire de prétraiter l'échantillon comme indiqué dans la manipulation d'application (voir manipulation 8).

Les réactifs utilisés sont présentés dans cette manipulation.

2.3.3. Dénombrement – Avantages et inconvénients de la méthode

On peut alors compter les bactéries ou les levures observées dans un champ. Le nombre de champs à compter dépend de la richesse de la suspension (Tableau 4).

Afin d'obtenir une bonne corrélation avec la méthode de référence, seules les bactéries ou levures rouge orangé sont dénombrées et les amas sont comptés comme une seule unité.

UNITÉ

Cellule ou un groupe de cellules séparé par une distance égale ou supérieure à deux fois le diamètre de la plus petite des deux unités les plus proches.

Nombre d'unités par champ	Nombre de champs à compter
0-10	15
11-25	10
26-50	6
51-75	3
76-100	2
> 100	refaire une dilution

Tableau 4 – Dénombrement des unités

On applique la formule de calcul suivante :

$$N = \frac{n_{\text{moy}} \cdot S_{\text{membrane}}}{V_{\text{tot}} \cdot s_{\text{champ}}}$$

n_{moy} : nombre moyen de cellules par champ.

S_{membrane} : surface de la membrane de filtration (cm²) ; $S_{\text{membrane}} = 3,2 \text{ cm}^2$.

V_{tot} : volume d'échantillon filtré (mL).

$s_{\text{champ}} = \frac{\pi \cdot D^2}{4}$ exprimé en cm² ; D est le diamètre réel du champ (cm).

N : concentration en microorganismes (microorganismes /mL).

Cette méthode peut également être utilisée pour dénombrer et suivre l'évolution quantitative d'un levain.

Une variante de cette méthode consiste à incuber les membranes sur milieux sélectifs. On peut alors observer des microcolonies et 10³ microorganismes/g sont détectables en 8 heures.

On peut analyser sans dilution des échantillons de lait cru ayant entre 5.10³ et 10⁶ UFC/mL. La méthode DEFT permet d'estimer le nombre de bactéries avec une assez bonne précision.

Cette technique rapide mais fastidieuse (8 à 12 échantillons de lait cru à l'heure) a pu être automatisée.

2.3.4. Automatisation de la méthode DEFT

2.3.4.1. Le COBRA®

La société Biocom a mis au point une technique entièrement automatisée qui reprend les trois étapes du DEFT manuel pour permettre un « Comptage Bactérien Rapide » ou « COBRA® ». Ces trois étapes ont lieu à trois postes différents :

- le poste A permet la distribution et la préparation des échantillons de lait dans des blocs réservoirs à 24 puits où sont ensuite ajoutés les réactifs de traitement (triton X100 et trypsine). Les cellules somatiques sont lysées et les globules gras ainsi que les protéines sont dispersés de façon à pouvoir filtrer le lait sans colmatage des pores du filtre. Ces blocs sont ensuite placés au bain-marie ou à l'étuve à 60 °C pendant 10 minutes ;
- le poste B reçoit les blocs réservoirs, après l'incubation, sur des tiroirs supportant des « badges-filtres » composés de 24 membranes de 240 mm² en polycarbonate à pores de 0,6 µm. Chacune de ces membranes correspond à un puits. L'étanchéité est assurée grâce à un joint et un vérin. L'automate assure ensuite la filtration sous une pression de 2 bars, puis l'ajout des réactifs de coloration (acridine orange en tampon citrate à pH 6) à l'aide de 6 pompes péristaltiques. En 4 minutes seulement, 24 échantillons peuvent être filtrés et colorés simultanément ;
- le poste C : le « badge-filtre » est récupéré manuellement et placé sur la platine motorisée du microscope à épifluorescence. Un système d'aspiration plaque les filtres, permettant d'obtenir une surface plane. Un système autofocus autorise la mise au point et l'image est recueillie par une caméra numérique (CCD). Celle-ci envoie l'image vidéo à un convertisseur analogique/numérique en relation avec un ordinateur équipé d'un logiciel d'analyse d'images : il compte, détecte les résultats aberrants et affiche les résultats. C'est aussi l'ordinateur qui permet le déplacement de la platine en pilotant le moteur. L'image analysée peut être visualisée sur écran et stockée en mémoire. Il faut 9 minutes pour la lecture d'un « badge-filtre » en comptant 5 champs par membrane.

La méthode est fiable : le coefficient de corrélation R, avec la méthode de référence de dénombrement après culture en boîte de Petri, est égal à 0.96 pour un seuil de détection inférieur à 10⁴ UFC/mL

Depuis le 28 septembre 1990, le COBRA® peut être utilisé pour le dénombrement des germes du lait cru. L'appareil peut analyser jusqu'à 140 échantillons par heure (moins que le Système spiral®, mais les résultats sont plus rapides).

2.3.4.2. Bactoscan 8000®

La société danoise Foss Electric a mis au point cet appareil entièrement automatique dont le principe de préparation de l'échantillon et de comptage diffère du précédent (Fig. 15). En effet, la concentration et la séparation se font ici par centrifugation en gradient de saccharose-dextrane.

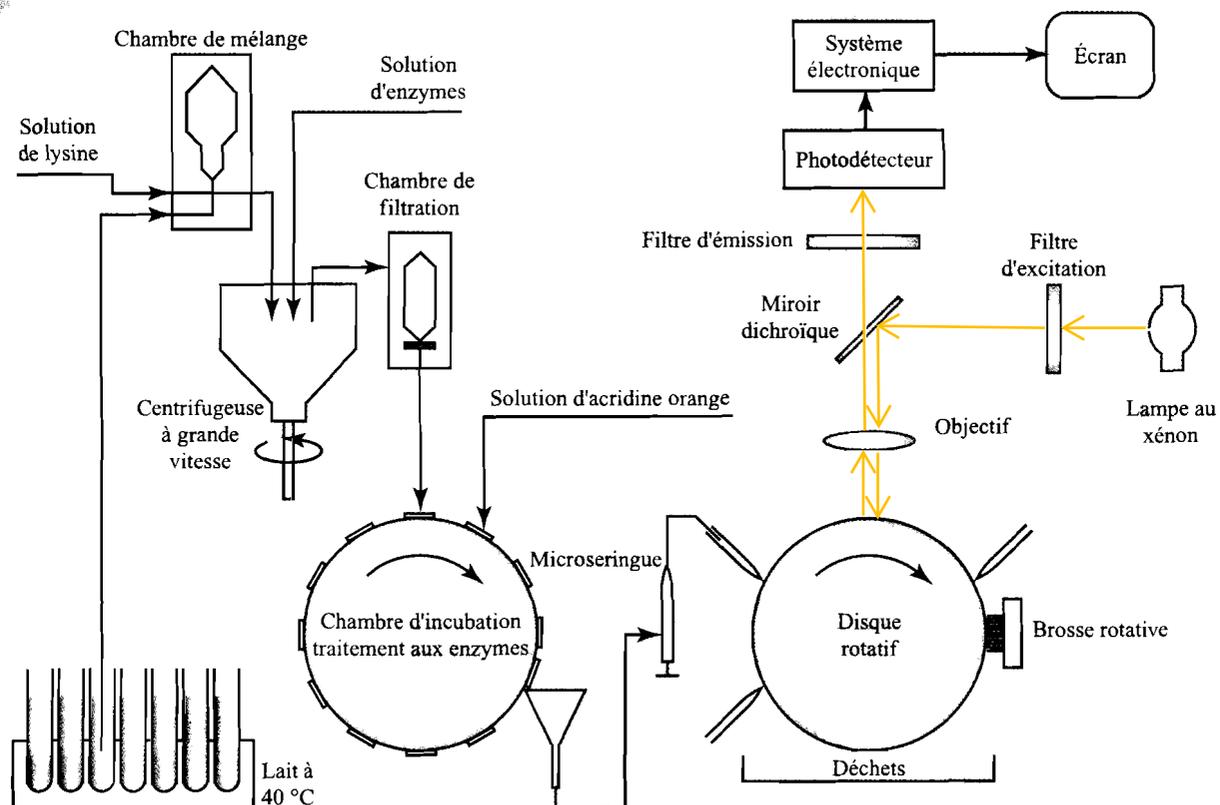


Fig. 15 – Schéma du Bactoscan 8000®

- **Première unité** : après traitement par un liquide de lyse dégradant les protéines et les cellules somatiques, le lait est transféré dans une centrifugeuse tournant à 45000 tours/minute où s'établit un gradient en deux phases : saccharose $d = 1,03$ et dextrane $d = 1,10$; les microorganismes viennent se placer à l'interface du fait de leur densité intermédiaire. Le contenu du bol est ensuite traité par des enzymes détruisant les résidus protéiques ou cellulaires, puis coloré par l'acridine orange.
 - **Deuxième unité** : l'échantillon coloré est repris et déposé à la surface d'un disque rotatif, tournant à 20 tours/minute. Le film liquide de 0,5 mm de large et 5 μm d'épaisseur, ainsi créé, passe sous l'objectif d'un microscope à épifluorescence et l'image est transmise à un photodétecteur qui transforme les signaux lumineux émis en impulsions électroniques qui pourront être comptées. Il n'y a cependant pas de contrôle visuel possible, ni stockage des informations.
- L'appareil peut analyser 80 échantillons à l'heure, soit une réponse rapide en 7 minutes environ. Il est autorisé pour le dénombrement des germes du lait cru en vue du paiement à la qualité. Son seuil de détection est de l'ordre de 10^4 UFC/mL. L'utilisation du Bactoscan[®] nécessite un calibrage permettant de transformer les résultats en UFC/mL, unité qui correspond à la méthode de référence.

2.4. Cytométrie en flux (CMF)

C'est une méthode récente et rapide de dénombrement et d'analyse d'échantillons. Elle permet de dénombrer bactéries et levures.

Il est possible d'évaluer en parallèle leur degré de viabilité par l'utilisation de marqueurs fluorescents ou de substrats de viabilité devenant fluorescents lorsqu'ils sont métabolisés dans la cellule. Dans ce cas, l'intensité de fluorescence reflète l'état physiologique des cellules. Il existe plusieurs types de réactifs, adaptés aux bactéries et aux levures. Cette analyse du signal (l'intensité de fluorescence) permet d'éviter les faux positifs.

Cette méthode fait appel à un appareil complexe : le cytomètre en flux.

2.4.1. Principe du cytomètre en flux

L'échantillon à analyser est traité pour l'extraction et le marquage fluorescent des microorganismes recherchés. Ces échantillons, entraînés par un flux liquide, passent devant une source lumineuse ; ils émettent alors une lumière fluorescente qui, transmise par l'objectif d'un microscope, peut être captée par un photomultiplicateur. Il est aussi possible d'observer à l'œil la cellule de mesure à l'aide d'un oculaire. Un système de filtres et de miroirs permet de passer simplement de l'un à l'autre. Cet appareil est composé de trois systèmes (Fig. 16).

- Le système **fluidique** : le produit est injecté au centre d'un liquide vecteur : le liquide de gaine. Ce liquide non miscible, très visqueux transporte le produit jusqu'à la cellule de mesure.
- Le système **optique** : dans la cellule de mesure, l'échantillon est soumis à un faisceau lumineux excitateur produit par une lampe à vapeur de mercure. Les cellules défilent les unes derrière les autres et émettent à une longueur d'onde différente de la longueur d'excitation. Cette lumière est captée par un photomultiplicateur ou transmise à l'oculaire si le filtre dichroïque est en position miroir total.
- Le système **électronique** : les signaux électriques issus du photomultiplicateur sont ensuite analysés, quantifiés et classés par un ordinateur qui rend le résultat sous forme d'un histogramme représentant la répartition des cellules dans la population en fonction de leur intensité de fluorescence. On peut alors vérifier l'homogénéité de l'ensemble et juger de la viabilité. L'aire du pic donne le nombre de cellules total pour un volume qui correspond au défilement du liquide avec un certain débit pendant un temps donné.

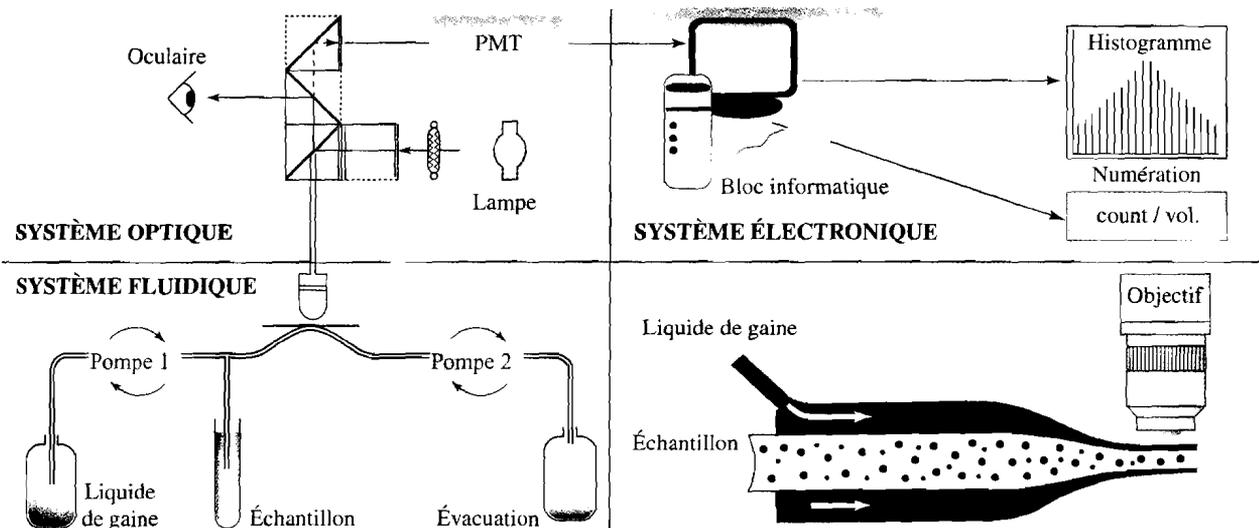


Fig. 16 – Schéma du cytomètre en flux

Les résultats donnent une bonne corrélation avec les résultats obtenus par la méthode de référence en milieu solide. L'appareil peut détecter sans préenrichissement jusqu'à 10^2 cellules par gramme de produit, et jusqu'à une levure pour 10 grammes.

2.4.2. Applications

Les marqueurs fluorescents utilisés sont de deux catégories :

- marqueurs de viabilité des cellules. Ce sont des substrats non fluorescents qui, après avoir traversé la membrane, libèrent sous l'action d'une enzyme active du métabolisme cellulaire un composé fluorescent qui reste dans le cytoplasme. Ces substrats fluorogènes enzymatiques doivent être adaptés aux microorganismes recherchés, ils ne colorent que des cellules vivantes ;
- marqueurs spécifiques de la population que l'on souhaite dénombrer (par exemple : flore totale, coliformes, levures). Ce sont alors des anticorps monoclonaux ou des sondes nucléiques.

Cette technique est utilisée pour le dénombrement des cellules somatiques dans le lait cru, ainsi que pour le dénombrement et le tri de la flore spécifique du yaourt à l'aide des sondes spécifiques.

Actuellement, cette gamme propose d'analyser la viabilité de ferments lactiques pour vérifier la qualité avant ensemencement mais aussi l'évolution au cours de sa conservation et, enfin, le suivi de fermentation lors de son utilisation.

Une autre application possible est la détection rapide des microorganismes dans les jus de fruits ou préparation de fruits, contaminés fréquemment par des levures.

Le gain de temps obtenu par de cette méthode permet la mise en place d'un contrôle rapide, notamment en cours de fabrication, autorisant des actions correctives immédiates mises en place par un système HACCP ou un contrôle de la qualité des matières premières.

2.4.3. Comparaison cytométrie sur filtre (CSF)- cytométrie en flux (CMF)

La CSF permet l'analyse visuelle d'images, il est donc possible de réaliser une observation et un contrôle d'événements rares ainsi que le stockage de ces images. C'est un atout important par rapport à la CMF dont l'analyse met en œuvre un photomultiplicateur qui analyse les images par détection des caméras en CSF, après calcul et intégration sous forme d'histogramme. Globalement, l'analyse en CSF permet une cadence plus élevée.

L'utilisation de photomultiplicateur en CMF permet une plus grande sensibilité que celle obtenue par détection des caméras. De plus, il est possible d'examiner une cellule à deux ou trois longueurs d'onde en émission, ce qui permet une étude multiparamétrique encore peu disponible en CSF. Cependant, il est possible de revenir, à l'aide des platines motorisées, très exactement sur une cellule déjà analysée et de l'exciter à une autre longueur d'onde.

2.4.4. Application du dénombrement par la méthode DEFT

Se reporter à la manipulation 8 : Dénombrement par la méthode DEFT de la flore totale du lait.

3. Évaluation de l'activité globale

3.1. Impédancemétrie

L'évaluation de la qualité microbiologique à l'aide des méthodes classiques de dénombrement pose souvent à l'industriel des contraintes qui ne sont plus compatibles avec les performances de la production. Il désire connaître rapidement la qualité des matières premières et libérer en toute sécurité les stocks de produits finis.

Pour répondre à ce besoin, des méthodes fondées sur la mesure d'un signal lié à la présence ou à l'activité de microorganismes ont été développées. Elles nécessitent encore un temps d'incubation, nettement diminué par rapport à celui des méthodes traditionnelles, raccourcissant ainsi les délais du contrôle indispensable dans le « process » de fabrication.

L'impédancemétrie mesure, au cours de la croissance microbienne dans un milieu nutritif, une baisse de l'impédance par rapport au même milieu dépourvu de germes.

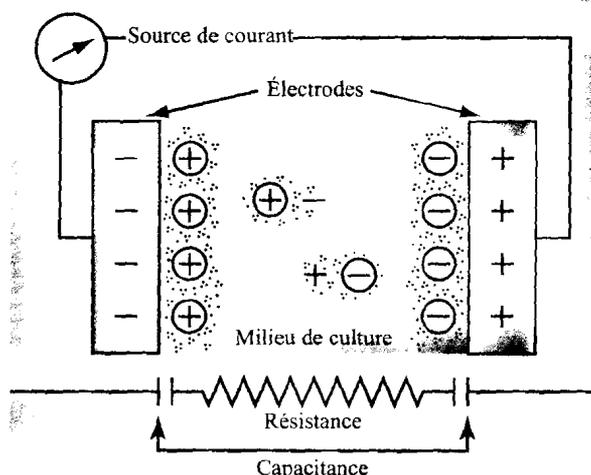


Fig. 17 – Schéma du principe de mesure du bactomètre

3.1.1. Principe de mesure de l'impédancemétrie

- L'**impédance** est la résistance que subit un courant alternatif pour traverser un milieu conducteur. Elle peut être mesurée en faisant passer un courant alternatif de bas voltage (100 à 1000 mV), variable en fréquence (100 Hz à 100 KHz) entre deux électrodes en acier inoxydable plongeant dans un milieu de culture. Elle résulte de deux propriétés du milieu : sa conductance et sa capacitance (Fig. 17).
- La **capacitance** C reflète la polarisation des électrodes due à l'accumulation de charges électriques à l'interface milieu-électrode.
- La **conductance** G (inverse de la résistance : $G = 1/R$) est liée à l'augmentation de la conductivité du milieu et rend compte des variations de l'ionisation dues au métabolisme microbien.

Il existe une relation impédance-capacitance-résistance :

$$Z^2 = R^2 + \frac{1}{(2\pi f C)^2}$$

Z = impédance (ohms).

R = résistance (siemens⁻¹) avec $R = 1/G$.

C = capacitance (farads).

f = fréquence (hertz).

À basse fréquence, l'impédance est surtout affectée par la capacitance, alors qu'à haute fréquence, elle dépend surtout de la conductance.

3.1.2. Principe de la quantification microbienne par impédancemétrie

Les changements d'impédance observés au cours du temps dans un milieu contaminé sont dus aux modifications de la composition chimique de ce milieu.

Durant leur croissance, les microorganismes dégradent des substrats électriquement neutres ou faiblement chargés (protéines, polysides...) et produisent des molécules plus petites ionisées (acides aminés, acides organiques...) conduisant à l'augmentation de la conductivité du milieu.

Ainsi, dans le cas de l'utilisation de milieux nutritifs peu tamponnés (*Plate Count Agar* par exemple), le métabolisme microbien se traduit principalement par une augmentation de la conductance G, et donc par une diminution de l'impédance Z.

Généralement, après un certain temps de culture appelé délai ou temps de détection (DD), l'augmentation de la concentration ionique devient suffisante pour entraîner une augmentation importante de la conductance du milieu, et donc un abaissement de l'impédance correspondant au seuil de détection (SD). Il a été déterminé expérimentalement que si le seuil de détection apparaît toujours lorsque le niveau de la population microbienne dans la cuvette de mesure a atteint 10^6 à 10^8 microorganismes/mL, le délai de détection dépend :

- de la charge microbienne initiale ;
- de la nature du contaminant ;
- des conditions d'incubation des échantillons.

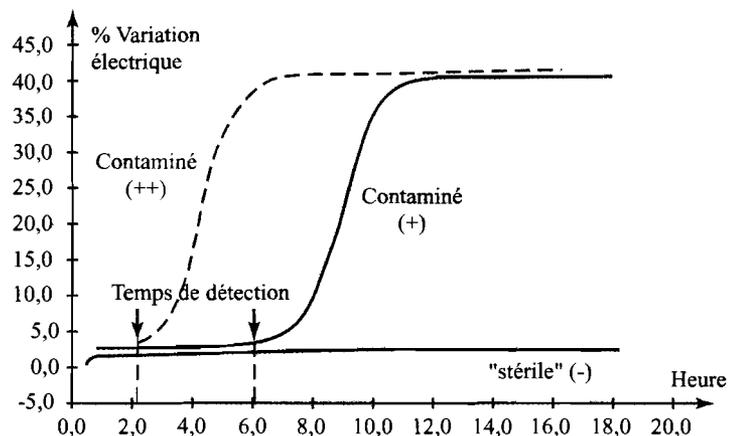


Fig. 18 – Détermination du temps de détection

3.1.3. Les facteurs influençant le délai de détection

3.1.3.1. Charge microbienne initiale de l'échantillon

Pour une microflore étudiée dans des conditions de culture semblables, la forme de la courbe de la variation de l'impédance en fonction du temps a une allure sigmoïde qui ne change pas avec la contamination initiale de l'échantillon.

La valeur du seuil de détection étant fixée (environ 10^7 microorganismes/mL), le délai de détection est d'autant plus long que le niveau de contamination initial est plus faible.

Dans la plupart des cas, il existe une relation décroissante entre le seuil de détection et le délai de détection telle que :

$$\log \text{Concentration} = a \cdot \text{DD}$$

avec $a < 0$ (Concentration exprimée en UFC/mL) (Fig. 19).

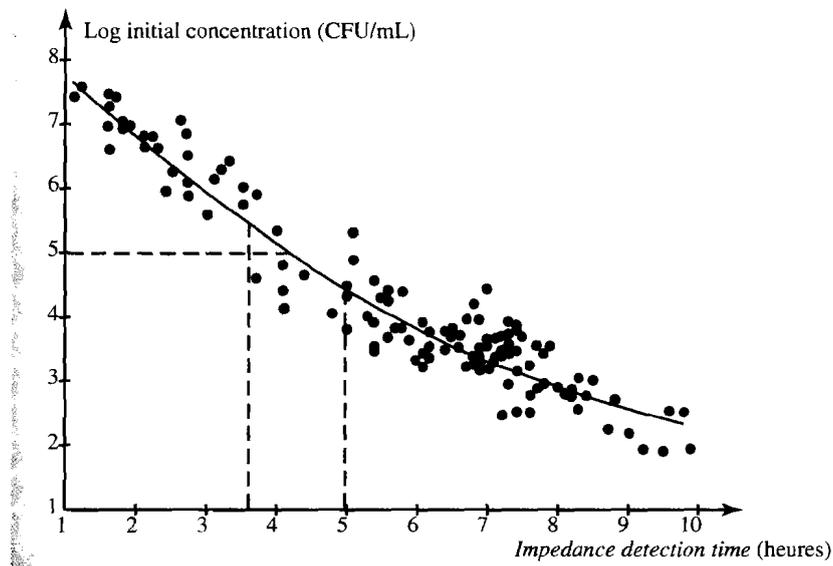


Fig. 19 – Courbe de calibration

REMARQUES

- Pour les microorganismes ayant subi des chocs physiologiques lors de la préparation de l'échantillon ou de la fabrication du produit, le délai de détection s'allonge car les germes ont du mal à se développer.
- Lors de la présence d'inhibiteurs de croissance dans l'échantillon, le délai de détection augmente sans rapport avec le niveau de contamination de l'aliment. Il faut alors adapter un protocole pouvant faire intervenir une dilution, une dialyse, l'addition d'un germe test...

3.1.3.2. Nature de la microflore contaminante

La pente a de la droite $\log(\text{concentration}) = f(\text{DD})$ dépend du type de microorganismes étudiés, et le délai de détection est d'autant plus rapide que le temps de génération des microorganismes est plus court.

3.1.3.3. Conditions d'incubation des échantillons

Les conditions d'incubation dépendent de la microflore recherchée.

Ainsi, selon la température d'incubation, il est possible d'étudier les microorganismes mésophiles ou psychrotrophes et, selon la nature du milieu de culture, de sélectionner le développement d'une microflore.

Les milieux doivent être très performants sur le plan nutritif afin de permettre une croissance rapide des microorganismes les plus difficilement cultivables ou stressés.

Par exemple, après un traitement thermique, il faut procéder à une revivification classique avant d'incuber dans l'appareil les échantillons dans un milieu enrichi en facteurs de croissance (vitamines, acides aminés...).

Des milieux spéciaux peu tamponnés et de concentration ionique bien définie ont été mis au point pour la mesure de l'impédance. Ces milieux doivent donner d'excellentes réponses au plan électrique, afin d'obtenir un signal très clair et très précis.

3.1.4. Le matériel

Le bactomètre est un appareil composé de deux parties principales :

- une **unité de mesure** (BPU ou *Bactometer Processing Unit*) : elle est capable d'assurer automatiquement l'incubation et la lecture simultanée des modules. Sa capacité est de 128 échantillons. Elle comprend deux incubateurs indépendants où la température peut être fixée entre 8 et 55 °C. Les échantillons sont répartis dans les 16 cuvettes d'un module à usage unique, au fond desquelles sont fixées les électrodes de mesure connectées au circuit dans l'incubateur.

Une lecture de chaque cuvette est effectuée toutes les 6 minutes pendant l'incubation, d'une durée variable de 3 heures à quelques jours si nécessaire. Le module permet l'utilisation de milieux de culture liquides ou solides en faibles quantités.

À tout moment, les modules peuvent être introduits dans l'incubateur isolément ou en série, sans interférer sur les analyses en cours. Le bactomètre est un système adaptable à l'augmentation du nombre d'échantillons à contrôler (64 à 512). Pour 512 tests, il faudra 4 BPU, avec une possibilité de 8 températures ;

– une **unité informatique**.

Un ordinateur exerce un contrôle permanent des opérations en cours, mémorise les valeurs, les traite et interprète les résultats. Les temps de détection s'affichent sur l'écran au fur et à mesure qu'ils sont obtenus et sont automatiquement interprétés au moyen de couleurs correspondant au niveau de contamination de l'échantillon (exemple : Bactometer bioMerieux). Une imprimante édite les résultats sous forme de rapports, illustrés par les courbes de croissance. L'automatisation et la gestion informatique permettent un grand nombre d'analyses en continu. La société SY-LAB (distribution FOSS ELECTRIC) commercialise le BacTrac 4100 qui permet la mesure de l'impédance par des procédures automatiques et un enregistrement permanent de la croissance bactérienne.

3.1.5. Applications

3.1.5.1. Quantification du niveau de contamination initiale d'un produit

La mesure de l'impédance permet d'estimer la charge microbienne initiale d'un produit.

Pour cela, il est nécessaire d'établir des courbes de calibration par rapport à la méthode de référence de dénombrement sur boîte de Petri, afin de montrer la relation entre le logarithme décimal du nombre d'UFC (Unité Formant Colonie) par mL et le délai de détection, qui peut être linéaire ou non.

L'appréciation de la qualité bactériologique du lait cru par impédancemétrie a fait l'objet de nombreux travaux. Il a été construit des courbes de calibration comme celle de la *figure 19*.

D'une part, les échantillons de lait cru ont été soumis au dénombrement des bactéries aérobies mésophiles sur milieu *Plate Count Agar*, après 48 heures d'incubation à 32 °C. Les analyses ont été effectuées en double pour chaque échantillon et les résultats exprimés en UFC/mL.

D'autre part, la contamination des échantillons de lait cru a été mesurée par impédancemétrie à une température d'incubation de 35 °C. Les temps de détection ont été déterminés automatiquement par l'appareil.

Ainsi, en fixant le niveau de contamination initiale, on peut déterminer la valeur du délai de détection correspondant. Celle-ci peut être utilisée comme critère d'appréciation pour procéder à un classement des laits crus en fonction de la qualité bactériologique. Il suffit alors de réaliser une incubation des échantillons de durée égale à la valeur du délai de détection, puis de les classer selon qu'il a été obtenu un signal en deçà du critère choisi ou non.

3.1.5.2. Quantification des principales flores microbiennes contaminantes

En déterminant les conditions expérimentales, on pourra détecter et numérer les principales flores microbiennes :

- la flore totale aérobie ;
- les entérobactéries ;
- les coliformes ;
- la flore lactique ;
- les levures/moisissures.

3.1.5.3. Test de stérilité

Ce test doit permettre de vérifier l'absence de microorganismes revivifiables dans le volume de produit contrôlé. Pour ce contrôle, un temps de détection, quel qu'il soit, signifie que l'échantillon est non stérile.

3.1.6. Domaines d'application dans l'industrie alimentaire

3.1.6.1. Détection de la présence de microorganismes et évaluation du degré de contamination

Cette détection peut être effectuée sur différentes catégories d'aliments.

• Produits laitiers :

- flore totale aérobie mésophile dans le lait cru, dans le lait pasteurisé, dans la crème glacée : détection d'une contamination de 10⁵ bactéries/mL de lait cru en ±4 heures ;
- coliformes dans le lait cru, dans le lait pasteurisé, dans la crème glacée : 10 coliformes/mL sont détectés en ±9 heures ;
- entérobactéries dans les yaourts, desserts, crèmes... : 100 entérobactéries/mL sont détectées en 8 heures ;
- flore psychrotrophe : dans le lait cru, le temps total pour le dénombrement est de 36 heures ;
- flore thermophile : 10 à 10² bactéries/mL sont détectées en 8 heures à 55°C ;
- absence de levures/moisissures dans les yaourts, desserts, crèmes... ;
- contrôle de stérilité dans le lait et la crème UHT : après une préincubation, la contamination est détectée en moins de 24 heures.

• **Viande – volaille – produits de la mer – légumes :**

- flore totale dans la viande crue, la volaille crue ou traitée crue, le poisson frais ou surgelé, les crevettes, les légumes frais ou surgelés : une contamination de 10^6 bactéries/g est détectée en 2 à 3 heures ;
- coliformes dans la viande crue, la volaille crue ou traitée crue, le poisson frais ou surgelé, les crevettes, les légumes frais ou surgelés : 10^3 coliformes/g sont détectés en 6 heures ;
- absence de coliformes dans la viande cuite, dans la volaille cuite traitée (salage, fumage...), dans le poisson cuit.

• **Boissons (jus de fruits, eau, bière...) :**

- levures/moisissures : présence de levures et moisissures en ± 48 heures ;
- flore totale : dans un échantillon d'eau, 10^3 bactéries/mL sont détectées en moins de 12 heures ;
- coliformes : dans l'eau, 10 coliformes/mL sont détectés en moins de 10 heures ;
- bactéries lactiques : ces bactéries, qui peuvent cultiver à des pH bas, sont détectées en 24 heures.

3.1.6.2. Autres domaines d'application

Ils sont les suivants :

- contrôle d'un « process » de fermentation ;
- prévision de la durée de conservation d'un produit ;
- efficacité de substances inhibitrices (conservateurs) ;
- évolution directe de la viabilité ou de la résistance phagique d'un ferment.

3.2. Dosage de l'ATP

L'ATP métrique est une méthode rapide permettant à l'industriel de diminuer le délai de réponse des contrôles microbiologiques, ceci afin d'être efficace pour :

- intervenir au cours d'un « process » et éviter ainsi la fabrication de produits non conformes ;
- suivre une activité métabolique ;
- accepter ou refuser un lot très rapidement ;
- vérifier la conformité de l'hygiène des installations.

L'ATP (adénosine 5 triphosphate) est un intermédiaire énergétique universel de la cellule vivante. Cette molécule est en relation directe avec l'activité de la cellule.

La quantité d'ATP intracellulaire est variable selon les types de cellules, ceci s'expliquant par des capacités métaboliques différentes ainsi que par la diversité de taille des cellules.

Si l'on considère une bactérie, la teneur moyenne en ATP est de 1 femtogramme ($1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$) alors que celle d'une cellule animale est de 100 à 500 fois plus élevée.

Lorsque la cellule meurt, la production d'ATP cesse et l'ATP qui préexistait est rapidement dégradé par les enzymes hydrolytiques (ATPases).

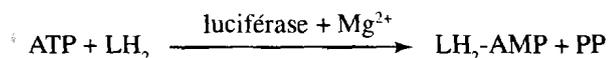
3.2.1. Principe du dosage

Il existe diverses méthodes pour doser l'ATP, mais la technique la plus rapide, d'une grande sensibilité et relativement précise, est la **bioluminescence**.

Cette technique originale utilise la capacité qu'ont certains organismes vivants (poissons, méduses, lucioles, vers lumineux, photobactéries) à émettre de la lumière de diverses couleurs, mettant en jeu une réaction enzymatique différente. Le coléoptère *Photinus pyralis*, plus connu sous le nom de luciole, possède un système photoémetteur utilisant l'ATP. En présence de Mg^{2+} , d'ATP et d'oxygène, la luciférine est oxydée sous l'action de la luciférase en oxyluciférine avec production de lumière.

Le mécanisme de la réaction *in vitro* peut être décomposé en deux étapes :

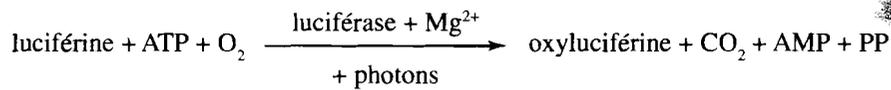
- activation de la luciférine LH_2 avec formation de luciféryl-adénylate et libération de pyrophosphate.



- oxydation de ce complexe en présence d'oxygène qui donne l'oxyluciférine dans un état excité, avec décarboxylation. Le retour à l'état électronique stable de l'oxyluciférine s'accompagne d'une émission de lumière :



soit :



La quantité de lumière émise à l'issue de la réaction est proportionnelle à la concentration d'ATP présente dans le milieu réactionnel à l'instant zéro.

Elle est recueillie par un tube photomultiplicateur qui l'amplifie et la transforme en courant électrique dont l'intensité est mesurée et exprimée en unités arbitraires ou Unités Relatives de Lumière (RLU).

Une corrélation peut être établie entre le nombre de RLU et la concentration en microorganismes viables, mesurée par des méthodes classiques (dénombrement après culture).

L'émission lumineuse est instantanée (délai de 25 ms) à $\lambda = 562 \text{ nm}$.

La vitesse de la réaction est maximale à 24°C, et très peu modifiée entre 18 °C et 28 °C.

La sensibilité du fluorimètre permet de doser 10^{-13} g d'ATP, donc théoriquement 100 bactéries dans le volume prélevé de l'échantillon.

La quantité d'ATP dans un milieu est en relation directe avec l'activité et le nombre des microorganismes.

Cependant, avant le dosage, une extraction de l'ATP microbienne par lyse des cellules doit être mise en œuvre grâce à des réactifs brevetés par les fabricants de matériel de dosage.

Cette extraction doit :

- provoquer la rupture des enveloppes cellulaires pour libérer l'ATP dans le milieu, de manière quantitative et reproductible ;
- inhiber rapidement les ATPases et toutes les enzymes extracellulaires.

Si le milieu à analyser renferme des cellules non microbiennes (ainsi dans le lait cru, par exemple, il y a présence de cellules épithéliales, de leucocytes), il sera nécessaire de réaliser une extraction sélective de l'ATP parasite de ces cellules grâce à des perméabilisants membranaires, puis de la détruire par hydrolyse (ATPase).

Si le milieu à analyser contient de l'ATP extracellulaire ou libre (lait transformé en lait UHT) issue de débris cellulaires, de cellules microbiennes abîmées ou de résidus de fabrication, elle sera également détruite avant le dosage par une ATPase. L'activité de ces ATPases sera ensuite inhibée lors de l'addition du réactif extractant pour doser l'ATP des cellules microbiennes.

3.2.2. Applications en industrie

- **Dénombrement**

Estimation de la flore totale du lait cru.

Flore contaminante post-pasteurisation.

Standardisation d'inoculum.

- **Contrôle de stérilité**

Jus de fruits.

Lait UHT.

- **Contrôle de propreté**

Jus de fruits.

Concentré de fruits.

Eaux.

Dessert lacté.

- **Activité et physiologie**

Optimisation des fermentations.

Étude et évaluation de l'efficacité de molécules à action bactéricide ou bactériostatique (conservateurs, désinfectants, antibiotiques).

Détection d'inhibiteurs de croissance (type antibiotique) dans des milieux (type lait).

Recherche de bactériophages dans des laits fermentés.

Contrôle de l'activité des ferments.

- **Contrôle de l'hygiène industrielle**

Détection des « nids microbiens ».

Contrôle en temps réel de l'efficacité des procédures de nettoyage-désinfection.

Plusieurs appareils sont commercialisés dont le Lumac (*Perstorp Analytical*) et le *Luminator-T* d'Euralam.

3.2.3. Exemple d'application de l'ATPmétrie

Se reporter à la manipulation 9 : Contrôle de stérilité d'un jus de fruits par ATPmétrie.

REMARQUES CONCERNANT LES MANIPULATIONS

1. Le matériel « de base » n'est pas précisé pour chaque manipulation, il comprend :
 - un bec électrique ou un bec Bunsen permettant d'assurer une zone de manipulation en condition d'aseptie ;
 - des étuves réglées aux températures souhaitées soit pour le maintien en surfusion, soit pour le séchage des milieux coulés, soit pour les incubations ;
 - des bains thermostatés réglés aux températures souhaitées ;
 - un vortex ;
 - une balance de précision et les instruments nécessaires à la pesée ;
 - un stomacher et les sacs étanches stériles ou un broyeur et son récipient en verre stérile.
2. Le matériel indiqué est spécifique à la manipulation.

Dénombrement après culture en milieu gélosé de la flore totale aérobie du lait pasteurisé conditionné

Méthode officielle : arrêté du 3 janvier 1985

<p>Objectifs</p>	<p>Ce dénombrement permet de répondre à l'un des critères fixés par l'arrêté du 30 décembre 1988 concernant les normes sanitaires et qualitatives du lait pasteurisé conditionné : jusqu'à J +4 (J = jour du conditionnement) moins de 30 000 microorganismes aérobies/mL. La méthodologie utilisée est le dénombrement en milieu gélosé ; il permet de dénombrer des laits présentant une faible ou une forte population microbienne.</p> <p>Rappels :</p> <ul style="list-style-type: none"> - on ne peut utiliser pour un dénombrement que des boîtes dont le nombre de colonies se situe entre 10 et 300 ; - le volume inoculé est de 1 mL. <p>Si le lait analysé satisfait au critère énoncé :</p> <table border="1" data-bbox="476 908 1236 1002"> <thead> <tr> <th>Dilution</th> <th>10⁰</th> <th>10⁻¹</th> <th>10⁻²</th> <th>10⁻³</th> <th>10⁻⁴</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Colonies/boîte</td> <td>< 3.10⁴</td> <td>< 3.10³</td> <td>< 3.10²</td> <td>< 30</td> <td>< 3</td> </tr> </tbody> </table> <p>Les résultats des inoculations des dilutions 10⁻² et 10⁻³ permettront d'obtenir un résultat. Si le lait ne satisfait pas au critère énoncé : concentration en microorganismes aérobies > 3.10⁴, les dilutions 10⁻³ et 10⁻⁴ permettront d'évaluer la concentration en germes aérobies.</p>	Dilution	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Colonies/boîte	< 3.10 ⁴	< 3.10 ³	< 3.10 ²	< 30	< 3
Dilution	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴								
Colonies/boîte	< 3.10 ⁴	< 3.10 ³	< 3.10 ²	< 30	< 3								
<p>Principe</p>	<p>La flore totale aérobie, encore appelée flore aérobie mésophile, est l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en présence d'oxygène à une température située entre 25 et 40 °C. Le dénombrement de ces microorganismes se fait dans un milieu susceptible de convenir à tous les microorganismes présents dans le lait : gélose glucosée au lait écrémé. L'incubation est réalisée à 30 °C pendant 72 heures.</p>												
<p>Milieux</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Diluant : peptone pancréatique de caséine. • Milieu de culture : gélose glucosée au lait écrémé pour dénombrement. 												
<p>Mode opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement de l'échantillon pour essai – Préparation de la solution mère Il s'agit de lait pasteurisé conditionné n'ayant pas atteint la date limite d'utilisation et ayant été conservé depuis son achat à 4 °C. <ul style="list-style-type: none"> - Agiter soigneusement en retournant rapidement l'emballage plusieurs fois. - Ouvrir l'emballage aseptiquement après avoir désinfecté la surface d'ouverture à l'alcool. Le prélèvement doit être réalisé trois minutes au plus après cette dernière étape. • Réalisation des dilutions Les dilutions sont réalisées en peptone pancréatique de caséine. Préparer les dilutions 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴. 												

Les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} permettent, quelle que soit la concentration en microorganismes du lait analysé, d'obtenir un résultat.
Pour chaque dilution 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} , deux essais sont réalisés.

• **Ensemencement et incubation**

Travailler avec les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

L'incubation se fait à $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 72 heures \pm 2 h.

Lecture et interprétation

Ne retenir pour le dénombrement que les boîtes dont le nombre de colonies (déterminé grossièrement) est compris entre 10 et 300.

– À l'aide d'un stylo compteur, dénombrer les colonies des boîtes retenues.

Expression du résultat

– Établir la formule littérale permettant le calcul :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \cdot \frac{1}{V}$$

$\sum c$ = nombre total de colonies dénombrées arrondi à 2 chiffres significatifs.

n_1 = nombre de boîtes utilisées à la première dilution retenue.

n_2 = nombre de boîtes utilisées à la deuxième dilution retenue.

d = dilution à partir de laquelle les premiers comptages ont été réalisés (dilution la plus faible).

V = volumeensemencé en mL.

– Application numérique :

– rendre un résultat conformément aux règles ;

– le résultat est exprimé par un nombre compris entre 1,0 et $9,9 \cdot 10^x$ et est comparé au critère donné.

Composition des milieux	Diluant : peptone pancréatique de caséine	Peptone pancréatique de caséine ou tryptone 1 g Chlorure de sodium 8,5 g Eau distillée qsp 1 000 mL pH 7
	Gélose au lait pour dénombrement	Peptone pancréatique de caséine ou tryptone 1 g Extrait de levure 2,5 g Glucose 1,0 g Lait écrémé en poudre 1,0 g Agar agar 12 à 18 g Eau distillée qsp 1 000 mL

Dénombrement après culture en profondeur d'un milieu gélosé de spores de microorganismes anaérobies sulfitoréducteurs dans les algues alimentaires

Objectifs	<p>Le dénombrement permet de répondre au critère relatif aux algues alimentaires (arrêté du 21 décembre 1979) : $N < 10^2/g$.</p> <p>La méthodologie proposée permet la destruction des formes végétatives et le seul dénombrement des spores ayant résisté au traitement thermique ; l'ensemencement en profondeur d'un milieu gélosé assure l'anaérobiose nécessaire au développement des microorganismes ; la composition du milieu permet la mise en évidence du caractère sulfitoréducteur.</p> <p>Le critère à vérifier est : $N < 10^2/g$; il est donc procédé à une dilution 10^{-1}.</p> <p>En effet :</p> <ul style="list-style-type: none"> - si, dans la suspension mère préparée par pesée de 10 g d'algues et mise en suspension dans 290 mL de diluant, les algues satisfont au critère énoncé, le nombre de spores par mL est de : $N' < 10^2 \cdot 10/300$, soit $N' < 3,3$ spores/mL. <p>Soit pour une prise d'essai de $V = 5$ mL :</p> <ul style="list-style-type: none"> - nombre de spores attendu par essai de la suspension mère : $n < (3,3 \times 5) = 17$, - nombre de spores attendu par essai de la dilution 10^{-1} : $n < 2$; <p>- si les algues ne satisfont pas au critère énoncé, les deux essais, suspension mère et dilution 10^{-1}, permettront d'obtenir un résultat.</p>
Principe	<p>Les microorganismes anaérobies sulfitoréducteurs sporulent et sont capables de se développer en condition d'anaérobiose et de manifester des propriétés sulfitoréductrices. La méthode sera capable de détecter les spores du genre <i>Clostridium</i>, mais aussi de certains <i>Bacillus</i>.</p> <p>Le milieu gélose VL sulfite citrate ferrique d'ammonium contient de l'amidon qui favorise la germination des spores, du sulfite qui est réduit en sulfure par les sulfitoréducteurs ; ce sulfure précipite avec les ions ferriques en formant un précipité noir.</p>
Milieux	<ul style="list-style-type: none"> • Diluant : milieu tryptone sel. • Milieu de culture : gélose VL sulfite citrate ferrique d'ammonium.
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement de l'échantillon pour essai – Préparation de la solution mère <ul style="list-style-type: none"> - Peser 10 g d'algues marines séchées en sachet destinées à l'alimentation humaine et les introduire dans le flacon de 290 mL de diluant. S_M, la suspension mère ainsi réalisée, a un volume total de 300 mL. - Homogénéiser soit au mixeur soit au Stomacher ; dans ce dernier cas, le diluant est directement introduit dans le sac. • Réalisation des dilutions <ul style="list-style-type: none"> - Ensemencer la suspension mère et sa dilution 10^{-1}.

manipulation 2	Ensemencement et incubation	<ul style="list-style-type: none"> - Préparer deux tubes (20 mm x 20 cm) de 5 mL de la suspension mère, et deux tubes de 5 mL de la dilution 10⁻¹. - Mettre ces tubes au bain thermostaté réglé à 80 °C pendant 10 min et refroidir immédiatement sous courant d'eau. - Maintenir les 4 tubes de gélose VL régénérés à 50 °C. - Verser dans chacun des deux tubes de suspension mère 20 mL de la gélose VL, et faire de même avec les deux tubes de dilution. - Homogénéiser sans introduire de bulles d'air. - Laisser solidifier. - Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures (selon la norme AFNOR NF V 08 019). - Incuber à 37 °C pendant 72 +/- 3 h (selon la norme NF V 59 107, norme spécifique gélatine alimentaire). <p>Il n'est pas indispensable d'incuber en jarre d'anaérobiose.</p>
	Lecture et interprétation	<p>Les colonies, dans la profondeur de la gélose, donc en anaérobiose, entourées d'un halo noir (réduction de sulfite en sulfure et précipitation du sulfure de fer) sont des colonies correspondant aux spores thermorésistantes d'anaérobies sulfitoréducteurs.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dénombrer les colonies isolées, entourées d'un halo noir ; cette numération peut être effectuée avant la fin du temps d'incubation si les colonies ont tendance à confluer.
Expression du résultat	<ul style="list-style-type: none"> - N = Le nombre de spores d'anaérobies sulfitoréducteurs dans 1 g d'algues. - N'_{SM} = nombre de spores d'anaérobies sulfitoréducteurs/mL de suspension mère. $N = N'_{SM} \cdot \frac{300}{10}$ $N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{V_{SM}}{m}$ <p> $\sum c$ = nombre total de colonies identifiées arrondi à 2 chiffres significatifs. n_1 = nombre de tubes utilisés pour la suspension mère. n_2 = nombre de tubes utilisés à la première dilution. v = volumeensemencé en mL. V_{SM} = volume en mL de la suspension mère. m = masse pesée de l'échantillon en g. </p> <p>Le résultat est exprimé en N spores d'anaérobies sulfitoréducteurs par gramme de produit.</p>	
Composition du milieu	Gélose VL sulfite citrate ferrique	<ul style="list-style-type: none"> Peptone trypsique 10 g Extrait de viande 3 g Extrait de levure 6 g Glucose 2 g Chlorure de sodium 5 g Chlorhydrate de cystéine 0,3 g Amidon soluble 5 g Na₂ S₂ O₅ 1 g Agar 15 g Eau qsp 1 000 mL

Dénombrement après culture en surface d'un milieu gélosé de *Staphylococcus aureus* dans le lait sec

Norme FIL 138 1986 pour les laits secs et FIL 145 1990
pour ce qui concerne le lait et les produits à base de lait

Objectifs

Ce dénombrement permet de répondre à l'un des critères établis par l'arrêté du 30 mars 1994 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation sous forme de poudre de lait : *Staphylococcus aureus* : $m = 10$, $M = 100$, $n = 5$, $c = 2$.

Rappel :

- m = critère pour le nombre de bactéries/g ;
- M = valeur maximale acceptable pour le nombre de bactéries/g ;
- n = nombre d'unités de l'échantillon ;
- c = nombre d'unités de l'échantillon dont la teneur en microorganismes peut être comprise entre m et M , les autres unités de l'échantillon ayant une teneur inférieure à m .

La méthodologie utilisée est une méthode de dénombrement après culture en surface d'un milieu gélosé.

Le choix du milieu de culture, sélectif et d'identification, permet la mise en évidence de tous les caractères spécifiques de *Staphylococcus aureus*, et d'effectuer ainsi la confirmation du microorganisme.

Le choix du mode de dénombrement en surface permet d'évaluer des populations de *Staphylococcus aureus* faibles ou fortes.

Rappels :

on ne peut utiliser que les boîtes dont le nombre de colonies est inférieur à 150.
Le volume déposé est de 0,1 mL sur une boîte ou de 1 mL réparti sur trois boîtes de 90 mm de diamètre dans le cas où l'on doit procéder à des dénombrements d'échantillons peu contaminés.

Si le lait analysé satisfait au critère énoncé :

	Suspension mère \approx dilution 10^{-1}	Dilution 10^{-2}	Dilution 10^{-3}
Colonies/mL	< 10	1	0,1

Seule la suspension mère est indispensable et peut être ensemencée à raison de 1 mL réparti sur trois boîtes.

Si le lait ne satisfait pas au critère énoncé, la dilution 10^{-2} peut permettre d'évaluer la concentration en *Staphylococcus aureus*.

Principe

Staphylococcus aureus est un microorganisme formant des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques, en surface d'un milieu de culture sélectif, et donnant une réaction positive à la coagulase.

	<p>Le milieu utilisé est le milieu de Baird-Parker qui contient :</p> <ul style="list-style-type: none"> – du chlorure de lithium et du tellurite de potassium inhibant la flore secondaire. La réduction du tellurite en tellure produit une coloration noire ; – une forte concentration en pyruvate et en glycine agissant comme accélérateurs de croissance des staphylocoques ; – du jaune d'œuf : les colonies de <i>Staphylococcus</i> sont entourées de halos dus à la lipolyse et la protéolyse.
Milieux	<ul style="list-style-type: none"> • Diluant : solution peptone sel (retenue par la norme ISO 6887). Autres diluants possibles : Ringer dilué au 1/4, solution de peptone, solution tampon phosphate. • Milieu de culture : gélose Baird-Parker ; les normes précisent la composition et la préparation du milieu si le milieu prêt à l'emploi n'est pas utilisé. <ul style="list-style-type: none"> – Le milieu est coulé en boîte de Petri (90 mm de diamètre) à raison de 15 mL. – Laisser solidifier. – Sécher les boîtes en les retournant, couvercle ouvert, dans une étuve à 45 °C environ 30 minutes. • Milieu de confirmation : bouillon cœur-cervele. Un autre milieu : bouillon pour staphylocoagulase peut également être utilisé. • Plasma de lapin.
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement de l'échantillon pour essai – Préparation de la suspension mère Il s'agit de lait en poudre dans son contenant non ouvert et n'ayant pas atteint la date de péremption. <ul style="list-style-type: none"> – Mélanger soigneusement le contenu du récipient en le secouant manuellement. – Travailler aseptiquement. – Ouvrir le récipient, prélever à l'aide d'une spatule stérilisée à l'alcool. – Peser 10 g de l'échantillon dans un bécher stérile et verser ensuite la poudre pesée dans une fiole d'Erlenmeyer ou un flacon contenant 90 mL du diluant préalablement chauffé à 45 °C. – Dissoudre en tournant lentement et agiter plusieurs fois. – Remettre le flacon ou l'erien dans le bain thermostaté à 45 °C et agiter de temps à autre avant l'utilisation. • Réalisation des dilutions Préparer les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} en solution peptone sel ou en Ringer dilué au 1/4. Pour chaque dilution, deux essais sont réalisés.
Ensemencement et incubation	<p>Travailler avec les dilutions 10^{-1} et 10^{-2}.</p> <p>L'incubation se fait à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant $20\text{ h} \pm 2\text{ h}$ selon la méthode officielle parue au JO du 3 janvier 1985 ou pendant 24 à 48 h selon la norme FIL 138 1986.</p>
Lecture et interprétation	<ul style="list-style-type: none"> – Après incubation de 24 h, marquer sur le fond des boîtes retenues les colonies typiques : <ul style="list-style-type: none"> – noires, réduction du tellurite en tellure de potassium, – brillantes et convexes de 1 à 1,5 mm de diamètre, – entourées d'une zone claire (protéolyse des protéines du jaune d'œuf) avec une zone pouvant montrer un anneau opaque (précipitation des acides gras issus de l'action de la lécithinase sur la lécithine du jaune d'œuf). – Incuber à nouveau pendant 24 h à 37 °C. – Après incubation, marquer les colonies typiques nouvellement développées et marquer les colonies atypiques : <ul style="list-style-type: none"> – noires, brillantes avec un bord blanc étroit mais sans zone claire, – ou grises, moins noires que les colonies typiques, sans zone claire et présentant une surface rugueuse.

	<p>Ces colonies atypiques, que l'on retrouve essentiellement dans les dénombrements de produits laitiers, sont dues à des <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase+.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Ne retenir que les boîtes présentant entre 15 et 150 colonies caractéristiques (typiques), et/ou non caractéristiques. Une des boîtes doit renfermer au moins 15 colonies. <p>Si un volume de 1 mL a été ensemencé sur trois boîtes, il faut effectuer le comptage sur ces trois boîtes comme s'il s'agissait d'une seule boîte.</p> <p>Si des colonies typiques prédominent à une dilution, et des atypiques à l'autre dilution, il faut retenir les deux dilutions.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Choisir sur les boîtes retenues 5 colonies (typiques ou atypiques) qui sont des colonies présumées de <i>Staphylococcus aureus</i> en vue du test de confirmation selon la norme FIL- MO – V 08 014. En choisir 3 de chaque type selon la norme V 08 057 1. <p>Dans le cas où 1 mL de la suspension mère a été ensemencé sur 3 boîtes, il faut repiquer dix colonies (MO).</p>
<p>Essais de confirmation</p>	<p>La confirmation se réalise par mise en évidence d'un caractère spécifique des <i>Staphylococcus aureus</i> : l'existence d'une coagulase.</p> <p>Le substrat de cette enzyme est le plasma de lapin.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Prélever la surface de chaque colonie typique ou atypique retenue à l'aide de l'anse de platine et transférer dans un tube de bouillon cœur-cervelle. – Incuber pendant 20 à 24 h à 37 °C. – Introduire 0,3 mL de plasma de lapin dans autant de tubes à hémolyse qu'il y a de colonies suspectes qui ont été repiquées en bouillon cœur-cervelle, puis transférer dans chaque tube 0,1 mL de chaque culture. – Réaliser un témoin constitué de 0,3 mL de plasma de lapin et 0,1 mL de bouillon cœur-cervelle non ensemencé. – Incuber à 37 °C et vérifier la coagulation du plasma après 4 à 6 h, il doit y avoir au moins 1/4 de volume coagulé, et on doit observer la non-coagulation du témoin. <p>La lecture définitive est réalisée à 24 heures.</p>
<p>Expression du résultat</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Calcul selon la norme ISO 7218 <ul style="list-style-type: none"> – Dans le cas où toutes les colonies présumées ont été confirmées : Σc = nombre total de colonies retenues. $N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{V_{SM}}{m}$ <p>Σc = nombre de colonies confirmées arrondi à 2 chiffres significatifs. n_1 = nombre de boîtes utilisées à la première dilution retenue. n_2 = nombre de boîtes utilisées à la seconde dilution retenue. d = dilution la plus faible, à partir de laquelle les premiers comptages ont été réalisés. v = volume ensemencé en mL. V_{SM} = volume de la suspension mère. m = masse pesée de l'échantillon en g.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Dans le cas où une proportion seulement des colonies ont été confirmées. $N = \frac{\Sigma a}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{V_{SM}}{m}$ <p>Σa = nombre total de microorganismes identifiés. Pour chacune des boîtes : $a = b \cdot C/A$. b = nombre de colonies répondant aux critères de confirmation. C = nombre total de colonies dénombrées. A = nombre de colonies testées.</p> <p>Le résultat est ensuite exprimé par un nombre compris entre 1,0 et $9,9 \cdot 10^x$ et est comparé au critère donné.</p>

• **Calcul selon la méthode de routine (norme NF V 08 057 1)**

– Calcul du nombre a de *Staphylococcus aureus* coagulase+ identifiés pour chaque boîte.

$$a = \frac{b^c \cdot c^c}{A^c} + \frac{b^{nc} \cdot c^{nc}}{A^{nc}}$$

A^c et A^{nc} = nombre de colonies typiques (ou caractéristiques) et atypiques (ou non caractéristiques) repiquées.

b^c et b^{nc} = nombre de colonies typiques ou atypiques qui sont coagulase +.

c^c et c^{nc} = nombre total de colonies typiques ou atypiques présumées coagulase + pour la boîte considérée.

Arrondir à un nombre entier.

– Calcul du nombre N de *Staphylococcus aureus* coagulase+ identifiés, présents dans la prise d'essai.

$$N = \frac{\sum a}{V \cdot 1,1 \cdot F}$$

$\sum a$ = somme des colonies identifiées sur les boîtes retenues.

F = dilution correspondant à la dilution la plus faible retenue : ce facteur intègre la dilution de la suspension mère.

V = volume en mL étalé sur chaque boîte.

Le résultat est ensuite arrondi à deux chiffres significatifs, exprimé par un nombre compris entre 1,0 et $9,9 \cdot 10^x$ et est comparé au critère donné.

• **Calcul selon la méthode officielle du 3 janvier 1985**

Si au moins 80 % des colonies testées se révèlent coagulase+, considérer que la totalité des colonies dénombrées correspond à *Staphylococcus aureus*, sinon exprimer le résultat en tenant compte des proportions.

• **Calcul selon les directives générales NF V 08 014**

La norme prévoit six modes de calcul : les deux premiers reprennent ceux de la méthode officielle, les autres précisent les règles pour effectuer la moyenne arithmétique des valeurs obtenues et les règles pour arrondir les dites valeurs.

Composition des milieux	Milieu Baird-Parker (Milieu de base voir 1.1.3)	Milieu de base 90 mL Solution de tellurite de potassium 1,0 mL Solution de pyruvate de sodium 5,0 mL Émulsion de jaune d'œuf 5,0 mL
	Bouillon cœur-cervelle	Peptone 10 g Extrait déshydraté de cervelle de veau 12,5 g Extrait déshydraté de cœur de bœuf 5,0 g Glucose 2,0 g Chlorure de sodium 5,0 g Hydrogéo-orthophosphate disodique 2,5 g Eau qsp 1 000 mL

Dénombrement par culture après filtration sur membrane des streptocoques du groupe D dans une eau destinée à la consommation humaine

Méthode de référence Norme Afnor NF T 90 416

Objectifs	<p>Ce dénombrement permet de répondre à l'un des critères fixés dans la circulaire du code de la Santé publique du 3 janvier 1989 : annexe 1-1E paramètres microbiologiques : « l'eau ne doit pas contenir de streptocoques fécaux dans 100 mL ».</p> <p>Le critère microbiologique est : absence de streptocoques fécaux dans 100 mL. Cela impose donc une recherche dans ce volume et nécessite une méthode de filtration sur membrane permettant de façon simple et rapide l'analyse d'un tel volume.</p>
Principe	<p>La méthode est fixée par arrêté du 20 février 1990. C'est une méthode de référence (norme Afnor NF T 90 416 : recherche et dénombrement des streptocoques du groupe D).</p> <p>Il existe parallèlement une norme ISO 7899/2 intitulée : recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Les streptocoques fécaux sont des microorganismes se développant à 37 °C sur milieu de Slanetz et Bartley, donnant une réaction positive à 44 °C sur une gélose biliée à l'esculine et une réaction négative à la catalase (ISO 7899/2). – Les streptocoques du groupe D sont des microorganismes se développant en 48 heures à 37 °C sur milieu à l'azoture de sodium, donnant des colonies typiques en réduisant le chlorure de triphényltétrazolium et une réaction négative à la catalase ; ils sont capables de cultiver en milieu de Litsky ou sur une gélose biliée à l'esculine en entraînant dans ce milieu l'hydrolyse de l'esculine (NF T 90 416). <p>On peut considérer que la recherche des streptocoques fécaux correspond à la recherche des streptocoques du groupe D, en y adjoignant l'essai à la catalase.</p>
Milieus	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu présomptif : milieu de Slanetz et Bartley • Milieu confirmatif : gélose biliée à l'esculine ou milieu de Litsky.
Mode opératoire	<p>L'eau doit être prélevée dans récipient stérile et maintenue à 4 °C jusqu'à l'analyse (au maximum 12 h).</p> <p><i>REMARQUE</i> Dans le cas particulier des eaux chlorées, il faut les recueillir en présence de bisulfite pour neutraliser l'action du chlore.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Choix des volumes à filtrer Le critère à vérifier est l'absence de streptocoques fécaux dans 100 mL d'eau ; il s'agit donc de filtrer 100 mL. Deux essais sont réalisés. • Ensemencement et incubation <ul style="list-style-type: none"> – Rincer l'entonnoir avec de l'eau stérile. – Filtrer sur membrane filtrante 100 mL.

	<ul style="list-style-type: none"> - Déposer la membrane, sans emprisonner de bulles d'air, sur un milieu présumptif Slanetz et Bartley coulé en petites boîtes de Petri . - Réaliser deux essais. - Retourner les boîtes et incuber à 37 °C pendant 48 heures. 	
Lecture et interprétation	<ul style="list-style-type: none"> - Dénombrer les colonies colorées en rouge, marron ou rose, c'est-à-dire résistant à la présence de l'inhibiteur (azoture de sodium) et réduisant le TTC en donnant un formazan qui colore ces colonies en rose, marron ou rouge. <p>• Confirmation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Repiquer, sur milieu de confirmation gélose biliée à l'esculine, un nombre convenable de colonies suspectes. Si n est le nombre de colonies identifiées et comptées sur la membrane, A le nombre de colonies repiquées se détermine par : <ul style="list-style-type: none"> - si $n < 5$: $A = n$; - si $5 < n < 25$: $A = 5$; - si $n > 25$: $A = n^{1/2}$. - Incuber à 37 °C pendant 24 h et 48 h ou à 44 °C selon la norme ISO. <p>Les streptocoques du groupe D résistent à la bile et hydrolysent l'esculine en formant la dihydroxy 6,7 coumarine (esculétine) qui se combine avec les ions ferriques pour donner un composé de coloration noire qui diffuse dans le milieu.</p> <p>Les colonies de streptocoques du groupe D présentent donc un halo noir.</p> <p>Si la confirmation est réalisée sur milieu de Litsky, l'apparition d'une culture en présence d'azoture de sodium et d'éthyl violet confirme la présence de streptocoques du groupe D.</p>	
Expression du résultat	<p>Le nombre de streptocoques du groupe D par 100 mL est donné par la formule :</p> $N = \frac{n \cdot b}{A} \cdot \frac{100}{V}$ <p>n = nombre de colonies identifiées et comptées sur la membrane. V = volume en mL de l'échantillon filtré. A = nombre de colonies repiquées. b = le nombre de colonies repiquées effectivement identifiées.</p> <p>Le résultat est donné avec une limite de confiance à 95 %.</p>	
Composition des milieux		
<p style="text-align: center;">Milieu Slanetz et Bartley</p> <p>Tryptone 20 g Glucose 5 g Monohydrogénophosphate de potassium 4 g Azoture de sodium 0,4 g Agar 15 à 20 g Eau qsp 1 000 mL Après dissolution par ébullition et refroidissement, ajouter 10 mL d'une solution de chlorure de triphényl 2,3,5 tétrazolium à 10 g/L</p>	<p style="text-align: center;">Gélose biliée à l'esculine</p> <p>Tryptone 17 g Peptone 3 g Bile de bœuf déshydratée .. 10 g Chlorure de sodium 5 g Esculine 1 g Citrate double de fer et d'ammonium 0,5 g Azoture de sodium 0,15 g Agar 15 à 20 g Eau qsp 1 000 mL</p>	<p style="text-align: center;">Milieu de Litsky</p> <p>Peptone 20 g Glucose 5 g Chlorure de sodium 5 g Dihydrogénophosphate de potassium 2,7 g Monohydrogénophosphate de potassium 2,7 g Azoture de sodium 0,3 g Solution d'éthyl violet 5 mL Eau qsp 1 000 mL</p>

Dénombrement après culture sur Petrifilm de *E. coli* dans les fromages à pâte molle au lait cru et au lait traité thermiquement

Attestation de validation des méthodes rapides d'analyse selon la norme AFNOR NF V 03 100

Objectifs

Ce dénombrement permet de répondre à l'un des critères fixés par l'arrêté du 30 mars 1994 concernant les critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché : fromages à pâte molle ou persillée au lait cru et au lait traité thermiquement.

Escherichia coli : $m = 10\ 000$, $M = 100\ 000$ ($n = 5$ et $c = 2$)

Rappel

m = critère pour le nombre de bactéries/g.

M = valeur maximale acceptable pour le nombre de bactéries/g.

n = nombre d'unités de l'échantillon.

c = nombre d'unités de l'échantillon dont la teneur en microorganismes peut être comprise entre m et M .

La méthodologie utilisée, dénombrement sur « Petrifilm *E. coli* », permet de dénombrer jusqu'à 150 colonies de *E. coli*. L'échantillon à analyser doit donc être dilué (la dilution moyenne est au 1/1 000) pour que les résultats du dénombrement soient exploitables et comparables efficacement au critère.

Les caractéristiques du milieu de culture et de la température d'incubation permettent d'identifier *Escherichia coli* sans réaliser de confirmation supplémentaire. Ces mêmes caractéristiques permettent de dénombrer, en plus des *Escherichia coli*, des coliformes thermotolérants (fermentant le lactose avec production de gaz à 44 °C) ; de plus, la méthode utilisée évite les interférences de comptage avec les débris alimentaires de l'échantillon.

Choix des dilutions

On ne peut utiliser pour un dénombrement que les films présentant un nombre de colonies compris entre 15 et 150. Le volume déposé est de 1 mL.

Soit N le nombre de *E. coli* par gramme de fromage.

Pour la suspension mère, le nombre de *E. coli* par mL est : $N' = (N \cdot 10) / 100$

Si le fromage analysé satisfait au critère énoncé : $N < m = 1 \cdot 10^4$ par g et $N' < 1 \cdot 10^4 \cdot 10 / 100$ soit $N' < 1 \cdot 10^3$ mL⁻¹, alors les dilutions pratiquées pourront être :

Dilution de la suspension mère	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
Nombre de colonies	< 1.10 ³	< 1.10 ²	< 10

Les dilutions 10⁻¹ et 10⁻² permettront d'obtenir un résultat.

Si le fromage ne satisfait pas au critère énoncé : $N > M = 1 \cdot 10^5$ par g et $N' > 1 \cdot 10^4$ mL⁻¹, alors les dilutions pratiquées seront :

Dilution de la suspension mère	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Nombre de colonies	> 1.10 ⁴	> 1.10 ³	> 1.10 ²	> 10

Les dilutions 10⁻² et 10⁻³ permettront d'obtenir un résultat.

<p>Principe</p>	<p><i>Escherichia coli</i> est définie comme une entérobactérie capable de fermenter le lactose avec production de gaz en 24 heures à 44 °C ; elle est de plus β-D-glucuronidase positive (pour 94 à 97 % des souches). Il est à noter que <i>Escherichia coli</i> entérohémorragique de sérotype O157 : H7 est β-D-glucuronidase négative.</p> <p>Le milieu utilisé est rendu sélectif par l'action des sels biliaires et du cristal violet, il contient du lactose et un indicateur de pH ; le système d'incubation permet de piéger les bulles de gaz éventuellement produites lors de la fermentation du lactose.</p> <p>La mise en évidence de la β-D-glucuronidase rend le dénombrement spécifique de <i>E. coli</i>.</p>
<p>Milieux</p>	<p>Le Petrifilm se présente sous forme de deux feuillets contenant tous les éléments nutritifs et les indicateurs nécessaires au dénombrement de <i>E. coli</i>.</p> <p>Film supérieur Adhésif avec TTC Gel soluble à l'eau froide</p> <p>Le film inférieur est imbibé du milieu VRBL (cristal violet, rouge neutre, bile, lactose) :</p> <p>Film inférieur Mousse de polystyrène Milieu VRBL +indicateur de glucuronidase Film en polyester</p> <p>– le cristal violet et la bile ont une action inhibitrice sur les microorganismes Gram+ ;</p> <p>– la fermentation du lactose se traduit par une acidification et le virage du rouge neutre à sa teinte acide : (pH < 6,8) rouge.</p> <p>S'il y a production de gaz résultant de la fermentation du lactose, cela se traduit par la formation d'une bulle piégée entre les deux films.</p> <p>L'indicateur coloré BCIG (5 bromo 4 chloro 3 indoxyl β-D-glucuronide) est le substrat de la β-D-glucuronidase : enzyme spécifique de <i>E. coli</i>, et il y a formation d'un chromogène bleu qui précipite autour des colonies de <i>E. coli</i>.</p> <p>La présence de TTC (chlorure de triphényltétrazolium) réduit par les microorganismes entraîne une coloration rouge de l'ensemble des colonies cultivant sur le milieu.</p>
<p>Mode opératoire</p>	<p>• Prélèvement de l'échantillon pour essai – Préparation de la suspension mère À partir d'un fromage mis sur le marché (selon l'annexe 1 de la note de service du 27 mars 1986 relative à l'exportation des fromages à pâte molle concernant les méthodes de contrôle bactériologique) :</p> <ul style="list-style-type: none"> – développer l'emballage du fromage ; – enlever l'éventuelle croûte ; – prélever dans la masse deux secteurs non contigus et ajuster leur poids à 10 g ; – réaliser en malaxeur ou par broyage une suspension mère correspondant à une suspension de 10 g dans 90 mL de diluant, soit 100 mL de suspension mère. <p>• Réalisation des dilutions Préparer les dilutions 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³ en solution à 2 % de phosphate dipotassique stérile pH 7,5 ± 0,1 réchauffée à 40 °C.</p>
<p>Ensemencement et incubation</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Placer le Petrifilm sur une surface plane. – Soulever le film protecteur et déposer 1 mL de la dilution 10⁻³ au centre du premier Petrifilm. – Avec la même pipette, déposer 1 mL de la dilution 10⁻² au centre du deuxième Petrifilm et faire de même pour la dilution 10⁻¹. – Recouvrir avec le film supérieur et étaler l'inoculum avec le diffuseur plastique (face lisse vers le bas) en exerçant une légère pression. – Incuber à 44 °C dans une étuve, dans laquelle un béccher rempli d'eau aura été placé de façon à réduire la déshydratation, pendant 24 h ± 2 h.

Lecture et interprétation	<p>Ne travailler qu'avec les films présentant un nombre de colonies de 15 à 150.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les colonies de <i>E. coli</i> apparaissent : <ul style="list-style-type: none"> - bleues : précipité bleu autour de la colonie dû à l'action de la β-D-glucuronidase sur le BCIG (5 bromo 4 chloro 3 indoxyl β-D-glucuronide) ; - avec une bulle de gaz : la fermentation du lactose se fait avec production de CO₂ piégé entre les deux films. - Les colonies des autres coliformes apparaissent rouges (réduction du TTC et virage du rouge neutre) et avec bulle de gaz. - Les colonies non coliformes sont également rouges (réduction du TTC) mais sans bulle de gaz. <p style="text-align: center;">REMARQUE</p> <p>Si une bulle de gaz n'est pas associée à une colonie il ne faut pas la compter.</p> <p>Si une colonie bleue n'est pas associée à une bulle de gaz, il peut s'agir de <i>E. coli</i> agazogène : il faut alors procéder à une confirmation de l'appartenance à <i>E. coli</i>.</p> <p>Si le film ne présente pas de colonies bleues mais de très nombreuses colonies rouges, il faut prolonger l'incubation de 24 heures pour confirmer le résultat.</p>	
Expression du résultat	Rendre le résultat conformément aux règles et le comparer au critère énoncé.	
Composition du milieu	Gélose VRBL	Peptone de viande 7,0 g Extrait de levure 3,0 g Lactose 10 g Sels biliaires 1,5 g Na Cl 5,0 g Rouge neutre 0,03 g Cristal violet 0,002 g Agar agar 13,0 g Eau distillée qsp 1 000 mL

Dénombrement à l'aide du système spiral[®] des coliformes thermotolérants dans la chair à saucisse crue

Selon méthode normalisée NF V 08-100

<p>Objectif</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Choix de la méthode à l'Ensemenceur spiral[®] L'utilisation du système spiral[®] a été normalisée en octobre 1987. Cette méthode d'ensemencement et de dénombrement peut être utilisée pour tout produit et pour toute flore recherchée. Il faut adapter, dans ce cas, le milieu et les conditions de culture à la catégorie de microorganismes recherchée. Cette méthode de dénombrement sera préférentiellement choisie pour un produit risquant d'être fortement contaminé. En effet, l'intérêt de la méthode est de pouvoir dénombrer des suspensions riches sans effectuer de dilutions, car le volume délivré en surface d'une grande boîte de Petri est très faible : 49,2 µL, alors qu'il est de 0,1 mL ou de 1 mL dans les méthodes classiques. L'objectif est donc d'adapter une méthode de dénombrement de coliformes thermotolérants en milieu solide à l'utilisation du système spiral[®]. Il faut pour cela choisir le milieu adéquat. C'est le milieu VRBL (violet cristal, rouge neutre, bile, lactose) qui a été choisi. : milieu décrit dans la méthode de routine de dénombrement des coliformes thermotolérants à 44 °C. • Répondre aux critères microbiologiques appliqués à la chair à saucisse La précision du dénombrement par la méthode spiral[®] n'est satisfaisante que pour au moins 15 colonies par boîte, soit $3 \cdot 10^2$ microorganismes par millilitre de la suspension mère pour un inoculum de 49,2 µL, ou $1,5 \cdot 10^2$ microorganismes par millilitre de la suspension mère pour un inoculum de 100 µL. La suspension mère étant préparée à partir de 1 g pour 10 mL, le produit d'origine doit contenir au minimum $3 \cdot 10^2 \cdot 10$, soit $3 \cdot 10^3$ microorganismes par gramme de produit ou $1,5 \cdot 10^2 \cdot 10$, soit $1,5 \cdot 10^3$ microorganismes par gramme de produit. Il est cependant possible, si l'on suspecte une suspension faiblement contaminée, de réaliser deux ou trois ensemencements sur la même boîte. Il faudra donc diviser le résultat obtenu respectivement par deux ou trois. En réalisant trois ensemencements sur la même boîte et pour un inoculum de 49,2 µL, on peut alors dénombrer 15 colonies pour $3 \cdot 49,2 \mu\text{L}$, soit $3 \cdot 10^2 / 3 = 10^2$ microorganismes par mL de suspension mère, donc 10^3 microorganismes par gramme de produit. Cette méthode peut alors être appliquée pour un critère de 10^3 microorganismes par gramme de produit ; cependant, elle ne peut l'être pour des critères inférieurs. La chair à saucisse crue répond aux caractéristiques suivantes : « Produits de charcuterie crus, hachés, à consommer après cuisson. » Le critère concernant les coliformes fécaux est de : $< 10^3$ coliformes fécaux par gramme de produit.
<p>Principe</p>	<p>Le milieu VRBL est sélectif des coliformes par la présence de sels biliaires et de cristal violet et permet la lecture du caractère lactose. Incubé à 44 °C, ce milieu permet de sélectionner les coliformes thermotolérants (norme NF V08-060 de mars 1996).</p>

	La norme préconise une méthode en double couche, pour éviter un envahissement. Il faudra donc couler en surface une couche de milieu VRBL après complète absorption de l'inoculum.
Milieus et matériel	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu Gélose VRBL.
	<ul style="list-style-type: none"> • Matériel <ul style="list-style-type: none"> – Ensemenceur spiral® (Intersciences). – Grille calibrée spirale transparente. – Godets stériles. – Fioles à vide de 1 à 2 L de capacité et pompe à vide donnant une dépression de 50 à 60 cm de Hg. – Filtres en acier inoxydable, stérilisables, adaptés aux godets avec tamis de 32x32 mm à mailles de 100 à 500 µm. – Flacon contenant 10 mL de tryptone sel et broyeur, ou Stomacher et sac contenant 10 mL de tryptone sel. – Désinfectant liquide : eau de Javel à 12 °chlorométrique ou alcool à 95 % (v/v).
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement de l'échantillon pour essai – Préparation de la suspension mère <ul style="list-style-type: none"> – Prélever au scalpel stérile 10 g de chair à saucisse et transférer stérilement dans un flacon stérile ou dans un sac plastique pour malaxeur Stomacher, à compléter à 100 mL avec le diluant stérile. On peut également prélever une quantité approximative de chair à saucisse et transférer en flacon stérile préalablement taré. Peser l'ensemble précisément, en déduire la masse pesée, ajouter un volume de diluant (mL) égal à 9 fois la masse pesée exprimée en grammes. – Réaliser le broyage. – Il est nécessaire de filtrer le broyat obtenu pour ne pas boucher le système de distribution de l'échantillon. Si l'on utilise le Stomacher, le sac plastique est muni sur le côté d'une bande filtrante et il suffit de prélever le filtrat. Il n'est pas nécessaire dans la méthode à l'Ensemenceur spiral® d'effectuer des dilutions.
	<ul style="list-style-type: none"> • Ensemencement et incubation <ul style="list-style-type: none"> – Remplir un godet de désinfectant liquide et un autre avec de l'eau stérile pour la désinfection et le rinçage de l'appareil. – Mettre sous vide le circuit d'aspiration de l'Ensemenceur spiral®. – Désinfecter le système en aspirant du désinfectant pendant 1 à 2 secondes, puis rincer par aspiration d'eau stérile pendant 1 à 2 secondes (répéter ce rinçage 5 fois). – Remplir un godet de la suspension mère filtrée. – Aspirer une quantité suffisante d'inoculum sans faire de bulles et fermer la vanne d'aspiration avant de retirer le stylet. – Placer la boîte de Petri contenant le milieu bien au centre de la platine tournante et baisser le stylet au contact du milieu, sur lequel il doit reposer librement. – Après absorption de l'inoculum, couler la couche de milieu VRBL en surfusion. Laisser solidifier. – Retourner les boîtes de milieuensemencées. – Les placer à l'étuve à 44 °C pendant 24 heures. – Désinfecter l'appareil entre chaque ensemencement.
Lecture et interprétation	<p>La grille calibrée permet le dénombrement. C'est un cercle de 77 mm de diamètre divisé en 2 couronnes par 3 cercles concentriques équidistants et en 8 secteurs égaux espacés de 45 °. Certaines couronnes sont encore divisées en 3 (<i>Fig. 8, page 58</i>).</p> <ul style="list-style-type: none"> – Compter les colonies rouges (lactose positive) dans les secteurs divisés en trois, en commençant par la zone la plus externe, puis éventuellement dans la zone suivante jusqu'à en dénombrer 20 ; continuer à tout compter dans la zone où la 20^e colonie a été comptée.

- Compter le nombre de colonies dans l'aire symétrique par rapport au centre des cercles (diamétralement opposés).
- Totaliser les deux chiffres obtenus.
S'il y a moins de 20 colonies dans un secteur, compter toutes les colonies de la boîte.

Expression du résultat

Le nombre N de coliformes fécaux par gramme de chair à saucisse est évalué par la formule suivante.

$$N = \frac{(n_1 + n_2)}{V_{\text{tot}}} \cdot \frac{V}{m}$$

m : masse pesée de chair à saucisse.

V : volume total de la suspension mère.

n_1 et n_2 : nombre de colonies comptées sur deux secteurs diamétralement opposés, pour en avoir au moins 20 par secteur, en partant des zones les plus externes.

V_{tot} : Volume correspondant à la totalité des deux secteurs dans lesquels les colonies ont été dénombrées. Ce volume est donné par le constructeur de l'appareil.

N : quantité de coliformes thermotolérants par gramme de chair à saucisse.

• Exemples

- Si l'on compte 25 et 42 dans les zones 3c :

$$V_{\text{tot}} = 0,54 \cdot 10^{-3} \text{ mL}$$

$$n_1 + n_2 = 25 + 42 = 67$$

$$m = 9,25 \text{ g}$$

$$V = 9 \cdot 9,25 = 83,25 \text{ ml} \quad N = \frac{67}{0,54 \cdot 10^{-3}} \cdot \frac{83,25}{9,25} \quad \text{par gramme de chair à saucisse}$$

- On dénombre le même nombre de colonies mais dans deux secteurs plus grands représentant chacun un huitième de cercle :

$$V_{\text{tot}} = 12,3 \cdot 10^{-3} \text{ mL}$$

$$n_1 + n_2 = 25 + 42 = 67$$

$$N = \frac{67}{12,3 \cdot 10^{-3}} \cdot \frac{83,25}{9,25} \quad \text{par gramme de chair à saucisse}$$

Composition du milieu**Composition du milieu VRBL**

Peptone	7 g
Extrait de levure	3 g
Sels biliaries	1,5 g
Lactose	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,002 g
Agar-agar	12 à 18 g
Eau	qsp 1 000 mL

Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition 15 minutes. Ajuster le pH pour qu'il soit à 7,4 après ébullition.

Ne pas autoclaver le milieu, mais le préparer extemporanément.

Dénombrement après culture en milieu liquide des coliformes dans les quenelles fraîches

NF ISO 4831 indice de classement V 08- 016 de juillet 1991

Directives générales pour le dénombrement des coliformes : technique du nombre le plus probable

Objectif	<p>Il s'agit de répondre à l'un des critères microbiologiques relatifs aux produits de charcuterie cuits et quenelles emballées sous plastique ou non (Arrêté du 21 décembre 1979 : coliformes à 30 °C < 10³ par gramme).</p> <p>La méthodologie utilisée est le dénombrement en milieu liquide, avec une étape d'enrichissement sélectif permettant la multiplication préférentielle des coliformes et une étape de confirmation sur un milieu sélectif et d'identification.</p>																									
Choix des dilutions	<p>Il s'agit de savoir si les quenelles satisfont au critère établi : moins de 10³ coliformes/g.</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="padding: 5px;">Dilution</th> <th style="padding: 5px;">Suspension mère = dil 10⁻¹</th> <th style="padding: 5px;">10⁻²</th> <th style="padding: 5px;">10⁻³</th> <th style="padding: 5px;">10⁻⁴</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="5" style="padding: 5px;">Si le produit satisfait au critère</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Nombre de coliformes/mL</td> <td style="padding: 5px;">< 100</td> <td style="padding: 5px;">< 10</td> <td style="padding: 5px;">< 1</td> <td style="padding: 5px;">0</td> </tr> <tr> <td colspan="5" style="padding: 5px;">Si le produit ne satisfait pas au critère</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Nombre de coliformes/mL</td> <td style="padding: 5px;">> 100</td> <td style="padding: 5px;">> 10</td> <td style="padding: 5px;">> 1</td> <td style="padding: 5px;">0</td> </tr> </tbody> </table> <p>Les trois premières dilutions permettront dans tous les cas de répondre à l'objectif, cependant, les directives générales recommandent d'effectuer un nombre de dilutions tel que les tubes de la dernière dilution soient négatifs, donc les quatre dilutions sont ensemencées.</p>	Dilution	Suspension mère = dil 10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Si le produit satisfait au critère					Nombre de coliformes/mL	< 100	< 10	< 1	0	Si le produit ne satisfait pas au critère					Nombre de coliformes/mL	> 100	> 10	> 1	0
Dilution	Suspension mère = dil 10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴																						
Si le produit satisfait au critère																										
Nombre de coliformes/mL	< 100	< 10	< 1	0																						
Si le produit ne satisfait pas au critère																										
Nombre de coliformes/mL	> 100	> 10	> 1	0																						
Principe	<p>Les coliformes sont des bactéries capables de cultiver en présence de sels biliaries ou d'agents de surface tensioactifs et qui, à la température de 30 °C, 35 °C ou 37 °C, provoquent la fermentation du lactose avec production de gaz.</p> <ul style="list-style-type: none"> - La première étape consiste à favoriser le développement des coliformes résistant à la présence d'agents tensioactifs, sur un milieu riche, et à leur permettre d'exprimer le caractère métabolique de fermentation du lactose avec production de gaz. - La seconde étape est réalisée sur un milieu sélectif n'autorisant que le développement des coliformes, résistant à la présence de sels biliaries et du vert brillant, et leur permettant d'exprimer le caractère métabolique de fermentation du lactose avec production de gaz. 																									
Milieux	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu d'enrichissement sélectif : bouillon à la tryptose et au lauryl sulfate : double et simple concentration (+ cloche de Durham pour les seuls milieux simple concentration) • Milieu de confirmation : bouillon lactosé bilié au vert brillant + cloche de Durham. 																									

	Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Réalisation de la suspension mère Sans norme spécifique, on peut suivre un protocole classique de réalisation, à savoir peser 10 g de produit et les introduire dans 90 mL de diluant ; réaliser le broyage : la suspension mère représente donc une dilution 10^{-1} du produit. 																							
		<ul style="list-style-type: none"> • Réalisation des dilutions Dilutions $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ en milieu tryptone sel. 																							
		<ul style="list-style-type: none"> • Dénombrement des coliformes - Ensemencer les dilutions préparées dans le milieu d'enrichissement sélectif : bouillon à la tryptone et au lauryl sulfate. <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Milieu double concentration</th> <th colspan="3">Milieu simple concentration</th> </tr> <tr> <th>Dilutions</th> <th>Suspension mère</th> <th>Sm</th> <th>10^{-2}</th> <th>10^{-3}</th> <th>10^{-4}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Volume inoculé (mL)</td> <td>10</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Nombre de tubes</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> - Incuber à 30 °C ou 35 °C ou 37 °C (le choix est laissé dans les directives) pendant 24 h \pm 2 h. Ce temps d'incubation peut être prolongé jusqu'à 48 h si, au bout de 24 heures, ni trouble ni dégagement gazeux ne sont observés. 		Milieu double concentration	Milieu simple concentration			Dilutions	Suspension mère	Sm	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Volume inoculé (mL)	10	1	1	1	1	Nombre de tubes	3	3	3	3	3
		Milieu double concentration	Milieu simple concentration																						
Dilutions	Suspension mère	Sm	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}																				
Volume inoculé (mL)	10	1	1	1	1																				
Nombre de tubes	3	3	3	3	3																				
	<ul style="list-style-type: none"> • Confirmation - Repiquer une anse de chaque milieu double concentration dans un tube de milieu de confirmation : bouillon lactosé bilié au vert brillant + cloche de Durham. - Repiquer de même une anse de chaque milieu simple concentration présentant soit un trouble, soit un dégagement gazeux, dès que l'un des deux caractères se manifeste. - Incuber les milieux de confirmation à 30 °C, 35 °C, ou 37 °C pendant 24 ou 48 h. 																								
	Interprétation des résultats	Sont considérés comme positifs, et affectés du chiffre 1, les tubes présentant un dégagement gazeux après 24 h \pm 2 h ou 48 h \pm 2 h.																							
	Expression du résultat	Le nombre de coliformes par gramme est obtenu en multipliant le NPP par l'inverse du taux de la dilution la plus faible retenue pour la détermination du NPP (en tenant compte de la dilution de la suspension mère). Si cette dilution correspond aux tubes double concentration ensemencés avec 10 mL de la suspension mère, il faut diviser le NPP par 10. Exprimer ce résultat avec les limites de confiance données par le <i>tableau 3 (page 62)</i> .																							
	Composition des milieux	<table border="1"> <tr> <td>Bouillon à la tryptose et au lauryl sulfate simple concentration</td> <td> Tryptose 20 g Lactose 5 g Hydrogénomonophosphate de potassium 2,75 g Dihydrogénophosphate de potassium 2,75 g Chlorure de sodium 5 g Lauryl sulfate de sodium 0,1 g Eau distillée qsp 1 000 mL </td> </tr> <tr> <td>Bouillon lactosé bilié au vert brillant</td> <td> Peptone 10 g Lactose 10 g Bile de bœuf déshydratée 20 g Vert brillant 0,0133 g Eau qsp 1 000 mL </td> </tr> </table>	Bouillon à la tryptose et au lauryl sulfate simple concentration	Tryptose 20 g Lactose 5 g Hydrogénomonophosphate de potassium 2,75 g Dihydrogénophosphate de potassium 2,75 g Chlorure de sodium 5 g Lauryl sulfate de sodium 0,1 g Eau distillée qsp 1 000 mL	Bouillon lactosé bilié au vert brillant	Peptone 10 g Lactose 10 g Bile de bœuf déshydratée 20 g Vert brillant 0,0133 g Eau qsp 1 000 mL																			
Bouillon à la tryptose et au lauryl sulfate simple concentration	Tryptose 20 g Lactose 5 g Hydrogénomonophosphate de potassium 2,75 g Dihydrogénophosphate de potassium 2,75 g Chlorure de sodium 5 g Lauryl sulfate de sodium 0,1 g Eau distillée qsp 1 000 mL																								
Bouillon lactosé bilié au vert brillant	Peptone 10 g Lactose 10 g Bile de bœuf déshydratée 20 g Vert brillant 0,0133 g Eau qsp 1 000 mL																								

Dénombrement par méthode DEFT de la flore totale du lait

Objectifs	Il s'agit de dénombrer les microorganismes du lait cru par une méthode rapide donnant des résultats très voisins de ceux obtenus avec la méthode classique de dénombrement par culture en milieu solide.
Principe	<p>Un échantillon du lait à dénombrer, éventuellement dilué préalablement, est prétraité pour être filtré à l'aide de l'appareil Nucléopore® sur membrane en polycarbonate. Le filtrat est donc passé à travers une membrane en polycarbonate de porosité uniforme qui laisse passer la lumière et, du fait de sa structure plane, retient toutes les bactéries en surface. Le filtre est ensuite coloré par un colorant fluorescent ou fluorochrome, puis rincé au citrate et à l'isopropanol pour éliminer l'autofluorescence du filtre : une coloration à l'acridine orange permet la lecture et la distinction entre les cellules mortes et les cellules vivantes. Une présomption d'identification peut être effectuée par l'étude morphologique. Manuellement, la lecture sera effectuée sur une dizaine de champs pour obtenir un nombre total de bactéries suffisamment représentatif, de 150 à 200 au total.</p> <p>On déterminera le nombre de « colonies » par champ. Les colonies sont définies comme : « cellule ou groupe de cellules séparé par une distance égale ou supérieure à deux fois le plus petit diamètre des deux cellules les plus proches l'une de l'autre ».</p>
Matériel et réactifs	<ul style="list-style-type: none"> • Matériel <ul style="list-style-type: none"> – Support de filtration en verre gradué avec pince de serrage commercialisé par Schumacher DMF (<i>Fig 13, page 68</i>). – Fiole à vide adaptée (diamètre de x mm) reliée à une trompe à vide. – Membranes Nucléopore® à pores capillaires, de 25 mm de diamètre en polycarbonate, de porosité 0,22 µm. – Microscope à épifluorescence avec lampe à vapeur de mercure à haute pression. • Réactifs <ul style="list-style-type: none"> – Bactotrypsine ou trypsine à 25 g.L⁻¹ à diluer dans l'eau distillée et à conserver, éventuellement congelée, à -25°C. – Surfactant triton X 100 dilué à 0,5 % (v/v) en eau distillée ou à 0,1 % (v/v). – Solution d'acridine orange à 0,1 mg.mL⁻¹ : dissoudre 25 mg d'acridine orange dans 100 mL de solution tampon à pH 6,6. <p style="text-align: center;">ATTENTION !</p> <p style="text-align: center;">Ce produit est cancérigène, éviter tout contact et toute inhalation. Il est à manipuler avec des gants et avec un masque pour la pesée. Il sera éliminé sur charbon actif.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Isopropanol solvant organique, (ne pas approcher d'une zone de chaleur). – Tampon acide citrique 0,1 mol. L⁻¹ (pH 6,6). – Tampon acide citrique 0,1 mol. L⁻¹ (pH 3). <p>Avant utilisation, il est préférable de filtrer les réactifs à travers une membrane en acétate de cellulose de 0,22 µm de porosité pour éliminer les impuretés qui gêneraient la filtration et l'observation.</p>

<p>Mode opératoire</p>	<p>• Prétraitement</p> <p>Un certain nombre de problèmes se pose pour le dénombrement par filtration sur membrane, car le lait contient des cellules somatiques et des globules gras de 3 à 5 µm qui empêchent la filtration. Il faudra utiliser du triton X100 avec chauffage à 50 °C pour rendre les globules plus fluides.</p> <p>L'utilisation d'une enzyme protéolytique facilite encore la filtration du lait. Les cellules somatiques sont alors lysées.</p> <p>L'incubation est effectuée en tube à essais à 50°C pendant 10 minutes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2 mL de lait entier ; - 0,5 mL d'enzyme (bactotrypsine) ; - 2 mL de surfactant (triton X100).
	<p>• Filtration</p> <ul style="list-style-type: none"> - Filtrer sous vide 5 mL de surfactant chauffé à 50 °C. - Filtrer sous vide 1 à 2 mL de lait traité et dilué convenablement. - Rincer, à l'aide de surfactant chauffé, le support du filtre. - Filtrer sous vide 2,5 mL d'acridine orange. - Rincer (étape cruciale pour une bonne lecture) pour éliminer l'autofluorescence due au filtre : <ul style="list-style-type: none"> - filtrer 2,5 mL d'acide citrique ; - filtrer 2,5 mL d'isopropanol. - Effectuer en parallèle un témoin avec de l'eau à la place du lait pour vérifier la non-contamination des réactifs.
	<p>• Examen au microscope à épifluorescence</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sur une lame bien propre, déposer une goutte d'huile à immersion, puis la membrane encore humide. - Rajouter une goutte d'huile à immersion. - Déposer une lamelle. - Recouvrir d'huile non fluorescente (une mauvaise huile peut entraîner une lecture par défaut). - Observer au microscope à épifluorescence, à l'objectif x100 : <ul style="list-style-type: none"> - faire la mise au point sur le filtre en lumière normale : on observe les fibres grisées du filtre ; - passer en lumière fluorescente et observer les cellules fluorescentes qui se détachent sur le filtre qui apparaît «noir». - Dénombrer sur environ 10 champs : un dénombrement satisfaisant est réalisé pour un nombre ne dépassant pas 30 à 40 microorganismes par champ. La lecture doit se faire dans un temps limité car il y a des risques d'extinction de fluorescence si la préparation est éclairée trop longtemps, et donc des risques de détermination par défaut.
<p>Extensions possibles aux aliments solides</p>	<p>Lorsque cette méthode est appliquée sur un aliment, un homogénat de cet aliment est passé sur filtre de nylon de porosité 5 µm, récolté puis traité par 2 mL de triton X100 et 0,5 mL de trypsine pour lyser les cellules somatiques et prévenir le bouchage des pores.</p>

Prétraitement de l'échantillon



Verser 0,5 mL de bacto-trypsine



Ajouter 2 mL de Triton X-100



Prélever 2 mL d'échantillon de lait

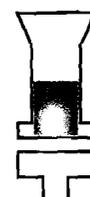


Incuber 10 min à 50 °C

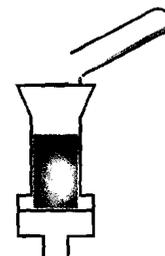
Filtration



Membrane en polycarbonate de 25 mm de diamètre

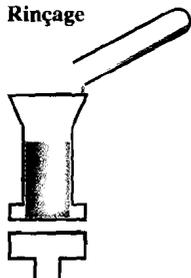


5 mL de triton X100 à 50 °C filtrer



Verser l'échantillon et filtrer

Rinçage



Rinçage avec 5 mL de triton X100

Coloration à l'acridine orange



2,5 mL d'acridine orange rincer au tampon citrate pH3



Rincer avec 2,5 mL d'isopropanol



Enlever la membrane et la sécher à l'air sec



Montage de la membrane et comptage

Placer la membrane entre deux gouttes d'huile à immersion, recouvrir d'une lamelle. Observer au microscope à épifluorescence à l'objectif x100.

Schéma récapitulatif du dénombrement

Contrôle de stérilité d'un jus de fruits par ATPmétrie

Objectif	Le kit jus de fruits lumac (groupe Perstorp Analytical) permet de vérifier la stérilité des produits du type jus de fruits (ou produits similaires, soupe, sauce, crème).
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Échantillon <ul style="list-style-type: none"> – Préincuber le pack de jus de fruits pendant une courte période. – Pipeter 50 µL d'échantillon et l'introduire dans une lumacuvette. – Additionner le perméabilisant spécifique des cellules somatiques (pulpes) des jus de fruits ; dans la plupart des cas, en volume égal à celui de l'échantillon. Dans ces conditions, l'extraction quantitative de l'ATP se fait en 10 à 15 secondes pour des concentrations cellulaires inférieures à 10⁷/mL (pour des concentrations plus importantes, une dilution de l'échantillon est nécessaire). – Ajouter 20 µL de solution d'ATPase (reconstituée dans du tampon à pH 7,75), permettant la dégradation de l'ATP non microbien. – Incuber 45 minutes à température ambiante ou 30 minutes à 37 °C. – Placer la cuvette dans la chambre de mesure du Biocounter. – Ajouter l'agent d'extraction de l'ATP microbien, dans la majorité des cas, en volume égal à celui de l'échantillon. L'extraction quantitative de l'ATP se fait en 10 à 15 secondes pour les concentrations bactériennes inférieures à 10⁸/mL (pour des concentrations plus importantes, une dilution de l'échantillon est nécessaire avant traitement). Dans le cas des levures et moisissures, l'extraction est complète après, respectivement, 30 et 60 secondes. Les spores peuvent nécessiter des procédures spéciales. – Après 30 secondes de contact, introduire le complexe luciférine-luciférase reconstitué dans du tampon à pH 7,75 contenant les ions Mg²⁺ nécessaires à la réaction ainsi qu'un agent chélatant permettant d'éviter les interférences dues aux ions Ca²⁺ et aux ions métalliques inhibiteurs. – Lire les Unités Relatives de Lumière (RLU). • Contrôle <ul style="list-style-type: none"> – Un produit stérile est mesuré dans les mêmes conditions et servira de témoin.
Évaluation du résultat	<p>Comparer la valeur (en RLU) des échantillons et du témoin.</p> <p>Si la RLU est 3 fois supérieure ou plus à la RLU du témoin, le jus de fruits est contaminé.</p> <p>Si la RLU est moins de 2 fois supérieure à la valeur en RLU du témoin, le jus de fruits est stérile.</p> <p>Si la RLU est moins de 3 fois et plus de 2 fois supérieure à la valeur en RLU du témoin, prolonger l'incubation de 6 heures et recontrôler.</p>

CHAPITRE IV

POPULATIONS CONTAMINANTES ALTÉRANT LA QUALITÉ SANITAIRE ET MARCHANDE

1. Flore totale aérobie mésophile

Il s'agit de l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissance comprises entre + 20 °C et + 45 °C.

Cette microflore peut comprendre des microorganismes pathogènes pour l'homme et l'animal mais aussi des microorganismes d'altération variés.

Ainsi, en microbiologie alimentaire, on recherche et dénombre les microorganismes aptes à cultiver en 72 heures à 30 °C et en gélose pour dénombrement. Dans ce cas, la microflore exigeante (exemple : les *Lactobacillus*) n'est pas détectée.

- **Indice de la qualité sanitaire**

Il n'y a pas toujours de relation très étroite entre une valeur élevée de la flore totale aérobie mésophile et la présence de microorganismes pathogènes.

Cependant, on considère que, en général, il n'y a de risque pour la santé du consommateur que si la flore totale mésophile aérobie est supérieure ou égale à 10^5 microorganismes/g.

- **Indice de la qualité marchande**

La flore totale peut aussi être considérée comme flore d'altération car la présence d'une flore mésophile aérobie revivifiable abondante indique un processus de dégradation en cours. Il n'y a cependant pas de relation étroite entre le nombre total des microorganismes et le temps d'apparition de l'altération perceptible des caractéristiques organoleptiques de l'aliment. En effet, la détérioration peut être due à un groupe microbien ne constituant à l'origine qu'une fraction de la population totale.

En principe, une flore totale aérobie mésophile dépassant 10^6 à 10^8 microorganismes par gramme provoque une détérioration visible du produit.

Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile reste la meilleure méthode permettant d'estimer l'indice de salubrité et de qualité des aliments dans le contrôle industriel. Un aliment dont la flore totale est trop élevée montrera de mauvaises conditions de conservation et sera considéré comme impropre à la consommation.

Les manipulations 1 et 8 présentent le dénombrement de la flore totale dans le lait à l'aide de deux méthodologies différentes : dénombrement dans la masse d'un milieu gélosé et dénombrement par la méthode DEFT.

2. Flores indicatrices de contamination fécale

La présence de ces flores témoigne d'une altération de la qualité sanitaire de l'aliment.

2.1. Choix des flores indicatrices de contamination fécale

Les flores indicatrices de contamination fécale sont représentées par les microorganismes vivant normalement dans l'intestin de l'homme et des animaux. Leur présence dans un aliment révèle une contamination fécale et la présence éventuelle d'une bactérie pathogène responsable de toxi-infection.

L'origine de ces bactéries est le plus souvent le tube digestif de l'homme ou de l'animal :

- *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A et B responsables des fièvres typhoïde et paratyphoïdes ;
- des sérovars responsables de gastro-entérites (*Salmonella* Typhimurium) ;
- *Vibrio cholerae* ;
- *E. coli* entéro-pathogènes ;
- *Yersinia enterocolitica* ;
- *Campylobacter jejuni* ;
- *Shigella dysenteriae* ; *Shigella sonnei* ;
- *Clostridium perfringens* ;
- *Bacillus cereus*...

Les bactéries responsables des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) seront étudiées au chapitre 5.

Les flores indicatrices de contamination fécale sont représentées par trois groupes :

- les coliformes et coliformes thermotolérants, en particulier *E. coli*, ainsi que les entérobactéries dans leur ensemble ;
- les streptocoques fécaux ;
- les *Clostridium* sulfitoréducteurs.

• Critères pris en compte dans le choix des flores indicatrices

Pour être prises en compte comme indice de contamination, ces flores doivent répondre à un certain nombre de critères :

- la **sensibilité de détection** qui est d'autant plus grande que le germe recherché représente une fraction plus importante de la population contaminante : ces microorganismes doivent apparaître en plus grande quantité que les pathogènes ;
- la **résistance des microorganismes indices** qui est définie par leur durée de survie dans le milieu extérieur, et qui doit être supérieure à celle des germes pathogènes ;
- la **spécificité à l'égard de la source de la contamination** : selon la nature des germes-tests recherchés, une réelle contamination d'origine fécale pourra être présumée plus ou moins fortement. La meilleure spécificité est assurée par des bactéries d'origine strictement fécale : c'est le cas des coliformes thermotolérants, qui restent le groupe privilégié, et plus particulièrement *E. coli*. Les coliformes thermotolérants font l'objet de dénombrements pour la plupart des produits alimentaires. Il n'y a pas de risque de présence d'un microorganisme pathogène si les microorganismes indices sont absents dans le produit. Les bactéries indicatrices doivent être mises en évidence, dénombrées, voire identifiées par des méthodes simples et fiables.

Les bactéries intestinales répondant le mieux à ces critères correspondent aux trois groupes cités, en particulier parce qu'il s'agit des bactéries les plus fréquentes après les espèces anaérobies strictes (bonne sensibilité). En effet, les espèces anaérobies strictes autres que les *Clostridium* sulfitoréducteurs ne sont pas recherchées car elles sont très difficiles à mettre en évidence par des méthodes simples et ne répondent donc pas au dernier critère.

• Recherche des flores indicatrices

Dans les eaux de consommation brutes (eaux de source), l'ensemble des flores de contamination fécale est dénombré. Dans les eaux de consommation traitées, elles sont également recherchées, mais leur absence montre l'efficacité du traitement.

Pour les produits alimentaires autres que les eaux de consommation, il s'agit de rechercher des microorganismes dont la présence révèle une contamination probable du produit et au minimum une mauvaise hygiène lors de sa fabrication. Il y a alors présomption de microorganismes pathogènes, principalement de *Salmonella*, dont l'habitat normal est l'intestin de porteurs sains ou de malades.

Les coliformes seront dénombrés essentiellement dans deux cas :

- lorsqu'il peut y avoir eu contact avec les viscères de l'animal lors de l'abattage de celui-ci ;
- lorsque le produit a été manipulé pour sa préparation, afin de vérifier que cette manipulation a été réalisée dans des conditions d'hygiène satisfaisantes.

Pour la plupart de ces produits, la recherche et le dénombrement de coliformes témoins de contamination fécale s'accompagnent de la recherche de salmonelles.

Pour l'eau de consommation, les salmonelles ne seront recherchées qu'en cas de suspicion particulière suite à une épidémie de gastro-entérite.

La facilité de dénombrement des coliformes et le coût relativement faible qui en découle sont donc en partie responsables de la place privilégiée qu'occupent les coliformes comme indices de la qualité hygiénique. La plupart des critères microbiologiques officiels prennent en compte les coliformes, les coliformes thermotolérants ou *E. coli*.

2.2. Coliformes et coliformes thermotolérants

2.2.1. Dénombrement des coliformes

Selon la norme ISO 4831 de juillet 1991, le terme coliforme correspond à « des organismes en bâtonnets, non sporogènes, à coloration de Gram négative, oxydase négative, aérobies ou facultativement anaérobies, capables de croître en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface possédant des activités inhibitrices de croissance similaires, et capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures, à des températures de 35 à 37 °C. » Selon les milieux et la méthodologie fixés par les méthodes normalisées, cette définition générale peut être modifiée. Ainsi, dans la norme ISO 4832 de juillet 1991 (V 08-015) s'applique la définition suivante : « bactéries qui, à la température spécifiée, forment des colonies caractéristiques, c'est-à-dire violacées, d'un diamètre de 0,5 mm ou plus, et parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile. »

Jusqu'à l'utilisation de méthodes taxonomiques génétiques et moléculaires, quatre genres d'entérobactéries entraînent dans la définition des coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus amalonaticus*). Actuellement, à partir de la définition donnée par la norme ISO, une cinquantaine d'espèces entreraient dans cette catégorie.

2.2.1.1. Valeur d'indice des coliformes

Pratiquement tous les coliformes peuvent exister en abondance dans les matières fécales des hommes et des animaux à sang chaud, mais certains sont également les hôtes habituels du sol et des eaux (*Citrobacter*, *Enterobacter*). L'intérêt de ce dénombrement est donc limité comme indice de contamination fécale, par manque de spécificité.

Il est cependant intéressant, et fait l'objet d'analyse en microbiologie alimentaire pour différentes raisons :

- la recherche à 37 °C est favorable au développement des microorganismes et permet une bonne revivification, notamment à partir de l'eau. Elle peut souvent être une première étape lors de la mise en évidence de bactéries coliformes d'origine fécale ;
- ces bactéries résistent relativement bien dans le milieu extérieur et peuvent être témoins d'une contamination fécale un peu ancienne. Elles peuvent être aussi témoins d'une contamination par des coliformes d'origine non fécale provenant de l'environnement et montrant, de toutes façons, de mauvaises conditions d'hygiène (nettoyage-désinfection non efficace) ;
- enfin, dans les eaux traitées, ces bactéries peuvent témoigner de la non-efficacité du traitement par des désinfectants car elles y sont sensibles : elles ne doivent donc pas être rencontrées après traitement.

2.2.1.2. Méthodes horizontales de référence de dénombrement des coliformes

Ces méthodes sont établies selon les normes :

- NF ISO 4831 de juillet 1991 (indice de classement : V 08-016) : « Directives générales pour le dénombrement des coliformes – Technique du nombre le plus probable. » ;
- NF ISO 4832 de juillet 1991 (indice de classement : V 08-015) : « Directives générales pour le dénombrement des coliformes – Méthode par comptage des colonies. »

2.2.1.3. Méthodes horizontales de routine

Ces méthodes sont établies selon l'indice de classement V 08 050 de décembre 1992 : « Méthode de routine pour le dénombrement des coliformes – Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C ».

2.2.2. Dénombrement des coliformes fécaux ou thermotolérants et de *E. coli*

Selon la norme ISO, les coliformes thermotolérants sont des « coliformes qui présentent les mêmes propriétés caractéristiques que les coliformes, après incubation à la température de 44 °C ».

2.2.2.1. Valeur d'indice des coliformes thermotolérants

Une température plus élevée permet de sélectionner les souches d'origine fécale par rapport aux bactéries issues de l'environnement. Celles-ci se développent rapidement en bouillon nutritif à 41 °C et généralement jusqu'à 44 °C.

Leur présence dans l'eau témoigne d'une contamination fécale quasi certaine ; dans les autres aliments, cela est moins probant. Leur présence est cependant un bon indice de mauvaise condition hygiénique pendant ou après la transformation de l'aliment. Pour une meilleure spécificité, on complète parfois le dénombrement des coliformes thermotolérants par une recherche d'*E. coli* présumés, voire une identification confirmée d'*E. coli*.

« *E. coli* présumé » correspond à des coliformes thermotolérants qui, à 44 °C, produisent de l'indole à partir du tryptophane.

2.2.2.2. Méthode horizontale de référence pour les *E. coli* présumés

Cette méthode est établie selon la norme NF ISO 7251 de septembre 1994 (indice de classement V 08-020) « Directives générales pour le dénombrement d'*E. coli* présumés – Technique du nombre le plus probable. »

2.2.2.3. Définition des *E. coli*

Jusqu'à-là, la définition utilisée était : « *E. coli* correspond à des « coliformes thermotolérants qui produisent de l'indole à partir du tryptophane », et également :

- « – donnent un essai positif au rouge de méthyle ;
- ne produisent pas d'acétyl-méthyl-carbinol ;
- n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone ;
- ne poussent pas en milieu au cyanure de potassium ;
- peuvent décarboxyler l'acide L glutamique ».

Cette définition s'est modifiée avec l'apparition de nouveaux tests d'identification et, notamment, la recherche d'une β -glucuronidase. On définit aujourd'hui les *E. coli* β -glucuronidase + comme « des bactéries qui, à 44 °C, forment des colonies caractéristiques en gélose peptone au tergitol additionnée soit d'un substrat chromogène, soit d'un substrat fluorogène révélant la présence de la β -glucuronidase, à l'exception de *E. coli* O157:H7 ».

2.2.2.4. Valeur d'indice des *E. coli*

E. coli est l'espèce la plus spécifique de la contamination fécale humaine dans la mesure où elle n'existe quasiment pas à l'état saprophyte, car elle résiste mal dans le milieu extérieur. De plus, chez l'homme, elle est présente en très grande quantité ($10^8/g$), d'où une bonne sensibilité de la recherche.

Des populations anormalement élevées d'*E. coli* peuvent être mises en évidence dans les volailles suite à une mauvaise éviscération.

La résistance d'*E. coli*, parfois plus faible que celle des autres bactéries pathogènes, en particulier des salmonelles, est un inconvénient.

2.2.2.5. Méthodes horizontales de référence pour *E. coli*

Ces méthodes sont établies selon la norme NF V08 017 de juin 1980 (annexe aux normes V 08-015 et V 08-016) « Directives générales pour le dénombrement des coliformes fécaux et d'*E. coli* – Technique du nombre le plus probable ».

2.2.2.6. Méthodes horizontales de routine

Ces méthodes sont établies selon l'indice de classement V 08 053 de décembre 1993 : « Méthode de routine pour le dénombrement des *E. coli* β -glucuronidase positive par comptage des colonies à 44 °C. »

2.2.3. Dénombrement des entérobactéries

Dans certains cas, le dénombrement des *Enterobacteriaceae* se substitue au dénombrement des coliformes thermotolérants. Ceci peut se justifier par les raisons suivantes :

- les coliformes ne constituent pas un groupe taxonomique précis ;
- les entérobactéries pathogènes sont le plus souvent lactose négative, or les coliformes sont lactose positive ;
- le risque de ne pas mettre en évidence les coliformes s'ils sont en petite quantité par rapport aux autres entérobactéries, notamment lorsque l'équilibre naturel entre les différentes flores a été modifié par un traitement (conservation au froid, congélation ou traitement thermique).

Sont alors dénombrées des entérobactéries n'étant pas d'origine fécale ; cette recherche est notamment préconisée par l'AFNOR pour les laits en poudre et les laits concentrés (V 08-054 de mars 1996). Ceci peut aussi s'expliquer par le fait que le lait avant transformation est susceptible de contenir des souches bactériennes de nombreux genres d'*Enterobacteriaceae*, car les causes et origines de la contamination peuvent être variées, et le traitement subi par le lait peut modifier considérablement l'équilibre entre les flores. On peut se contenter d'une recherche d'entérobactéries avec préenrichissement dans le cas où les bactéries risqueraient d'être trop rares. On ne peut alors que rendre un résultat concernant la présence ou l'absence d'entérobactéries dans une certaine quantité de produit testé.

2.2.3.1. Méthodes horizontales de référence pour les entérobactéries

Ces méthodes sont établies selon les normes :

- NF ISO 7402 de juillet 1991 (indice de classement : V08 021) : « Directives générales pour le dénombrement des *Enterobacteriaceae* sans revivification. Technique du NPP et méthode par comptage des colonies » ;
- NF ISO 8523 de juillet 1991 (indice de classement : V08 025) : « Directives générales pour la recherche des *Enterobacteriaceae* avec préenrichissement ».

2.2.3.2. Méthodes horizontales de routine pour les entérobactéries

Ces méthodes sont établies selon la norme NF (indice de classement : V08 054 d'octobre 1993).

2.2.4. Exemple de dénombrement des entérobactéries

Se reporter aux manipulations suivantes :

- 10 : Recherche des *Enterobacteriaceae* avec préenrichissement
- 11 : Dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive dans le camembert par dénombrement des colonies à 44 °C.

2.3. Dénombrement des streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux sont des streptocoques du groupe D présumés : cocci Gram positif en chaînettes, catalase négative et possédant l'antigène de groupe D, c'est-à-dire *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Streptococcus bovis* et *Streptococcus equinus*.

Les *Enterococcus* sont très résistants, se multiplient sur des milieux hostiles ou en conditions hostiles de croissance, ce qui n'est pas le cas de *Streptococcus bovis* ni de *Streptococcus equinus*.

2.3.1. Valeur d'indice

Dans les eaux, ils sont témoins de contamination fécale, car ils ont tous un habitat fécal, mais leur spécificité n'est pas identique pour toutes les espèces. Dans les aliments, leur valeur d'indice de contamination d'origine fécale est plus discutée car ces microorganismes sont très répandus dans la nature. Ceci explique qu'ils soient en réalité peu dénombrés, et imposés comme critères officiels uniquement pour les coquillages en contact permanent avec l'eau de mer :

- *E. faecalis* domine chez l'homme. Assez résistant, il n'est cependant pas très spécifique ;
- *E. faecium* est plus abondant chez le bétail ;
- *S. bovis* est très rare chez l'homme, mais c'est l'espèce prédominante du bétail ; plus fragile que les deux précédents, il serait donc un indicateur très spécifique d'une contamination animale récente ;
- *S. equinus* ne vit que dans les intestins de cheval et autres animaux à sang chaud. Il est très peu résistant hors de cet habitat.

Les coliformes fécaux seraient plus fragiles que *E. faecalis* et *E. faecium*, mais plus résistants que *S. bovis*. Si le rapport coliformes fécaux/streptocoques fécaux est supérieur à 1, la pollution doit être d'origine essentiellement humaine (égouts urbains). En effet l'homme, à la différence des animaux, excrète beaucoup moins de streptocoques fécaux que de coliformes. Selon les directives des communautés européennes, les eaux d'alimentation ne doivent présenter aucun streptocoque fécal ni aucun coliforme thermotolérant dans 100 mL d'eau.

Ils sont aussi dénombrés dans les coquillages bivalves et les oursins vivants.

Ce groupe se caractérise par une très forte résistance à l'azide de sodium, qui est fortement inhibiteur pour les entérobactéries. La sélectivité peut être suffisante pour rendre pratiquement inutile l'identification.

2.3.1.1. Méthode officielle pour les streptocoques fécaux

Il s'agit d'un dénombrement en milieu liquide :

- test présomptif : milieu de Rothe ;
- test confirmatif : milieu de Litsky.

2.3.1.2. Méthode normalisée pour les streptocoques fécaux

Cette méthode est établie selon la norme NF T90-416 d'octobre 1993 : « Dénombrement par filtration sur membrane dans les eaux de consommation ».

2.4. Dénombrement des *Clostridium* sulfitoréducteurs

2.4.1. Définition

Les *Clostridium* sulfitoréducteurs sont des bacilles Gram positif anaérobies stricts capables de sporuler, réduisant les sulfites en sulfure. Hôtes normaux de l'intestin, ils peuvent également être d'origine tellurique.

Leurs spores sont recherchées dans l'eau comme indice de contamination fécale ancienne.

En bactériologie alimentaire, on recherche essentiellement les espèces d'origine fécale, en particulier *Clostridium perfringens* qui peut être responsable de toxi-infections alimentaires.

2.4.2. Valeur d'indice

Dans les eaux, les formes sporulées, plus résistantes que les formes végétatives des coliformes fécaux et des streptocoques du groupe D, permettent de déceler une contamination fécale ancienne. Elles sont mises en évidence par culture à 37 °C en 24 heures. Mais ce sont aussi des germes telluriques, et l'origine fécale n'est pas certaine lorsqu'ils sont seuls à être retrouvés.

En réalité, pour les produits autres que l'eau de consommation, sont recherchés et dénombrés les anaérobies sulfitoréducteurs cultivés à 46 °C ou *Clostridium perfringens* présumés, car certains sérovars sont toxigènes, et donc fortement impliqués dans l'étiologie des toxi-infections. Il existe cinq types de *C. perfringens* (A, B, C, D, E) selon les toxines présentes. Pour trois d'entre eux, la température optimale de croissance est de 45 °C, d'où le choix de rechercher les anaérobies sulfitoréducteurs à 46 °C.

Il est possible de dénombrer soit les spores, après avoir éliminé par chauffage à 80 °C pendant 10 minutes les formes végétatives, soit directement les formes végétatives. La mise en évidence de *Clostridium* sulfitoréducteurs ne permet pas d'affirmer que ce sont des *Clostridium perfringens*, et il faut confirmer les résultats obtenus. C'est pourquoi, les anaérobies sulfitoréducteurs à 46 °C sont souvent dénombrés directement en utilisant un milieu sélectif.

2.4.3. Dénombrement

2.4.3.1. Méthode officielle de dénombrement des *Clostridium* sulfitoréducteurs

Elle utilise :

- la filtration sur membrane : VF complète (additionnée de sulfite et de sels de fer) avec jarre anaérobie ;
- les géloses profondes : VF complète (additionnée de sulfite et de sels de fer).

2.4.3.2. Méthode officielle de dénombrement des anaérobies sulfitoréducteurs (à 46 °C)

Différents milieux sont proposés pour ce dénombrement, le milieu recommandé aujourd'hui est le milieu TSC (Tryptone, Sulfite, Cyclosérine, citrate de fer ammoniacal, métabisulfite de sodium) qui permet de mettre en évidence la réduction des sulfites en sulfures.

3. Flores d'altération de la qualité marchande

La valeur marchande des aliments peut être affectée par la prolifération et l'action de microorganismes contaminants entraînant :

- la modification de l'aspect et de la texture du produit par digestion de macromolécules, par libération de gaz, par production de substances colorantes ;
- l'altération des caractéristiques organoleptiques par libération de substances, volatiles ou non, qui modifient le goût et l'odeur ;
- la détérioration du conditionnement par production de gaz (gonflement de l'emballage) ;
- la diminution de la valeur calorique et nutritionnelle par dégradation des molécules à haute valeur énergétique.

Ces flores sont responsables de la détérioration des aliments au cours de leur conservation, et certaines d'accidents en cours de fabrication.

La recherche de ce type de microorganismes s'effectue donc préventivement sur les matières premières ou sur le produit fini, ainsi qu'après un accident de fabrication.

Une charge microbienne faible de l'aliment peut être tolérée. Cependant, plus le nombre de germes est élevé, plus le risque d'altération sera grand et la conservation limitée.

L'analyse quantitative de ces flores d'altération doit être complétée par une analyse qualitative, permettant de distinguer les espèces particulièrement dangereuses pour la bonne conservation du produit de celles qui sont neutres, voire utiles.

La connaissance de la nature de ces flores peut également renseigner sur l'origine de certaines contaminations et elle est indispensable pour les combattre efficacement.

Seules quelques-unes des espèces présentes seront responsables de l'altération du produit. Elles sont d'abord sélectionnées en fonction des conditions physico-chimiques mises en jeu (nature du produit, pH, Aw, pression partielle en oxygène, température de stockage, etc.) et peuvent éventuellement être remplacées par d'autres espèces qui trouvent dans le milieu transformé des conditions encore plus favorables.

L'évolution de la microflore contaminante, souvent plurimicrobienne, dépend de facteurs liés :

- aux caractères physiques et chimiques de l'aliment ;
- aux conditions de fabrication et de conservation du produit ;
- aux traitements auxquels l'aliment est éventuellement soumis ;
- aux caractères physiologiques des microorganismes présents ; il se crée une sélection aboutissant à la multiplication de certaines espèces responsables de l'altération du produit.

Éventuellement, d'autres espèces peuvent alors profiter des modifications apparues dans l'aliment, se multiplier, et engendrer d'autres dégradations.

On peut envisager une classification des flores d'altération en tenant compte des facteurs qui influencent leur développement dans l'aliment :

- flore d'altération se développant en fonction de la composition de l'aliment : ainsi, la flore lipolytique altère les produits riches en lipides tels le beurre, le lait (Voir 3.1.1), la flore caséolytique, les produits riches en caséine tels les produits laitiers (Voir 3.1.2), etc.
- flore d'altération se développant en fonction des conditions de fabrication et de conservation du produit : il s'agit essentiellement de la flore psychrotrophe (Voir 3.2) qui se développe aux températures de réfrigération. Le froid assure par ailleurs une inhibition de la croissance de la plupart des microorganismes ;
- flore d'altération sélectionnée par sa résistance à un traitement thermique : exposés à une température suffisamment élevée pendant un temps suffisamment long, les microorganismes sont détruits. Mais la résistance à la chaleur varie considérablement d'une espèce à l'autre.

La présence ou la non-présence de spores est plus importante. Leur résistance est bien supérieure à celle des formes végétatives, et les espèces thermorésistantes sont généralement sporulées.

L'évaluation de l'effet des traitements thermiques permet d'adapter ces traitements à la nature de la flore à détruire et aux caractéristiques du produit à fabriquer (Voir 3.3). Un traitement thermique modéré va éliminer la plupart des microorganismes non sporulés, ne laissant survivre que les plus résistants. Seules les spores d'espèces très thermorésistantes vont résister à un chauffage intense. Certaines flores peuvent se développer à la suite d'une sélection résultant tout à la fois de leur résistance à un traitement thermique et de leur adaptation à la nature de l'aliment ;

- la flore fongique, du fait de ses faibles exigences nutritionnelles, de sa capacité à se développer dans des conditions de pH et d'Aw défavorables à la croissance bactérienne, va prédominer dans certains aliments tels que les aliments acides, les aliments déshydratés... (Voir 3.4).

3.1. Recherche de flores d'altération sélectionnées par la nature du produit

3.1.1. Flore lipolytique

Ce sont des microorganismes possédant des enzymes qui hydrolysent la matière grasse.

Ils sont responsables d'altérations du goût et de l'odeur des laits conservés au froid, et surtout du rancissement du beurre, lié à l'apparition de composés d'odeurs désagréables (acides, aldéhydes, cétones).

Les microorganismes produisant des lipases appartiennent à des groupes variés. On les trouve parmi :

- les bactéries, dont de nombreux genres sont psychrotrophes (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Bacillus*) ;
- les levures (*Candida*, *Torula*, certaines espèces de *Saccharomyces*) ;
- les moisissures (*Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*).

Leur dénombrement dans les matières premières ou les produits finis présente un grand intérêt car la conservation des matières grasses animales ou végétales (crème, beurre, margarine, huiles...) dépend de leur concentration.

• Exemple de dénombrement de la flore lipolytique

Se reporter à la manipulation 12 : Dénombrement des microorganismes lipolytiques par culture en surface d'un milieu gélosé dans le beurre, le lait ou le fromage.

3.1.2. Flore caséolytique

Elle est constituée de microorganismes capables de sécréter des protéases exocellulaires pouvant hydrolyser la caséine du lait et des produits laitiers.

Cette microflore est indésirable dans la plupart des produits, mais elle joue aussi un rôle utile dans la maturation des fromages. La digestion plus ou moins poussée de la caséine donne au lait un goût amer et âcre, au beurre un goût de fromage et est responsable des altérations des fromages (ramollissement, gonflement). Il peut y avoir combinaison des produits issus de la caséolyse et de la lipolyse conduisant à la formation de substances d'odeur repoussante.

Les microorganismes caséolytiques appartiennent à des groupes variés : des bactéries psychrotrophes (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*) mais aussi *Proteus* et ou *Lactococcus*, des moisissures (*Penicillium*, *Geotrichum*).

- Exemple de dénombrement de la flore caséolytique

Se reporter à la manipulation 13 : Dénombrement de la flore caséolytique du beurre ou des fromages.

3.1.3. Flore lactique

Les bactéries lactiques sont capables de produire par fermentation de l'acide lactique D (-), L (+) ou DL.

Il s'agit des genres suivants : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenus*. Le genre *Bifidobacterium* réalise une fermentation mixte lactique-acétique.

Ces bactéries, n'ayant pas de pouvoir pathogène, n'ont pas de signification défavorable pour la qualité sanitaire de l'aliment. En revanche, elles peuvent être des agents d'altération à l'origine de difficultés pour certaines industries.

Lactobacillus viridescens est responsable du verdissement des viandes, jambons, saucissons crus conservés sous vide. Ce verdissement provient de l'oxydation des pigments hémiques de la viande par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produit du métabolisme du *Lactobacillus*.

Le surissement des jus de fruits est souvent dû à *Lactobacillus brevis* ou *Lactobacillus plantarum*.

Une production de viscosité peut apparaître suite à un développement de *Leuconostoc (dextranicum et mesenteroides)* dans des laits gélifiés, des sirops ou de *Lactobacillus* dans le lait, le cidre, la bière et le vin. En brasserie, la tolérance au houblon de *Pediococcus damnosus* fait de cette bactérie un agent responsable d'accidents de fabrication.

- Exemple de dénombrement de la flore lactique

Se reporter à la manipulation 14 : Dénombrement des bactéries lactiques d'un vin.

3.1.4. Flore acétique

Les bactéries acétiques sont des bacilles Gram négatif, aérobies stricts, chimio-organotrophes, capables d'utiliser de nombreux substrats carbonés : glucose, éthanol, glycérol, et lactate pour certaines. Les genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* sont essentiellement rencontrés.

Ces bactéries sont présentes sur le raisin et tout au long de la vinification ; elles peuvent se multiplier dans le vin à la suite d'une pénétration même limitée d'oxygène. Il en résulte une production d'acide acétique qui peut conduire à la piqûre acétique du vin et à une production d'acétate d'éthyle également nuisible.

- Exemple de dénombrement de la flore acétique

Se reporter à la manipulation 15 : Dénombrement et identification des bactéries acétiques du vin.

3.2. Microflore liée au mode de fabrication et de conservation

3.2.1. Flore mésophile protéolytique

Cette flore, constituée de bactéries inhibées pour des températures inférieures à 20 °C, est responsable de putréfaction. Pour des carcasses de viande non réfrigérées ou mal réfrigérées, une putréfaction profonde, due à la présence de *Clostridium*, apparaît. Dans le cas de l'abattage d'animaux fatigués ou stressés, n'ayant donc pas assez de réserve de glycogène, le pH des viandes n'a pas été suffisamment abaissé. Il reste supérieur à 6.2 et favorise le développement des bactéries responsables de putréfaction.

Clostridium perfringens dégrade les glucides avec production de gaz, ce qui rend la viande molle et spongieuse. Puis la libération de substances malodorantes (hydrogène sulfuré, mercaptans, indole, ammoniac, etc.) se produit, accompagnée du développement d'espèces très protéolytiques telles que *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium histolyticum*.

La couleur de la viande est anormale, grise ou verdâtre.

3.2.2. Flore psychrotrophe

Elle est constituée de microorganismes capables de se multiplier aux températures de réfrigération, mais dont la température optimale de croissance est de l'ordre de + 25 à + 35 °C, par exemple : *Pseudomonas*. Leur temps de génération, qui est de l'ordre de 24 heures à la température de 0 °C, leur permet de se développer abondamment en 1 à 3 semaines dans un aliment.

REMARQUE

Les microorganismes psychrophiles ont une température optimale de croissance aux environs de + 15 à + 20 °C et se rencontrent peu dans les aliments.

Les microorganismes psychrotrophes les plus couramment rencontrés sont :

- parmi les bactéries à Gram négatif saprophytes : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas putrefaciens*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Serratia liquefaciens*, *Acinetobacter*.
Ces bactéries, dont l'habitat normal est l'eau, sont souvent apportées au cours des opérations de lavage des matières premières (exemple : carcasses de viande) et du matériel ;
- parmi les bactéries à Gram positif : *Bacillus* (ces bactéries sporulées limitent la durée de conservation au froid des produits pasteurisés), *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus viridescens* ;
- des levures et des moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*...).

Le métabolisme des microorganismes psychrotrophes reste actif aux basses températures, la libération d'hydrolases, en particulier lipases, protéases..., est très abondante. En conséquence, ces microorganismes sont à l'origine de problèmes de fabrication (fromages) et de modification des propriétés organoleptiques (rancissement et odeurs désagréables).

Cette flore entraîne des altérations pour de nombreuses denrées réfrigérées (carcasses de viande, poissons, lait, légumes...). Pour ces produits, son dénombrement est plus intéressant que celui de la flore aérobique mésophile totale.

Les psychrotrophes Gram négatif sont détruits par la pasteurisation, mais les enzymes qu'ils produisent (lipases et protéinases) ne sont pas forcément altérées. Quelques bactéries responsables de toxi-infections alimentaires font partie de la flore psychrotrophe : *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* de type E, *Yersinia enterocolitica*...

• Exemples de dénombrement de microorganismes psychrotrophes

Se reporter aux manipulations suivantes :

- 16 : Dénombrement des microorganismes psychrotrophes du lait liquide ;
- 17 : Dénombrement des *Pseudomonas* sur et dans les viandes et produits à base de viande ;
- 18 : Dénombrement de *Brochothrix thermosphacta* sur et dans les viandes et produits à base de viande.

3.3. Recherche de flores susceptibles de résister à un traitement thermique

Certains traitements thermiques peuvent être effectués lors des diverses étapes de fabrication et d'utilisation des produits alimentaires. Les matières premières peuvent être pasteurisées, stérilisées, stérilisées UHT (Ultra Haute Température) ; le matériel lui-même est souvent stérilisé. Lors de la fabrication du produit fini, des étapes de chauffage ou de cuisson interviennent. De même, le produit fini peut subir différents traitements : pasteurisation, stérilisation, stérilisation UHT, cuisson, réchauffage. Ces différents traitements thermiques influent sur la survie des microorganismes dans les produits.

3.3.1. Définition des principaux traitements thermiques

Un traitement thermique est un traitement à une température supérieure à la température ambiante. Deux types de traitements sont utilisés pour la conservation des aliments : la pasteurisation et la stérilisation.

3.3.1.1. La pasteurisation

La pasteurisation est l'opération qui vise à la destruction totale ou partielle des microorganismes présents dans un aliment. Elle peut être réalisée selon plusieurs « couples » température – durée d'exposition à cette température.

EXEMPLE

- Pasteurisation du lait :
- à 63 °C pendant 30 min ;
 - à 72 °C pendant 15 s ;
 - à 90 °C pendant 0,5 s.

Ce traitement entraîne la destruction de la plupart des microorganismes pathogènes non sporulés.

Outre le lait et certains produits laitiers, les cornichons et d'autres « semi-conserves » sont pasteurisés.

3.3.1.2. La stérilisation

La stérilisation est l'opération qui vise à la destruction des formes végétatives et des spores de microorganismes telle qu'une technique de quantification permet de l'évaluer.

Elle se réalise à des températures supérieures à celles de la pasteurisation, assurant également l'inactivation des enzymes responsables d'altérations ainsi que celle des toxines.

EXEMPLE

Stérilisation du lait à 120 °C pendant 15 min.

La notion de stérilité d'un produit n'exclut pas la possibilité d'avoir des microorganismes en quantité infime dans le produit, mais ceux-ci ne peuvent s'y développer en raison des conditions de pH, de température, de conservation, etc.

EXEMPLE

Stérilisation du lait, des conserves, des jus de fruits.

3.3.1.3. La stérilisation à Ultra Haute Température (UHT)

La température de traitement est de 140 à 150 °C, appliquée pendant quelques secondes. Elle est suffisante pour obtenir la qualité stérile commerciale et permettre une conservation longue à température ambiante.

Ce traitement est appliqué au lait et à certains produits laitiers comme les crèmes.

3.3.2. Mesure de la destruction thermique des microorganismes

À l'état végétatif, les microorganismes présents dans les aliments se reproduisent entre - 5 °C et + 70 °C.

3.3.2.1. Courbe de survie d'une population bactérienne à une température donnée

À une température haute et constante, la survie d'une population microbienne est évaluée en fonction du temps d'exposition à cette température.

Les microorganismes qui restent revivifiables sont quantifiés après un traitement d'une durée déterminée. Il existe, en fonction du temps d'exposition, une décroissance exponentielle de la population (Fig. 2).

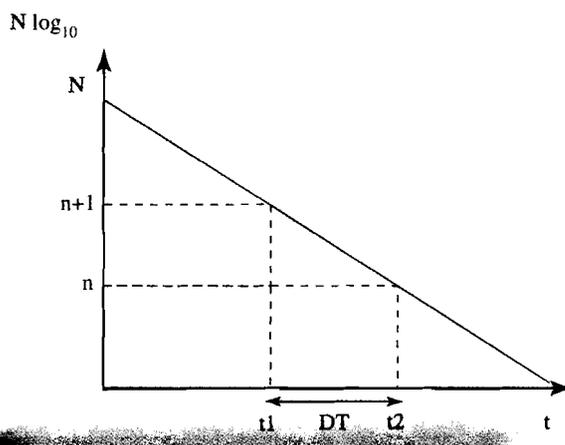


Fig. 2 – Courbe de survie d'une population bactérienne à une température supérieure à sa température maximale de croissance

À partir de cette courbe, il est possible de calculer :

– la vitesse d'inactivation : $v = \frac{dN}{dt} = -kN$.

Cette vitesse dépend de la charge microbienne initiale présente dans l'aliment. Le temps de traitement à une température donnée sera d'autant plus long que l'aliment est plus contaminé ;

– la vitesse d'inactivation relative : $v_r = \frac{dN/dt}{N} = -k$.

Cette vitesse est constante, elle ne dépend pas de la charge microbienne initiale.

À partir de la courbe de survie, plusieurs paramètres caractérisant le traitement thermique peuvent être définis.

3.3.2.2. Temps de réduction décimale : D_T

Il est défini comme le temps de chauffage nécessaire pour inactiver 90 % des microorganismes revivifiables présents au début du traitement à une température T. Il s'exprime en minutes et est calculé pour une température donnée. Il est constant pour une température donnée, qui est en général notée en indice (D_T) ; il diminue lorsque la température augmente.

Soit N_0 la concentration en microorganismes à $t = 0$ et N la concentration en microorganismes à $t = D_T$
 D_T = temps au bout duquel $N/N_0 = 1 / 10 \rightarrow \log N - \log N_0 = -1$

D_T est déterminé graphiquement par le temps de traitement à la température étudiée permettant une réduction de la population d'une valeur égale à 1 en utilisant une échelle log décimal : $\log_{10}(N) = f(t)$ (Fig. 2).

3.3.2.2. Facteur d'inactivation thermique Z

Il représente l'élévation de température qui multiplie par 10 la vitesse relative d'inactivation des microorganismes ; il peut également être défini comme étant l'élévation de température qui diminue d'un facteur 10 le temps de traitement (D_T), ou qui diminue d'une valeur égale à 1 en utilisant une échelle log décimal le D_T à la température étudiée.

Le D_T décroît avec la température selon une fonction exponentielle.

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_{T_2} - \log D_{T_1}}$$

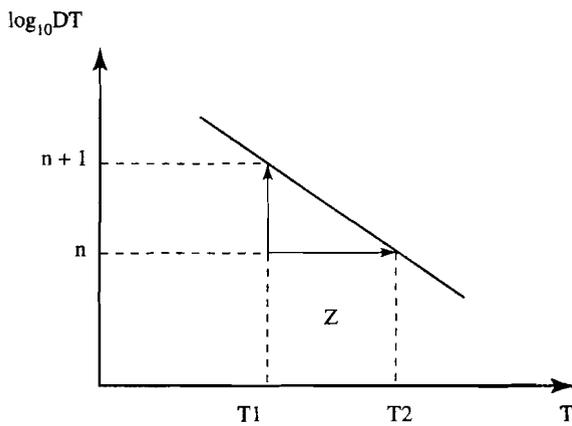


Fig. 3 – Courbe $\log_{10} D_T = f(T)$

Z est déterminé graphiquement comme étant l'inverse de la pente de la courbe : $\log D_T = f(T)$ (Fig. 3).

Les spores de *Bacillus stearothermophilus*, ayant un Z voisin de 10 °C, sont souvent utilisées comme microorganismes tests pour déterminer un barème de stérilisation. En effet, Z étant élevé, ces spores seront parmi les plus résistantes à un traitement thermique.

Il peut également être calculé à partir de la courbe : $\log v_T = f(1/T)$.

3.3.2.3. Temps de destruction thermique TDT

Il est défini comme étant le temps nécessaire, à une température précise, pour tuer un nombre donné de microorganismes.

Les conditions de sa détermination sont strictes : chauffage dans un bain d'huile, refroidissement rapide dans l'eau froide et mise en culture sur milieu convenable pour vérifier l'impossibilité de la population traitée à former, sur le milieu solide, des colonies visibles après incubation.

3.3.2.4. Valeur stérilisatrice F_T^Z

C'est le temps équivalent à celui d'un traitement qui aurait été complètement effectué à la température de référence, soit 121,1 °C (250 °F) et qui serait parvenu à la même réduction de la population revivifiable ; il y a toujours une montée et une descente en température, et ce traitement à température constante n'est jamais obtenu.

On appelle F_0 la valeur de F_T^Z pour la température de référence (121,1 °C).

F_0 exprime le temps (en minutes) nécessaire à la réduction d'une population N_0 à une population N telle que :

$$F_0 = D_{121,1\text{ °C}} \log N_0/N$$

Soit n = coefficient de réduction de population : $n = \log N_0/N$, alors $F_0 = n D_{121,1\text{ °C}}$.

Un traitement à une température T , d'une durée égale à $1.D_T$ minutes, réduit de 10^1 fois la contamination ; un traitement de durée égale à $n.D_T$ minutes réduit de 10^n fois la contamination.

3.3.2.5. Intérêt de ces grandeurs

D_T renseigne sur la résistance relative des microorganismes à un traitement thermique à une température donnée.

EXEMPLES

Valeurs de D_T :

- pour *E. coli*, $1,5 \cdot 10^7$ dans le lait : DT à 60 °C = 6 – 7 min ;
- pour *E. coli*, $5 \cdot 10^7$ en tampon à pH 7 : DT à 60 °C = 0 – 3 min ;
- pour *S. aureus* : DT à 73 °C variant de 0,20 à 2,20 min selon les milieux de traitement.

Z est intéressant pour comparer l'efficacité de différents traitements. Il reflète le degré de résistance du microorganisme aux traitements thermiques.

EXEMPLES

Dans des conditions déterminées et sur une population bactérienne donnée dont le facteur d'inactivation thermique $Z = 4$ °C (une élévation de 4 °C permet de multiplier par 10 la vitesse d'inactivation ou de diviser par 10 la durée du traitement thermique), un traitement à 68 °C pendant 3,5 min est satisfaisant, de même que le seront un traitement à 64 °C pendant 35 min ou un traitement à 72 °C pendant 0,35 min.

TDT et F^Z_T sont utilisés pour établir les barèmes de stérilisation.

3.3.3. Facteurs influençant la destruction thermique des microorganismes

Selon l'aliment considéré, ou expérimentalement selon les conditions du traitement, les valeurs de D_T (en particulier) varient. Les principaux facteurs de variation sont liés à la fois à la nature du milieu traité et aux caractéristiques de la population contaminante.

3.3.3.1. Facteurs liés au milieu ou à l'aliment contaminé

• Degré d'humidité

La résistance des microorganismes à la chaleur augmente lorsque le degré d'humidité du milieu diminue.

Cet effet est lié à la dénaturation thermique des protéines, facilitée en présence d'eau du fait de la création de groupes –SH (provenant des liaisons S–S) ; la présence de liaisons protéine – eau entraîne une facilitation des ruptures de liaisons peptidiques (thermodynamiquement plus favorables).

• Composition

La présence de protéines en grande concentration assure un effet protecteur contre la destruction thermique.

La présence de lipides, en particulier d'acides gras à longue chaîne, entraîne une augmentation de la résistance à la destruction thermique (effet probablement lié à la diminution de l'humidité). L'effet des glucides est variable : généralement, une forte concentration en glucides augmente la résistance des microorganismes.

Les inhibiteurs de croissance bactérienne (antibiotiques thermorésistants, substances telles que SO_2) additionnent leurs effets à celui de la température, et permettent de réduire la température de traitement.

• pH

La résistance à la chaleur des microorganismes augmente lorsque le traitement est réalisé à leur pH optimal de culture.

EXEMPLE

Variation de D_T à 60 °C pour une population d'*Enterococcus faecalis* :

- à pH 7, $D_{60^\circ C}$ varie de 10 à 13 min ;
- à pH 6, $D_{60^\circ C}$ varie de 2,5 à 4 min.

La stérilisation de milieux très acides nécessite une température moins élevée que celle de ces mêmes milieux à un pH voisin de la neutralité.

3.3.3.2. Facteurs liés à la population contaminante

• Importance de la population

La résistance d'une population contaminante est augmentée lorsque cette population est plus élevée.

EXEMPLE

Variation de TDT à 100 °C de spores de *Clostridium botulinum* :

- TDT = 40 min pour 328 spores ;
- TDT = 125 min pour $1\,640 \cdot 10^6$ spores.

- **Âge de la population**

La résistance d'une population est augmentée lorsque cette population est en phase stationnaire.

EXEMPLE

Variation de D_T à 55 °C de *Salmonella* cultivée à 37 °C :

- en phase exponentielle : $D_{55^\circ\text{C}} = 4$ min ;
- en phase stationnaire : $D_{55^\circ\text{C}} = 14,6$ min.

Cette augmentation de résistance est liée à la synthèse et à l'expression de protéines de stress.

- **Température de croissance de la population**

De la même façon et pour les mêmes raisons, la résistance est augmentée lorsque la température de développement est plus élevée.

EXEMPLE

Variation de D_T à 55 °C de *Salmonella* en phase exponentielle :

- cultivée à 37 °C : $D_{55^\circ\text{C}} = 4$ min ;
- cultivée à 44 °C : $D_{55^\circ\text{C}} = 12$ min.

Ces modifications constatées sont dues à la synthèse de protéines de choc thermique après un passage relativement court à une température supérieure à la température optimale de croissance, les protéines de choc thermique entraînant une meilleure résistance à la chaleur.

3.3.4. Résistance aux traitements thermiques

Cette résistance est fonction des températures optimales de croissance des microorganismes : les thermophiles sont plus résistants que les mésophiles, eux-même plus résistants que les psychrotrophes.

Elle dépend aussi de la capacité des microorganismes à sporuler, les bactéries sporulantes ayant une résistance accrue par rapport aux non sporulantes.

Les bactéries à coloration de Gram positive sont plus thermorésistantes que les bactéries à coloration de Gram négative.

Les levures et les moisissures sont assez sensibles à la chaleur, avec une résistance augmentée des ascospores des levures et des spores asexuées des moisissures.

Les résistances les plus élevées sont obtenues pour des spores bactériennes et pour des bactéries thermophiles.

3.3.4.1. Spores et thermorésistance

La résistance des endospores à la chaleur est pour l'essentiel liée à la déshydratation du protoplaste ; celui-ci, par suite de sa richesse en dipicolinate de calcium, a les caractéristiques d'un gel.

Des spores obtenues sur un milieu déficient en calcium ou provenant d'une souche ont une capacité à synthétiser du dipicolinate et ont une thermosensibilité augmentée.

L'exposition d'un échantillon d'eau à 80 °C (± 2 °C) pendant 10 minutes permet la destruction des formes végétatives de la plupart des bactéries, mais laisse aux spores des bactéries anaérobies sulfitoréductrices la possibilité de se développer sur un milieu de culture et dans des conditions convenables.

3.3.4.2. Bactéries thermophiles

Sont dites thermophiles les bactéries se développant à des températures variant de 45 à 70 °C avec un optimum pour 50 – 60 °C.

De nombreux genres, dont *Bacillus* et *Clostridium*, particulièrement importants dans les aliments, appartiennent à ce groupe.

Leurs caractéristiques de croissance en milieu non renouvelé sont :

- une durée de phase exponentielle de croissance relativement courte ;
- une vitesse spécifique de croissance élevée.

Cette capacité à se développer à haute température s'explique par des particularités tant structurales que métaboliques.

- **Particularités structurales des bactéries thermophiles**

Les protéines, et parmi elles les enzymes des thermophiles, sont plus résistantes que celles des mésophiles.

EXEMPLE

α amylase de *Bacillus stearothermophilus* conserve son activité après chauffage à 70 °C pendant 24 h.

Cette augmentation de thermorésistance peut s'expliquer par un pourcentage plus élevé dans la protéine « thermophile » d'acides aminés hydrophobes.

De même, les lipides cellulaires montrent chez les thermophiles une diminution du pourcentage des acides gras insaturés ; les acides gras saturés créent des liaisons hydrophobes plus stables que les acides gras insaturés. Ces modifications ont des répercussions sur les membranes cellulaires, ce qui est probablement à l'origine de la survie des cellules à de hautes températures.

- **Particularités métaboliques des bactéries thermophiles**

Les thermophiles ont des vitesses spécifiques de croissance fortes et leur demande en oxygène est élevée ; or, à de hautes températures, la solubilité de l'oxygène dans le milieu diminue. Ceci expliquerait d'une part la phase de déclin relativement rapide d'une culture de microorganismes thermophiles, et, d'autre part, le fait que la croissance de microorganismes thermophiles est optimale pour des concentrations en oxygène dissous voisines de celles obtenues pour des cultures de mésophiles.

Se reporter à la manipulation suivante :

– 19 : Détermination du temps de réduction décimale (D_{10}) à 60 °C d'une souche de *E. coli* ;

3.3.5. Les différentes flores recherchées

3.3.5.1. Les bactéries thermorésistantes

Ce sont des bactéries capables de résister à des températures relativement élevées et de survivre à un chauffage de 63,5 °C pendant 30 minutes. Ces conditions correspondent à celles de la basse pasteurisation (LTLT = *Low Temperature Long Time*) dans l'industrie laitière.

Cette flore provient de l'environnement et, en particulier, du matériel (par exemple matériel de traite et de transport du lait) insuffisamment nettoyé et désinfecté.

Les genres et les espèces les plus fréquemment rencontrés sont :

- des bactéries à Gram positif asporogènes tels que *Micrococcus luteus*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Microbacterium lacticum*, *Corynebacterium* ;
- des bacilles à Gram positif sporulés, *Bacillus* et *Clostridium*, qui résistent à des températures encore plus élevées.

Parmi les bactéries sporulantes, il existe des souches de *Bacillus* psychrotrophes qui limitent la durée de conservation au froid de produits pasteurisés, en l'absence d'autres contaminants.

Il semble donc nécessaire de renforcer le contrôle des matières premières pour ces aliments et d'évaluer les risques dus à la présence de spores de *Bacillus*, à l'aide de la démarche HACCP.

3.3.5.2. La flore sporulée anaérobie (spores et formes végétatives)

Ce sont des *Clostridium* dont la présence est indésirable dans le lait et les produits laitiers, les carcasses de viande ainsi que les conserves car ils sont responsables d'accidents de fabrication et de conservation.

Ils appartiennent à deux groupes en fonction des altérations qu'ils provoquent :

- les *Clostridium* protéolytiques ou putrides mésophiles et thermophiles ;
- les *Clostridium* butyriques ou saccharolytiques mésophiles et thermophiles.

- **Les *Clostridium* protéolytiques responsables de putréfaction**

– Dans le cas des carcasses de viande

Il s'agit de la putréfaction profonde apparaissant à température élevée (25 °C – 40 °C), c'est-à-dire pour des carcasses non réfrigérées ou mal réfrigérées (voir 3.2.1 page 108, *Flore mésophile protéolytique*).

– Dans le cas des conserves

La putréfaction est due :

- soit à des *Clostridium* thermophiles (*Clostridium nigrificans*) rencontrés dans des produits faiblement acides (conserves de légumes) ayant subi un sous-traitement thermique. Cette bactérie produit de l'H₂S pouvant entraîner le bombage de la boîte et une odeur d'œuf pourri à l'ouverture ;
- soit à des *Clostridium* mésophiles (*Clostridium sporogenes*, *Clostridium putrefaciens*) qui décomposent les protéines en substances malodorantes (indol, scatols). Une forte production de gaz (H₂, CO₂, H₂S) se manifeste par un bombage très important des boîtes.

REMARQUE

Clostridium botulinum fait partie des mésophiles, mais en général aucune altération n'est visible, et cependant la conserve est hautement toxique.

• Les *Clostridium* butyriques

Les *Clostridium* butyriques (saccharolytiques) peuvent être responsables d'altérations dans les conserveries et dans l'industrie laitière.

– Dans le cas des conserves

Le produit est fermenté, aigre, a une odeur butyrique, et la très forte production de gaz entraîne un bombage pouvant aller jusqu'à l'explosion de la boîte.

Ce type d'altération est dû :

- soit à des *Clostridium* thermophiles (*Clostridium thermosaccharolyticum*) dans les conserves peu ou moyennement acides (pH > 4,5) ;
- soit à des *Clostridium* mésophiles (*Clostridium butyricum* ou *Clostridium pasteurianum* et parfois *Clostridium perfringens*) dans les conserves acides (pH < 4,5).

– Dans le cas de l'industrie laitière

On rencontre couramment deux espèces : *Clostridium butyricum* et *Clostridium tyrobutyricum*. Les spores de ces bactéries présentes dans le sol se retrouvent fréquemment dans les ensilages, puis dans le lait. Il s'agit soit d'une contamination directe du lait, soit d'une contamination indirecte à partir des fèces des animaux nourris par ensilage.

Ces *Clostridium* sont responsables du gonflement tardif et de l'éclatement des fromages, surtout à pâte cuite (Comté, Emmenthal, Beaufort...) en réalisant, à partir du lactate, la fermentation butyrique avec production de gaz (CO₂ et H₂) accompagnée d'une dénaturation du goût (goût de rance). Ces accidents de fabrication se manifestent à partir d'un nombre limité de spores (200/L de lait), sont fréquents au dessus de 500 spores/L et sont généralisés à 3 000 spores/L. Les laits d'ensilage sont interdits pour la fabrication de ces fromages.

Se reporter aux manipulations suivantes :

- 20 : Dénombrement de la flore thermorésistante d'un lait cru destiné à la pasteurisation ;
- 21 : Dénombrement en milieu liquide des spores thermorésistantes de *Bacillus* et *Clostridium* thermophiles dans les matières premières entrant dans la composition des conserves ;
- 22 : Recherche de *Bacillus* thermophiles, formes végétatives et spores dans les conserves.
- 23 : Recherche de *Clostridium* thermophiles, formes végétatives et spores, dans les conserves ;
- 24 : Dénombrement des spores « butyriques » dans les laits destinés à la fabrication des fromages à pâte cuite et dans les fromages.

3.4. La flore fongique : les levures et moisissures

Les levures sont des champignons chez lesquels la forme unicellulaire est prédominante.

La reproduction végétative se fait le plus souvent par bourgeonnement (ou par fission).

On distingue :

- les Ascomycètes, qui se reproduisent par un processus sexué dans une asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose. Dans la famille des *Saccharomycetaceae*, il existe de nombreuses levures impliquées dans les fermentations ou les altérations des produits alimentaires ;
- les Basidiomycètes réalisant une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside. Dans cette classe, peu de levures sont capables de fermenter et elles sont peu présentes dans les processus d'altérations ;
- les levures imparfaites, avec la famille des *Cryptococcaceae*, dont de nombreuses levures peuvent également être rencontrées dans les produits alimentaires.

Les aliments à base de végétaux (fruits, jus de fruits, légumes, confitures...) ainsi que les produits sucrés (confiseries, biscuits, miel...) sont particulièrement sensibles à des dégradations par les levures.

Elles peuvent entraîner l'apparition de troubles (développement de levures), d'odeurs ou de goûts anormaux (production d'éthanol, variation de pH), ou le gonflement des produits ou (et) de leurs emballages (libération de CO₂).

D'un point de vue technologique, elles peuvent être responsables d'accidents de fabrication rendant celle-ci incommercialisable (contamination des moûts de fermentation).

Les moisissures sont des organismes filamenteux eucaryotes. L'hyphe en est l'élément structural.

Les moisissures peuvent être des agents actifs de biodétériorations, d'altérations organoleptiques et de modifications chimiques.

Elles sont d'autant plus redoutables qu'elles peuvent, suivant le cas, tolérer des pH très acides, se développer à des températures s'échelonnant de 0 à + 40 °C et supporter de très faibles teneurs en eau.

Se reporter à la manipulation 25 : Dénombrement des levures et moisissures dans les épices et aromates.

Recherche dans les semi-conserves des *Enterobacteriaceae* avec préenrichissement

Méthode normalisée ISO 8523 : 1991

Objectifs	<p>Cette méthode est une méthode horizontale applicable à tout produit dans lequel la présence d'au moins une bactérie de la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> est recherchée. Il ne s'agit plus dans ce cas de dénombrer les bactéries, et cette méthode s'utilise pour des produits éventuellement très faiblement contaminés.</p> <p>La recherche d'entérobactéries consiste à déterminer la présence ou l'absence de ces bactéries dans une quantité déterminée de produit.</p> <p>Les <i>Enterobacteriaceae</i> sont alors définies comme des « microorganismes fermentant le glucose et donnant une réaction oxydase négative sur le milieu VRBG ».</p>
Principe	<p>Cette recherche avec préenrichissement s'effectue en quatre étapes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Préenrichissement en milieu non sélectif liquide Ensemencement d'une prise d'essai connue et mesurée précisément dans un milieu riche, l'eau peptonée tamponnée, et incubation à 37 °C pendant 16 à 20 heures. • Enrichissement en milieu sélectif liquide Ensemencement d'une partie du bouillon d'enrichissement en milieu sélectif liquide à la bile de bœuf et vert brillant qui sont les inhibiteurs. Cette étape permet de sélectionner partiellement les entérobactéries parmi toutes les bactéries qui ont pu se développer lors du préenrichissement. À partir de là, les résultats ne sont plus quantitatifs. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 heures. • Isolement et identification Cette étape est réalisée sur milieu VRBG, milieu sélectif solide à la bile au cristal violet, qui sont les inhibiteurs ; la dégradation du glucose se traduisant par un virage au rouge de l'indicateur de pH, le rouge neutre. Après une incubation de 24 heures à 37 °C, les colonies caractéristiques d'entérobactéries sont repérées. • Confirmation Les colonies d'entérobactéries présumées sont repiquées sur milieu non sélectif pour recherche de l'oxydase.
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement de l'échantillon pour essai Le critère pour les semi-conserves est l'absence d'entérobactéries dans 0,1 g. Une masse de 1 g est pesée et complétée avec exactement 9 mL d'eau peptonée tamponnée. Une prise d'essai de 1 mL de cette suspension correspond à 0,1 g de produit. • Préparation de la suspension mère <ul style="list-style-type: none"> – Introduire 1 g de semi-conserve à tester dans un tube de 9 mL d'eau peptonée tamponnée. – Homogénéiser. – Prélever 1 mL (soit 0,1 g de produit) et le transférer en tube de 9 mL d'eau peptonée tamponnée.

	<ul style="list-style-type: none"> • Ensemencements et incubations <ul style="list-style-type: none"> – Incuber la suspension mère à 37 °C pendant 16 à 20 heures (maximum) en eau peptonée tamponnée. – Transférer 1 mL dans un tube contenant 10 mL du milieu d'enrichissement (bouillon glucosé tamponné à la bile de bœuf et au vert brillant). – Incuber pendant 18 à 24 heures à 37 °C. – Ensemencer en stries sur gélose VRBG, avec une anse du milieu d'enrichissement incubé. – Incuber pendant 24 heures à 37 °C. 	
Lecture et interprétation	<ul style="list-style-type: none"> – Prélever, au hasard, 5 colonies caractéristiques de couleur rouge foncé avec un halo de précipitation rouge foncé. – Repiquer en subculture sur gélose ordinaire. – Incuber pendant 24 heures à 37 °C. 	
Essais de confirmation	Confirmer l'appartenance aux entérobactéries par un test à l'oxydase et une étude de fermentation en gélose glucosée au BCP incubée pendant 24 heures à 37 °C.	
Expression du résultat	Si l'une des colonies au moins est oxydase négative et glucose positif, la prise d'essai renferme des entérobactéries et la recherche est positive : présence d'entérobactéries dans 0,1 g de produit. Dans le cas contraire, on conclut à une absence d'entérobactéries dans 0,1 g de semi-consERVE.	
Composition des milieux		
<p>Eau peptonée tamponnée</p> <p>Peptone 10,0 g Chlorure de sodium 5,0 g Monohydrogénophosphate de sodium 9,0 g (Na₂HPO₄, 12 H₂O) Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) 1,5 g Eau 1 000 mL</p> <p>Dissoudre les composants dans l'eau en chauffant. Ajuster le pH à 7 après stérilisation 30 minutes à 115 °C. Répartir en tubes à essais à raison de 9 mL par tube.</p>	<p>Milieu d'enrichissement sélectif : Bouillon glucosé tamponné à la bile et au vert brillant</p> <p>Peptone 10,0 g Glucose 5,0 g Monohydrogénophosphate de sodium 6,45 g (Na₂HPO₄, 12 H₂O) Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) 2,0 g</p> <p>Bile de bœuf desséchée .. 20,0 g Vert brillant 0,015 g Eau 1 000 mL</p> <p>Dissoudre les composants en chauffant, ajuster à pH 7,2. Ne pas stériliser le milieu. Répartir en tubes de 10 mL.</p>	<p>Milieu d'isolement sélectif : Gélose glucosée bilée au cristal violet et au rouge neutre (VRBG)</p> <p>Peptone 10,0 g Extrait de levure 3,0 g Sels biliaires 1,5 g Glucose 10,0 g Chlorure de sodium 5,0 g Rouge neutre 0,03 g Cristal violet 0,002 g Agar-agar 12 à 18 g Eau 100 mL</p> <p>Dissoudre dans l'eau en chauffant jusqu'à ébullition après avoir ajusté le pH qui doit être de 7,4 après ébullition. Ne pas autoclaver. Préparer extemporanément. Répartir en flacons de 50 mL au maximum. Couler 15 mL de milieu au plus tôt 24 heures avant utilisation.</p>

Dénombrement des *Escherichia coli* β -D-glucuronidase positive dans le camembert par dénombrement des colonies à 44 °C

Méthode normalisée AFNOR V08-053

Objectifs

• Choix de la méthode

Cette méthode est une simplification de la méthode de référence NF V08-017 (juin 1980) : « Directives générales pour le dénombrement des coliformes fécaux et d'*E. coli*. » Elle permet de dénombrer directement les *E. coli* β -D-glucuronidase positive sans dénombrement préalable des coliformes thermotolérants et permet d'obtenir des résultats quasi certains après 24 heures d'incubation à 44 °C.

En comparaison avec les méthodes utilisées précédemment, il existe une bonne spécificité de mise en évidence de la β -D-glucuronidase chez *E. coli* par rapport aux autres entérobactéries : 94 à 97 % des souches de *E. coli* sont positives (à noter cependant que le sérotype de *E. coli* entérohémorragique O157 : H7 est β -D-glucuronidase négative). Parmi les entérobactéries, en dehors d'*E. coli*, seules certaines souches de *Salmonella*, de *Shigella*, de *Citrobacter* et d'*Enterobacter* sont β -D-glucuronidase positive.

• Répondre aux critères microbiologiques du camembert au lait cru

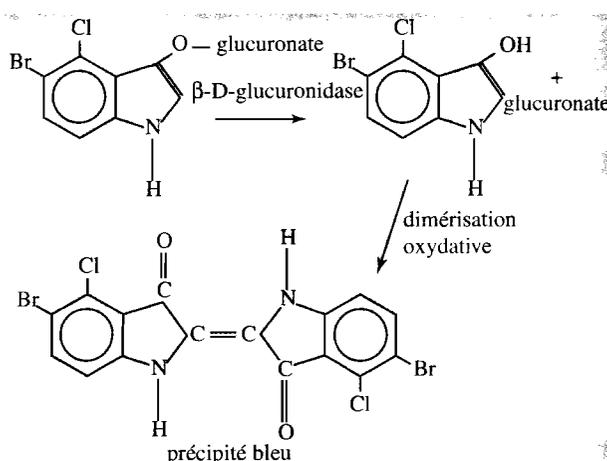
Après traitement par des radiations ionisantes d'un lot de camemberts à base de lait cru, 1 g de produit doit satisfaire au critère fixé par l'arrêté, soit $m = 10^2$, et le résultat doit être interprété selon le plan à trois classes.

Pour pouvoir vérifier que 1 g contient moins de 10^2 *E. coli* par gramme, il faut tester la suspension mère (à 10^{-1} : on préparera 100 g dans 900 mL) ; pour répondre à la valeur du seuil d'acceptabilité $M = 10$ m, soit 10^3 , il suffit de tester la dilution 10^{-2} qui donnera plus de 10 colonies si le seuil d'acceptabilité M est dépassé.

Principe

Pour les besoins de cette méthode, la définition des *E. coli* β -D-glucuronidase positive est la suivante : « Bactéries qui, à 44 °C, forment des colonies caractéristiques en gélose peptone tergitol, additionnée soit d'un substrat chromogène, soit d'un substrat fluorogène, révélant la présence de la β -D-glucuronidase. Le tergitol inhibe la croissance de la plupart des bactéries Gram positif ».

La β -D-glucuronidase hydrolyse spécifiquement les substrats contenant un résidu acide β -D-glucuronique. Cette hydrolyse libère alors la partie colorée du substrat.



Réaction colorée catalysée par la β -D-glucuronidase

Cette hydrolyse libère alors la partie colorée du substrat.

	<p>Dans le cas du milieu PTX, ce substrat est de l'acide 5-bromo-4-chloro-3 indoxyl β-D glucuronique (BCIG) qui libère un chromophore bleu.</p> <p>Pour le milieu PTG, le substrat fluorogène est du 4-méthylumbelliferyl-β-glucuronide. On observe alors un halo de fluorescence bleu dont la lecture peut être facilitée par ajout de gélose blanche qui limite sa diffusion.</p> <p>Dans les deux cas, ce composé est ajouté dans le milieu avant ensemencement.</p> <p>Dans le cas où les bactéries risquent d'être stressées, il faut les incuber préalablement 4 heures à 37 °C. En aucun cas il ne faut dépasser 24 heures car d'autres entérobactéries (<i>Salmonella</i>), voire des coques Gram positif, peuvent donner des colonies bleues caractéristiques.</p>
<p>Mode opératoire</p>	<p>• Prélèvement de l'échantillon pour essai</p> <p>Il se pratique sur le camembert dépourvu d'emballage.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enfoncez une sonde stérile de 15 à 20 mm de diamètre dans le camembert jusqu'à 25 mm de profondeur environ. - Faire pivoter la sonde d'un tour complet et retirer un noyau. - Enfoncez une sonde stérilisée plus petite, de longueur suffisante, dans la surface intérieure exposée du fromage. - Faire pivoter la sonde d'un tour complet et retirer un noyau. - Transférer avec un scalpel stérile dans le récipient pour échantillon. - Recommencer jusqu'à obtenir 100 g. - Introduire 100 g de camembert prélevé (croûte et pâte molle) dans 900 mL de diluant (tryptone sel ou phosphate dipotassique à 2 % (pH final entre 7,4 et 7,6). - Homogénéiser au broyeur en conditions stériles. - Une suspension mère à 10 % est ainsi réalisée. Effectuer ensuite une dilution au 1/10. <p>• Ensemencement et incubation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Transférer dans une boîte de Petri stérile 1 mL de la suspension mère ou d'une dilution décimale en commençant par la suspension la plus diluée. - Couler environ 15 mL de milieu choisi refroidi à 47 °C (en moins de 15 minutes). - Homogénéiser soigneusement. - Laisser solidifier sur une surface bien horizontale. - Couler sur le milieu PTG une couche de 4 mL de gélose blanche. - Incuber à 44 °C pendant 18 à 24 heures.
<p>Lecture et interprétation</p>	<p>Sur PTX, compter les colonies bleues d'<i>E. coli</i> β-glucuronidase positive pour chaque boîte ne contenant pas plus de 150 colonies au total.</p> <p>Sur PTG, placer les boîtes sur une table d'observation UV (365 – 366 nm) et compter les colonies fluoresçant en bleu d'<i>E. coli</i> β-glucuronidase positive pour chaque boîte ne contenant pas plus de 150 colonies au total.</p> <p>Retenir les boîtes contenant au maximum 150 colonies de deux dilutions successives, soit deux boîtes dont une au moins renferme 15 colonies caractéristiques :</p> $N = \Sigma c / 1,1.d$ <p>Σc : somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues. d : taux de dilution de la première dilution comptée.</p> <p>Cette formule correspond à un dénombrement en milieu solide lorsqu'il n'y a qu'un essai par dilution.</p> <p>Si la boîte la moins diluée contient moins de 15 colonies caractéristiques, donner alors le résultat en nombre estimé (NE) de <i>E. coli</i> β-glucuronidase positive par millilitre ou par gramme s'il s'agit de la suspension mère.</p>

Expression du résultat	<p>– Pour chaque échantillon, donner le résultat sous la forme : « Nombre d'<i>E. coli</i> β-glucuronidase positive par gramme ».</p> <p>Dans 95 % des cas, les limites de confiance varient de -14,7 % à + 17,3 % pour 150 colonies et de -37,8 % à + 63,4 % pour 15 colonies dénombrées.</p> <p>– Pour le lot testé, conclure :</p> <p>« la qualité du lot de camemberts étudié sera satisfaisante si :</p> <p>– toutes les unités de l'échantillon donnent des valeurs inférieures ou égales à 300 <i>E. coli</i> par gramme de produit (la tolérance analytique étant fixée à 3m, soit 300 <i>E. coli</i> par gramme de produit),</p> <p>– aucun résultat ne dépasse 1 000 <i>E. coli</i> par gramme de produit pur et au plus deux unités de l'échantillon sur les cinq examinés se situent entre 300 et 1 000 <i>E. coli</i> par gramme de produit pur ».</p>	
Composition des milieux	Milieu PTX	<p>• Milieu de base</p> <p>Peptone pesique de viande 5 g Extrait de levure 3 g Phosphate dipotassique (K_2HPO_4) 0,3 g Tergitol 7 0,1 mL Agar-agar 12 à 18 g Eau 1 000 mL Dissoudre en portant à ébullition.</p> <p>• Solution de BCIG : acide 5-bromo-4-chloro-3 indoxyl β-D glucuronique Acide 5-bromo-4-chloro-3 indoxyl β-D glucuronique 192 mmol Diméthylformamide 5 mL</p> <p>ATTENTION ! Le diméthylformamide est un produit nocif par inhalation et par contact avec la peau, irritant pour les yeux : à manipuler sous une sorbonne avec des gants, des lunettes et, si possible, un masque. Dissoudre le BCIG dans le diméthylformamide. Le substrat ainsi solubilisé peut se conserver 6 mois à + 4 °C dans un flacon ambré.</p> <p>• Milieu complet À 100 mL de milieu de base préparé extemporanément et refroidi à 47 °C, ajouter 2,5 mL de solution de BCIG (concentration finale à 50 mg/mL).</p>
	Milieu PTG	<p>• Milieu complet</p> <p>Peptone pepsique de viande 5 g Extrait de levure 3 g Phosphate dipotassique (K_2HPO_4) 0,3 g Tergitol 7 0,1 mL Agar-agar 12 à 18 g 4-méthylumbelliféryl-β-glucuronide 50 mg Eau 1 000 mL Dissoudre les composants déshydratés dans l'eau, en portant à ébullition. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit à 7,2 à 25 °C. Stériliser à l'autoclave réglé à 121 °C pendant 15 minutes. Ce milieu s'utilise préférentiellement avec une double couche de gélose blanche pour faciliter la lecture.</p>
	Gélose blanche	<p>Agar-agar 12 à 18 g Eau 1 000 mL Dissoudre les composants déshydratés dans l'eau, en portant à ébullition. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit égal à 7 à 25 °C. Stériliser à l'autoclave réglé à 121 °C pendant 15 minutes.</p>

Dénombrement des microorganismes lipolytiques par culture en surface d'un milieu gélosé, dans le beurre, le lait ou le fromage

Norme FIL-IDF 41 (1966)

(Cette norme, essentiellement applicable au lait et au beurre, peut être également utilisée pour d'autres produits laitiers)

Principe	<p>La détection des lipases est réalisée en utilisant une gélose nutritive à pH 7,5 exempte de glucides, et contenant une émulsion de matière grasse colorée par une faible quantité de bleu Victoria basique liposoluble.</p> <p>L'hydrolyse de la matière grasse butyrique libère des acides gras libres, qui forment avec le colorant des sels bleu foncé : les colonies apparaissent donc colorées en bleu.</p>
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement des échantillons Se reporter au prélèvement d'échantillon de lait ou de produits laitiers (<i>Chap. II 5.3.1</i>) • Préparation de l'échantillon : <ul style="list-style-type: none"> – Beurre : ajouter à 2,5 g de beurre 2,1 mL d'une solution de Ringer au 1/4 (0,1 mL de la phase aqueuse du mélange correspond à 100 mg de beurre). – Fromage : écraser dans un mortier stérile 5 g de fromage avec 50 mL d'une solution stérile à 2 % de citrate de sodium à 45 °C jusqu'à dispersion complète des particules de fromage (0,1 mL de ce mélange correspond à 10 mg de fromage). • Réalisation des dilutions Diluant : solution de Ringer au 1/4. <ul style="list-style-type: none"> – Lait : préparer les dilutions jusqu'à 10⁻³. – Crème, beurre, fromage : préparer les dilutions jusqu'à 10⁻⁴. • Ensemencement et incubation : <ul style="list-style-type: none"> – Ensemencer en surface un inoculum de 0,1 mL de l'échantillon et de ses dilutions. – Incuber 3 jours à 30 °C pour la flore lipolytique mésophile et 3 jours supplémentaires si l'on prévoit un développement de moisissures et/ou de levures. – Incuber 7 à 10 jours à 5 °C pour la flore lipolytique psychrotrophe.
Lecture et interprétation	<p>Les microorganismes lipolytiques libèrent des acides gras qui se combinent au bleu Victoria, pour donner des sels bleu foncé et donc des colonies franchement bleues.</p>
Expression des résultats	<ul style="list-style-type: none"> – Retenir les boîtes de Petri présentant de 6 à 60 colonies bleues bien espacées. – Lorsque, dans deux boîtes ensemencées par deux dilutions successives, on trouve un nombre de colonies compris entre 6 et 60, on prend comme nombre de microorganismes lipolytiques celui qui provient de la boîte présentant la numération la plus élevée. – Exprimer le résultat final en nombre de microorganismes lipolytiques par gramme ou par millilitre d'échantillon.

Composition des milieux	Gélose nutritive	Peptone 0,5 % Extrait de viande 0,5 % Gélose 2 % Eau distillée qsp 1 000 mL Mesurer le pH du milieu à 40 °C et l'ajuster à pH 7,5.
	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation du bleu Victoria basique sous forme de poudre stabilisée Dans 200 mL d'eau du robinet, répartir 2 à 3 g de bleu Victoria et verser de l'hydroxyde de sodium à 10 % jusqu'à disparition de la coloration (environ 1 mL par g de colorant) ; décanter le précipité insoluble et filtrer, puis laver le colorant basique avec de l'eau légèrement alcalinisée par NH₄OH ; sécher à 30 °C pour obtenir une poudre. 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation du mélange matière grasse-colorant Dans un mortier chaud, additionner 75 mg de poudre de colorant à 100 g de matière grasse chaude (pour un contrôle dans le beurre, il s'agit de la matière grasse butyrique) ; le mélange est stérilisé par autoclavage et peut être conservé à l'obscurité et à une température inférieure à 5 °C pendant 2 mois. 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation du milieu final Additionner 5 % du mélange matière grasse-colorant à la base gélosée fondue et ramenée à 45 °C, puis émulsionner vigoureusement avant de couler rapidement en boîte de Petri. 	

Dénombrement de la flore caséolytique du beurre ou des fromages

Principe	Le dénombrement est réalisé sur un milieu non sélectif, à cause de la diversité des espèces recherchées, mais qui doit contenir de la caséine (gélose au caséinate de chaux ou gélose au lait écrémé stérile), après une incubation de 3 jours à 30 °C. L'hydrolyse de la caséine se traduit par une clarification totale et franche autour des colonies alors que le reste du milieu est opaque.	
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement et préparation des échantillons Se reporter à la numération des microorganismes lipolytiques (<i>Voir manipulation 12</i>). 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Réalisation des dilutions <ul style="list-style-type: none"> – Beurre : préparer les dilutions jusqu'à 10^{-3}. – Fromages : préparer les dilutions jusqu'à 10^{-4}. 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Ensemencement et incubation <ul style="list-style-type: none"> – Prendre 2 boîtes de Petri stériles et transférer dans chacune 1 mL d'inoculum de l'échantillon. – Couler le milieu de culture et mélanger soigneusement l'inoculum au milieu. – Dans les mêmes conditions, ensemer en profondeur 1 mL des dilutions préparées. – Incuber les boîtes à 30 °C pendant 3 jours. 	
Lecture et interprétation	Les colonies de microorganismes caséolytiques sont entourées d'un halo clair. Si les halos ne sont pas très nets, inonder la boîte avec une solution acide de chlorure mercurique. La caséine précipite, le milieu devient donc opaque et les halos sont plus apparents.	
Expression des résultats	Exprimer le nombre de microorganismes caséolytiques par gramme de produit en multipliant la numération faite par le facteur de dilution correspondant.	
Composition des milieux	Gélose au caséinate de chaux	Additionner 1 volume de caséinate de chaux (commercialisé prêt à l'emploi) réchauffé à 45 °C à un volume égal de gélose double (24 à 30 g d'agar selon le pouvoir gélifiant).
	Gélose au lait écrémé stérile	Additionner 15 mL de gélose à 2,5 % d'agar additionné de 5 mL de lait écrémé stérile chaud.

Dénombrement des bactéries lactiques d'un vin

Objectifs	<p>Il n'existe pas actuellement de réglementation définissant la qualité microbiologique d'un vin.</p> <p>Le critère concernant le nombre de microorganismes totaux par millilitre de vin ou par bouteille, sans aucune distinction (levures, moisissures, bactéries lactiques ou acétiques) varie :</p> <ul style="list-style-type: none"> - selon le conditionnement du vin : <ul style="list-style-type: none"> - < 100 germes/mL de vin pour un vin vendu en citerne, - < 10 germes/750 mL de vin pour un vin en bouteille ; - selon le circuit de commercialisation : <ul style="list-style-type: none"> - < 10 germes/mL de vin pour une distribution dans la zone de production (consommation quelques semaines après la mise en bouteille), - < 10 germes/750 mL de vin pour un vin destiné à l'exportation par exemple.
Principe	<p>Après concentration sur membranes filtrantes, les populations (principalement levures et bactéries lactiques) sont dénombrées spécifiquement par sélection grâce aux milieux nutritifs et aux conditions de culture.</p> <p>Pour les bactéries lactiques, le milieu utilisé est la gélose FT 80 et la lecture est réalisée après une incubation de 5 à 7 jours à 28 °C en jarre anaérobie ou dans une étuve à CO₂.</p>
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation des milieux solides <ul style="list-style-type: none"> - Déposer stérilement dans chaque boîte de Petri 0,2 mL de la solution de natamycine à 0,25 %. - Ajouter 10 mL par boîte de gélose FT 80. - Homogénéiser par translation rotatoire sur une surface plane et laisser solidifier. • Filtration <ul style="list-style-type: none"> - Placer la membrane filtrante dans l'appareil de filtration en respectant les conditions d'asepsie. - Enlever les garnitures se trouvant autour du goulot de la bouteille, éliminer toute trace de colle ou de poussière. Imbiber le bouchon, le goulot de la bouteille ainsi que le tire-bouchon avec de l'alcool à 70 °C et enflammer. Retirer le bouchon, puis verser le vin dans l'entonnoir de filtration. - Adapter le volume de vin à filtrer de façon à obtenir environ 100 colonies sur le filtre. Pour des volumes < à 5 mL, verser 20 mL d'eau distillée stérile dans l'entonnoir avant de filtrer. - Après la filtration, rincer l'entonnoir avec de l'eau distillée stérile et filtrer à nouveau. - Retirer la membrane filtrante à l'aide de pinces flambées et la déposer (quadrillage vers le haut) sur le milieu de culture, en évitant d'emprisonner des bulles d'air entre le milieu et le filtre. • Incubation <ul style="list-style-type: none"> - Incuber 5 à 7 jours à 28 °C en jarre anaérobie ou dans une étuve à CO₂.

**Expression
des résultats**

Exprimer le résultat en nombre de bactéries lactiques/mL de vin.

**Composition
du milieu****Milieu FT 80**

Acides aminés de caséine	5 g
Extrait de levure	4 g
KH_2PO_4	0,6 g
KCl	0,45 g
CaCl_2	0,13 g
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,003 g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,13 g
D-glucose	5 g
D-fructose	3,5 g
Acide DL malique	10 g
Tween 80	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 000 mL

Dénombrement et identification des bactéries acétiques du vin

Objectifs	<p>On souhaite ici dénombrer et identifier les bactéries acétiques d'un vin pour mettre en évidence une flore d'altération entraînant une modification des qualités organoleptiques de ce vin.</p> <p>Il n'existe pas de critère fixant la qualité microbiologique d'un vin, celle-ci est déterminée selon le conditionnement du vin (cuve, fût ou bouteille), et sa destinée (consommation dans un délai court ou conservation durant plusieurs années).</p>
Principe	<p>C'est une méthode de dénombrement dans la masse d'un milieu gélosé sélectif suivi d'une identification des colonies obtenues. Elle s'applique à un vin de qualité moyenne, dont les dénombrements de microorganismes naturellement présents (levures sur milieu de Wickerham et bactéries lactiques sur milieu FT 80) ont révélé des valeurs > 400/millilitre.</p>
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Dénombrement <ul style="list-style-type: none"> – Ajouter stérilement dans le flacon contenant 12 mL de milieu gélosé 0,1 mL de la solution de pénicilline et 0,2 mL de la solution de natamycine. – Déposer au fond des boîtes de Petri 1 mL de vin (2 essais sont testés). – Couler le milieu, agiter par mouvements de rotation légère. – Laisser solidifier, retourner les boîtes. – Incuber en aérobiose à 25 °C pendant 8 à 10 jours. – Compter les colonies apparues présumées colonies de bactéries acétiques. • Identification <ul style="list-style-type: none"> – Repiquage de chaque colonie isolée sur milieu liquide à 25 °C pendant 2 jours. – Identification par ensemencement des milieux d'identification proposés.
Lecture et interprétation	<p>Identifier les colonies dénombrées à l'aide des caractères recherchés.</p>
Expression des résultats	<p>Exprimer le résultat selon les règles de dénombrement après identification.</p>

Composition des milieux de culture	Milieu de culture gélosé	Extrait de levure 5 g Acides aminés de caséine 5 g Glucose 10 g Jus de tomate 10 mL Agar 20 g Eau distillée qsp 1000 mL pH 4,5		
	Milieu de culture liquide	Extrait de levure 5 g Acides aminés de caséine 5 g Glucose 10 g Jus de tomate 50 mL Carbonate de calcium 5 g Eau distillée qsp 1000 mL pH 5,5		
	Solution de pénicilline	Solution de pénicilline à 0,25 % d'une solution à 250 000 UI : 0,3 mL.		
	Solution de natamycine	Solution de natamycine (ou autre substance capable d'inhiber spécifiquement levures et moisissures) à 0,25 % : 0,7 mL.		
Composition des milieux d'identification des bactéries acétiques	Caractère	Milieu : composition/L	Incubation	Lecture
	Oxydation de l'éthanol	Extrait de levure 30 g Vert de bromocrésol ... 0,02 g Agar 20 g Éthanol 3 % final au moment de couler le milieu en BP	2 jours à 28 - 30 °C	Éthanol → ac.acétique : Virage bleu vert → jaune : <i>Glucanobacter</i> (oxydation partielle). Éthanol → ac.acétique → CO ₂ + H ₂ O Virage bleu vert → jaune → bleu vert : <i>Acetobacter</i> (oxydation totale).
	Oxydation du lactate en CO ₂ + H ₂ O	Extrait de levure 5 g Lactate de calcium 20 g Agar 20 g	3 à 4 jours à 25 °C	Production de CO ₂ . Précipitation de CaCO ₃ autour des colonies : <i>Acetobacter</i>
	Oxydation du glycérol	Extrait de levure 5 g Glycérol 20 g Agar 20 g	1 jour à 25 °C	Glycérol → dihydroxyacétone. Liquor de Fehling sur colonies, précipité rouge de Cu ₂ O : <i>Glucanobacter</i> et <i>Acetobacter</i> , sauf <i>Acetobacter pasteurianus</i> .
	Formation de pigments bruns hydrosolubles	Extrait de levure 10 g Glucose 50 g CaCO ₃ 30 g Agar 25 g pH 4,5	2 à 4 jours à 28 °C	Coloration rose ou brune des colonies.
	Croissance sur NH ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g K ₂ HPO ₄ 0,1 g KH ₂ PO ₄ 0,9 g MgSO ₄ 0,25 g FeCl ₃ 0,005 g Éthanol 3 % final au moment de l'inoculation	2 à 14 jours à 28 - 30 °C	Suivre le développement des bactéries par mesure de l'absorbance à 600 nm.

**Identification
des bactéries
acétiques**

	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>		
	<i>G. oxydans</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. liquefaciens</i>	<i>A. pasteurianus</i>
Oxydation totale éthanol	-	+	+	+
Oxydation du lactate en CO ₂ + H ₂ O	-	+	+	+
Oxydation du glycérol	+	+	+	-
Formation de pigments	+	-	+	-
Croissance sur NH ₄	-	+	+	-
+ = positif pour plus de 90 % des bactéries testées. - = négatif pour 90 % des bactéries testées.				

Dénombrement des microorganismes psychrotrophes du lait liquide

Norme FIL 101 (1981)

<p>Principe</p>	<p>L'estimation du nombre de ces microorganismes dans le lait brut ou traité par la chaleur se fait par le dénombrement des colonies après une incubation à 6,5 °C pendant 10 jours.</p> <p>Le milieu de culture, gélose glucosée au lait écrémé stérile, est non sélectif à cause de la diversité des espèces recherchées.</p>
<p>Mode opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation de l'échantillon <ul style="list-style-type: none"> – Avant d'ouvrir le récipient, nettoyer à l'alcool la surface extérieure où se fera le prélèvement. – Afin de s'assurer d'une répartition uniforme des microorganismes, mélanger soigneusement l'échantillon en retournant rapidement et de nombreuses fois le récipient qui le contient. <p>Dans la pratique, secouer 25 fois en 7 secondes, avec une amplitude de 30 cm.</p> <p>Le prélèvement de la prise d'essai doit être effectué dans les 3 minutes après le mélange.</p> • Réalisation des dilutions <p>Préparer les dilutions 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³ de façon à obtenir des boîtes contenant entre 10 et 300 colonies.</p> • Ensemencement et incubation <ul style="list-style-type: none"> – Le temps entre la préparation des dilutions et la répartition de la gélose dans les boîtes de Petri ne doit pas dépasser 15 minutes. – Tester V = 1 mL des dilutions, en double essai, dans la masse de la gélose. – Incuber à l'étuve 10 jours à 6,5 °C +/- 0,5 °C. <p>REMARQUE</p> <p>Des travaux ont montré qu'une incubation de 17 heures à 17 °C, puis de 72 heures à 7 °C permet d'obtenir des résultats identiques et plus rapides.</p>
<p>Lecture et interprétation</p>	<p>Pour faciliter le dénombrement, l'utilisation d'une loupe ou d'un compteur enregistreur permet d'éviter de confondre des particules ou des matières précipitées avec de très petites colonies.</p> <p>Les colonies envahissantes sont comptées comme des colonies uniques, mais il ne faut pas considérer une boîte dont plus d'un quart est recouvert par de telles colonies.</p>
<p>Expression des résultats</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Retenir les résultats des boîtes contenant entre 10 et 300 colonies. – Utiliser la formule : $N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) \cdot V \cdot d}$ <p>Le résultat sera exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9.10^x par millilitre de lait.</p>

Composition du milieu	Gélose glucosée au lait écrémé	Extrait de levure 2,5 g Tryptone 5,0 g Glucose 1,0 g Poudre de lait écrémé 1,0 g Agar 10 à 15 g Eau 1 000 mL
	Le pH, après stérilisation à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C +/- 1 °C, doit être de 6,9 +/- 0,1 à 30 °C.	

Dénombrement des *Pseudomonas* sur et dans les viandes et produits à base de viande

Norme AFNOR NF V 04-504 (septembre 1988)

Objectifs	<p>Les <i>Pseudomonas</i> (<i>Ps. fluorescens</i>, <i>Ps. fragi</i>) sont des bacilles Gram négatif aérobies stricts qui dominent dans la flore d'altération superficielle, surtout lorsque la surface des viandes demeure humide. Ils se développent sur les carcasses des viandes, mais également sur des pièces plus petites ou sur la viande hachée.</p> <p>La surface de la viande se couvre d'une couche visqueuse (poissage) visible pour une concentration de 10^8 bactéries par cm^2, et une odeur nauséabonde s'en dégage lorsque le nombre de bactéries dépasse 10^7 par cm^2.</p>
Principe	<p>Seront dénombrées comme des <i>Pseudomonas</i> les bactéries qui, à 22 °C et en 48 h, forment des colonies en milieu sélectif de Mead et Adams, milieu au CFC (cétrimide, fucidine, céphalosporine), sont oxydase positive et cultivent en aérobiose sur le milieu de Kligler.</p>
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation de l'échantillon pour un dénombrement sur une viande <ul style="list-style-type: none"> – Sans cautérisation préalable, prélever sur une pièce de viande un lambeau superficiel de 2 à 3 mm d'épaisseur d'une surface délimitée (5 cm x 5 cm par exemple). – Placer le lambeau dans un flacon de verre stérile ou un sac plastique stérile adaptables à l'appareil de broyage-homogénéisation et contenant 100 mL d'eau peptonée tamponnée. • Réalisation des dilutions <p>Préparer, à partir de la suspension mère, les dilutions 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5}.</p> • Ensemencement et incubation <ul style="list-style-type: none"> – Transférer, dans des boîtes de Petri stériles, 1 mL de la suspension mère (10^{-1}) et des dilutions, en double essai. – Couler dans chaque boîte environ 15 mL du milieu CFC et bien mélanger. Le temps entre la fin de la préparation de la suspension mère et la répartition dans les boîtes de milieu de culture ne doit pas dépasser 15 minutes. – Incuber les boîtes retournées à 22 °C pendant 48 heures. Si le développement des colonies est insuffisant après ce délai, prolonger l'incubation pendant 24 heures.
Lecture	<p>Dénombrer les colonies pour chaque boîte contenant entre 15 et 300 colonies.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Confirmation <ul style="list-style-type: none"> – Isoler, sur des boîtes de gélose nutritive, 5 colonies prélevées au hasard sur chacune des boîtes présentant entre 15 et 300 colonies. – Incuber les boîtes à 22 °C pendant 24 h. – À partir des cultures pures, réaliser le test à l'oxydase et ensemencer un milieu de Kligler qui sera incubé à 22 °C pendant 24 h. <p>Sont confirmées comme étant des colonies de <i>Pseudomonas</i> celles qui sont oxydase positive et qui ne se développent que sur la pente (aérobie) en milieu de Kligler.</p>

Expression des résultats	<p>Si au moins 80 % des colonies testées sur l'ensemble des boîtes sont révélées comme étant des <i>Pseudomonas</i>, prendre comme résultat le nombre obtenu par le dénombrement des colonies.</p> <p>Dans tous les autres cas, calculer le nombre de <i>Pseudomonas</i> à partir du pourcentage de <i>Pseudomonas</i> obtenus lors du dénombrement et ayant été confirmés.</p> <p>Exprimer le résultat par un nombre compris entre 1,0 et $9,9 \cdot 10^x$.</p>	
Composition du milieu	Milieu CFC (milieu de Mead et Adams)	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu de base Peptone de gélatine 16,0 g Hydrolysate de caséine 10,0 g Sulfate de potassium 10,0 g Chlorure de magnésium 1,4 g Agar 12,0 à 18,0 g Eau 1 000 mL Le pH, après stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes, doit être de 7,2 à 25 °C. • Solution de cétrimide (solution A) Cétrimide 0,1 g Eau 100 mL Stériliser par filtration • Solution de fucidine (solution B) Fucidine 0,1 g Eau 100 mL Stériliser par filtration Solution de céphalosporine (solution C) Céphalosporine 0,1 g Eau 100 mL Stériliser par filtration Milieu complet Milieu de base 100 mL Solution A 1 mL Solution B 1 mL Solution C 5 mL Ajouter stérilement les solutions d'inhibiteurs au milieu de base à 45 °C et mélanger.

Dénombrement de *Brochothrix thermosphacta* sur et dans les viandes et produits à base de viande

Norme AFNOR NF V 04-505 (septembre 1989)

Objectifs	<p><i>Brochothrix thermosphacta</i> est un bacille Gram positif, cultivant à des températures comprises entre 0 °C et 25 °C, à des pH allant de 5 à 9, et qui est inhibé par les nitrites. Il est aéro-anaérobie facultatif et peut se développer dans les viandes conditionnées sous film.</p> <p>Il est responsable, avec <i>Lactobacillus viridescens</i>, du verdissement par la libération de peroxydes attaquant les pigments de la viande et de surissement par production d'acide lactique.</p>	
Principe	<p>Sont dénombrées comme <i>Brochothrix thermosphacta</i> les bactéries qui, à 22 °C en 48 h, forment des colonies en milieu sélectif de Gardner, milieu STAA (streptomycine, thallium acétate, actidione).</p>	
Mode opératoire	<p>Il est identique à celui du dénombrement des <i>Pseudomonas</i> en ce qui concerne la préparation de l'échantillon et des dilutions, l'ensemencement et l'incubation, ainsi que le dénombrement des colonies (<i>Voir manipulation 17</i>). En revanche, il n'est pas nécessaire de rechercher des caractères confirmant la présence de <i>Brochothrix thermosphacta</i>.</p>	
Expression des résultats	<p>Retenir les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies, au niveau de deux dilutions successives. Calculer le nombre N de <i>Brochothrix thermosphacta</i> par gramme de produit, à l'aide de l'équation :</p> $N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) \cdot d}$ <p>Le résultat sera exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9.10^x.</p>	
Composition du milieu	<p>Milieu STAA (milieu de Gardner)</p>	<p>• Milieu de base</p> <p>Peptone 20,0 g Extrait de levure 2,0 g Sulfate de magnésium (7 H₂O) 0,1 g Monohydrogénophosphate de potassium (K₂HPO₄) . 1,0 g Glycérol 15,0 g Pourpre de bromocrésol 0,02 g Agar 8 à 18,0 g Eau 1 000 mL</p> <p>Le pH, après stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes, doit être de 7,0 à 25 °C.</p>

• Solution de sulfate de streptomycine (solution A)

Sulfate de streptomycine 5,0 g

Eau 100 mL

Stériliser par filtration

• Solution d'actidione (solution B)

Actidione 0,5 g

Eau distillée 100 mL

Stériliser par filtration

• Solution d'acétate de thallium (solution C)

Acétate de thallium 0,5 g

Eau distillée 100 mL

Stériliser par filtration

• Milieu complet

Milieu de base 97 mL

Solution A 1 mL

Solution B 1 mL

Solution C 1 mL

Ajouter les 3 solutions au milieu de base à environ 48 °C et mélanger.

Détermination du temps de réduction décimale à 60 °C d'une souche de *E. coli*

Objectif Dénombrer les bactéries qui restent revivifiables après un traitement à 60 °C pendant un temps donné afin de déterminer le temps de réduction décimale à 60 °C (D_T).

Mode opératoire

• **Ajustement de la suspension bactérienne**

- À partir de la *culture jeune* en bouillon, effectuer une évaluation de la population par mesure de l'absorbance à 600 nm.
On admet qu'une absorbance de 0,5 UA correspond à $5 \cdot 10^8$ cellules par millilitre de suspension bactérienne.
- Ajuster la suspension à 0,6 UA (une dilution est nécessaire) ; prévoir 12 mL de suspension.
- Répartir la culture ajustée dans 8 tubes à hémolyse stériles (1 mL/tube) ; conserver au froid jusqu'à utilisation, celle-ci doit se faire le plus rapidement possible.
- Le tube correspondant à la durée 0 min est laissé dans la glace.

• **Dénaturation thermique à 60 °C**

- Disposer les 7 tubes à hémolyse contenant la suspension ajustée dans le bain thermostaté à 60 °C.
- Suivre la dénaturation thermique au chronomètre et retirer les tubes correspondant à chaque temps indiqué : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 min ; les placer immédiatement dans la glace.

• **Dénombrement des bactéries revivifiables**

- À partir de chaque tube correspondant à un temps donné, effectuer des dilutions successives dans les tubes à hémolyse contenant 900 mL d'eau ; ce travail doit être rapidement effectué, et les tubes de dilutions doivent être conservés dans la glace.
Les dilutions suivantes peuvent être testées :

Tube	0	2	3	4	5	6	7	8
Dilution	4-5-6-7	3-4-5-6	3-4-5-6	2-3-4-5	0-1-2-3	0-1-2-3	0-1-2-3	0-1-2-3

- Déposer 15 μ L de chaque dilution à tester sur la gélose nutritive bien sèche.

Chaque essai doit être doublé ; huit dépôts sont réalisés par boîte, soit une boîte par temps.

- Laisser sécher les gouttes déposées, incuber 24 h à 37 °C.

Une technique différente de dépôt peut être utilisée : dépôt de 100 μ L et étalement à l'aide de billes de verre à la surface de la gélose.

**Exploitation
des résultats**

- Pour chaque temps de dénaturation, compter les colonies pour la ou les dilution(s) possible(s).
 - Calculer la concentration en bactéries revivifiables totales par mL (CBRT) à chaque temps :
$$\text{CBRT} = m.n / p$$

m = moyenne du nombre d'UFC pour la dilution comptable.
n = inverse de la dilution comptable.
p = volume de dépôt en mL.
 - Donner sous forme de tableau l'ensemble des résultats obtenus.
 - Tracer $\log_{10} \text{CBRT} = f(t)$; en déduire $D_{60^\circ\text{C}}$.
- La partie linéaire de la courbe se situe entre 2 et 6 min.

Dénombrement de la flore thermorésistante d'un lait cru destiné à la pasteurisation

<p>Objectifs</p>	<p>Ce sont des bactéries capables de résister à des températures relativement élevées et de survivre à un chauffage de 63,5 °C pendant 30 minutes. Ces conditions correspondent à celles de la basse pasteurisation (LTLT = <i>low temperature long time</i>) dans l'industrie laitière.</p> <p>Les genres et les espèces les plus fréquemment rencontrés sont :</p> <ul style="list-style-type: none"> – des bactéries à Gram positif asporogènes telles que <i>Micrococcus luteus</i>, <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Microbacterium lacticum</i>, <i>Corynebacterium</i> ; – des bacilles à Gram positif sporulés tels <i>Bacillus</i> et <i>Clostridium</i>, qui résistent à des températures encore plus élevées. <p>Parmi les bactéries sporulantes, il existe des souches de <i>Bacillus</i> psychrotrophes qui limitent la durée de conservation au froid de produits pasteurisés, en l'absence d'autres contaminants.</p> <p>Le dénombrement de ces bactéries permet d'apprécier la qualité d'un lait destiné à la pasteurisation et de contrôler l'efficacité des techniques de traitement thermique mises en œuvre.</p>
<p>Principe</p>	<p>Le dénombrement est effectué sur gélose glucosée au lait écrémé stérile, dans les mêmes conditions que celui de la flore totale, mais sur un échantillon de lait ayant été préalablement chauffé à 63,5 °C pendant 30 min.</p> <p style="text-align: center;">REMARQUE</p> <p>Il ne sera donc traité que la partie concernant la préparation de l'échantillon.</p>
<p>Mode opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Avant d'ouvrir le récipient, nettoyer à l'alcool à 70 °C la surface extérieure où se fera le prélèvement. – Homogénéiser soigneusement l'échantillon en retournant de nombreuses fois le récipient qui le contient et prélever dans les 3 minutes après le mélange. – Introduire 10 mL de lait à analyser dans un tube stérile et boucher le tube. – Préparer de façon identique un tube témoin dans lequel plonge un thermomètre. – Immerger les deux tubes en même temps, en vérifiant que le niveau d'eau du bain à 63,5 °C soit largement au-dessus de celui du lait. – Laisser les tubes 30 min à partir du moment où la température du lait atteint 63,5 °C dans le tube témoin. – Après ce temps, l'échantillon est immédiatement refroidi dans la glace ou sous le robinet. – Réaliser ensuite des dilutions à partir du lait ainsi traité et effectuer le dénombrement. <p style="text-align: center;">REMARQUE</p> <p>Une technique moins rigoureuse, sans préparer de témoin, consiste à laisser l'échantillon 35 min à 63,5 °C. On considère qu'il faut 5 min pour atteindre 63,5 °C à l'intérieur du tube.</p>

Dénombrement en milieu liquide des spores thermorésistantes de *Bacillus* et *Clostridium* thermophiles dans les matières premières entrant dans la composition des conserves

Norme AFNOR NF V 08-407 (octobre 1989)

	<p>Les spores thermorésistantes de <i>Bacillus</i> et de <i>Clostridium</i> mésophiles et thermophiles peuvent être présentes en grande quantité dans certaines matières premières, mais ce sont surtout celles des espèces thermophiles qui sont à l'origine de l'altération des conserves. Leur dénombrement est important pour mieux maîtriser le niveau du barème de stérilisation (température/temps).</p>
<p>Principe</p>	<p>Certains <i>Bacillus</i> thermophiles pouvant se développer en anaérobiose, un dénombrement global des spores thermorésistantes des <i>Bacillus</i> et des <i>Clostridium</i> thermophiles est réalisé. Ces spores, après une épreuve de sélection thermique, peuvent donner naissance à des formes végétatives de <i>Bacillus</i> et de <i>Clostridium</i> qui se développent en milieu liquide de Rosenow, incubé à 55 °C pendant 1 à 8 jours. Le résultat du dénombrement est obtenu par la technique du nombre le plus probable.</p>
<p>Mode opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement de l'échantillon et préparation de la suspension mère Le prélèvement se fait conformément au produit concerné. <ul style="list-style-type: none"> – Préparer la suspension mère en utilisant de l'eau peptonée tamponnée, dans un flacon d'une capacité au moins égale au double du volume de la suspension mère, celui-ci ne devant pas être inférieur à 100 mL. – Préparer de la même manière un flacon témoin, dans lequel plonge un thermomètre pour surveiller la montée en température lors de l'épreuve de sélection thermique. • Épreuve de sélection thermique et réalisation des dilutions <ul style="list-style-type: none"> – Immerger en même temps dans le bain d'éthylène glycol le flacon de suspension mère et le flacon témoin, et vérifier que le niveau du liquide du bain est bien supérieur à celui de la suspension mère dans les flacons. Agiter régulièrement. – Lorsque le thermomètre du flacon témoin indique 98 °C, prolonger l'immersion pendant 30 min. – Les flacons sont ensuite refroidis immédiatement dans un courant d'eau froide. • Réalisation des dilutions À partir de la suspension mère ainsi traitée, réaliser un nombre de dilutions en eau peptonée tamponnée de sorte que les tubes de la dernière dilution soient tous négatifs. • Ensemencement et incubation <ul style="list-style-type: none"> – Dans trois tubes de milieu préalablement régénéré, transférer 1 mL de la suspension mère chauffée, et opérer de façon similaire pour chacune des dilutions suivantes. – Recouvrir la surface de chaque tube avec de l'huile de vaseline stérile, de la paraffine stérile fondue ou de la gélose blanche en surfusion à 45 °C. – Incuber les tubes à l'étuve à 55 °C pendant 8 jours.

	Lecture et interprétation	<ul style="list-style-type: none"> – Réaliser une lecture chaque jour pendant 8 jours en notant les tubes présentant une culture : – virage de l'indicateur d'Andrade au rouge carmin (acidification) ou au jaune-vert (alcalinisation) ; – ou/et trouble ; – ou/et dégagement gazeux. – La lecture, le 8^e jour, permet de calculer le NPP. <p>Certains produits, comme les produits laitiers, troublent le milieu dès l'ensemencement. En l'absence de virage de l'indicateur après incubation, il faudra donc vérifier par un examen microscopique la présence d'une croissance bactérienne.</p>																
	Expression des résultats	<ul style="list-style-type: none"> – Lire la valeur du NPP dans la table et la diviser par le taux de la dilution retenue la moins élevée, pour obtenir le nombre de spores thermorésistantes de <i>Bacillus</i> et de <i>Clostridium</i> thermophiles présumés par millilitre ou par gramme de produit. – Ne pas oublier de tenir compte de la valeur de la dilution correspondant à la réalisation de la suspension mère. – Exprimer le résultat par un nombre compris entre 1,0 et $9,9 \cdot 10^x$. <p>Dans le cas où tous les tubes sont négatifs, et avec une suspension mère au 1/10, le résultat correspond à : « moins de 3 spores thermorésistantes de <i>Bacillus</i> et de <i>Clostridium</i> thermophiles présumés, dans 1 mL ou 1 g de produit ».</p>																
Composition des milieux	Milieu de Rosenow cystéiné avec amidon, cervelle et marbre	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Peptone</td><td style="text-align: right;">10,0 g</td></tr> <tr><td>Extrait de viande</td><td style="text-align: right;">3,0 g</td></tr> <tr><td>Chlorure de sodium</td><td style="text-align: right;">5,0 g</td></tr> <tr><td>Glucose</td><td style="text-align: right;">2,0 g</td></tr> <tr><td>Amidon soluble</td><td style="text-align: right;">2,0 g</td></tr> <tr><td>Chlorhydrate de cystéine</td><td style="text-align: right;">0,3 g</td></tr> <tr><td>Indicateur d'Andrade (fuchsine acide à 5 % dans l'eau distillée)</td><td style="text-align: right;">10 mL</td></tr> <tr><td>Eau</td><td style="text-align: right;">1 000 mL</td></tr> </table>	Peptone	10,0 g	Extrait de viande	3,0 g	Chlorure de sodium	5,0 g	Glucose	2,0 g	Amidon soluble	2,0 g	Chlorhydrate de cystéine	0,3 g	Indicateur d'Andrade (fuchsine acide à 5 % dans l'eau distillée)	10 mL	Eau	1 000 mL
	Peptone	10,0 g																
	Extrait de viande	3,0 g																
	Chlorure de sodium	5,0 g																
Glucose	2,0 g																	
Amidon soluble	2,0 g																	
Chlorhydrate de cystéine	0,3 g																	
Indicateur d'Andrade (fuchsine acide à 5 % dans l'eau distillée)	10 mL																	
Eau	1 000 mL																	
<p>Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,2 à 25 °C. Répartir le milieu à raison de 10 mL dans des tubes à essais et ajouter dans chaque tube un morceau de marbre blanc et un morceau de cervelle fraîche ou lyophilisée de bœuf ou de mouton. Stériliser à 121 °C pendant 20 min. Conserver entre 0 °C et 5 °C, 15 jours au maximum.</p>																		
Eau peptonée tamponnée	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Peptone</td><td style="text-align: right;">10,0 g</td></tr> <tr><td>NaCl</td><td style="text-align: right;">5,0 g</td></tr> <tr><td>Na₂HPO₄, 10 H₂O</td><td style="text-align: right;">9,0 g</td></tr> <tr><td>KH₂PO₄</td><td style="text-align: right;">1,5 g</td></tr> <tr><td>Eau distillée</td><td style="text-align: right;">qsp 1 000 mL</td></tr> </table>	Peptone	10,0 g	NaCl	5,0 g	Na ₂ HPO ₄ , 10 H ₂ O	9,0 g	KH ₂ PO ₄	1,5 g	Eau distillée	qsp 1 000 mL							
Peptone	10,0 g																	
NaCl	5,0 g																	
Na ₂ HPO ₄ , 10 H ₂ O	9,0 g																	
KH ₂ PO ₄	1,5 g																	
Eau distillée	qsp 1 000 mL																	
<p>Ajuster le pH à 7,0 à 25 °C, après stérilisation à 121 °C pendant 20 minutes.</p>																		

Recherche de *Bacillus* thermophiles, formes végétatives et spores, dans les conserves

Norme AFNOR NF V 08-404 (avril 1986)

<p>Objectifs</p>	<p>Les défauts de fabrication des conserves apparaissent lors de la survie de <i>Bacillus</i> thermophiles, notamment dans le cas d'un barème de stérilisation insuffisant en température ou/et durée, ou dans le cas d'une contamination microbienne initiale trop élevée des matières premières.</p> <p>Certains de ces <i>Bacillus</i> (<i>B. stearotherophilus</i>, <i>B. coagulans</i>) sont responsables d'une acidification avec peu ou pas de production de gaz. Il s'agit du « flat sour », c'est-à-dire d'accidents de surissement sans bombage de conserves initialement peu acides (pH > 5,3).</p> <p>Les spores des <i>Bacillus</i> mésophiles (<i>B. subtilis</i>, <i>B. polymyxa</i>, <i>B. macerans</i>) sont relativement peu résistantes et sont souvent incapables de se développer dans des produits acides ou en anaérobiose.</p>
<p>Principe</p>	<p>Les <i>Bacillus</i> thermophiles sont des bacilles Gram positif en culture jeune, capables de sporuler, cultivant en aérobiose à 55 °C, catalase positive en général.</p> <p>La recherche des <i>Bacillus</i> thermophiles, à l'état de formes végétatives ou de spores revivifiables, se fait dans trois milieux : bouillon glucosé, milieu de Rosenow, milieu au jus de tomate après une incubation à 55 °C pendant 5 jours.</p>
<p>Mode opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement de l'échantillon Se conformer aux recommandations pour le prélèvement aseptique à partir d'une conserve (Voir chap. II 5.3.3). • Examen microscopique <ul style="list-style-type: none"> – Réaliser une coloration de Gram à partir d'un frottis, éventuellement dégraissé. – Observer la présence de formes végétatives et de spores. • Ensemencement <ul style="list-style-type: none"> – Recherche des formes végétatives <ul style="list-style-type: none"> – Ensemencer 3 tubes de bouillon glucosé et 3 tubes de milieu de Rosenow et/ou de milieu au jus de tomate, en transférant 1 mL ou 1 g de produit pour 10 mL de milieu. Pour les produits hétérogènes, la composition de l'inoculum doit être représentative de celle de la conserve analysée. – Recherche des formes sporulées <ul style="list-style-type: none"> – Cas des conserves de pH > 4,5 <ul style="list-style-type: none"> – Procéder comme pour la recherche des formes végétatives, puis immerger dans un bain d'eau bouillante, pendant 10 min, les tubes de milieux de culture ensemencés. – Vérifier que le niveau de l'eau du bain est bien supérieur à celui du milieu de culture dans les tubes. – Sortir les tubes et les refroidir immédiatement sous un courant d'eau froide. – La présence de spores thermorésistantes dans l'inoculum sera mise en évidence par une culture.

	<p style="text-align: center;">Cas des conserves de pH < 4,5</p> <ul style="list-style-type: none"> – Réaliser l'épreuve de sélection thermique dans les mêmes conditions que précédemment, mais à une température de 80 °C pendant 10 min.
<p style="text-align: center;">Lecture et interprétation</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Incubation <ul style="list-style-type: none"> – Incuber tous les milieux de culture dans une étuve à 55 °C +/- 1 °C pendant 5 jours. <ul style="list-style-type: none"> – Réaliser chaque jour une lecture des tubes, et retirer de l'étuve ceux qui présentent une culture : <ul style="list-style-type: none"> – bouillon glucosé : trouble du milieu ; – milieu de Rosenow : virage de l'indicateur d'Andrade au rouge carmin, trouble du milieu ; – milieu au jus de tomate : présence d'un voile en surface. – Effectuer à partir de ces tubes une coloration de Gram, pour observer des bacilles à Gram positif en culture jeune et la présence éventuelle de spores. La présence de spores sera révélée plus facilement sur une culture plus âgée, mais les bacilles n'apparaîtront pas aussi nettement Gram positif. <p>Après les 5 jours d'incubation à 55 °C :</p> <ul style="list-style-type: none"> – soit aucune culture n'est apparue dans tous les milieux ensemencés. Dans ce cas, conclure : absence de <i>Bacillus</i> thermophiles ; – soit présence d'une culture, dans les tubes pour la recherche des formes végétatives, ou dans ceux pour la recherche des spores, ou enfin dans les deux cas : réaliser des essais de confirmation à partir des tubes positifs.
	<ul style="list-style-type: none"> • Essais de confirmation <ul style="list-style-type: none"> – À partir des tubes positifs pour la recherche des spores : <ul style="list-style-type: none"> – réaliser avec la même anse un ensemencement en stries de deux boîtes de Petri, l'une après l'autre, contenant le même milieu de culture sous forme gélosée ; – incubé à 55 °C +/- 1 °C pendant 18 à 24 h ; – si des colonies se développent en aérobiose, en repérer les différents types morphologiques et mettre en suspension dans 1 mL d'eau distillée stérile une colonie de chaque type ; – verser 2 à 3 gouttes du réactif de la catalase, l'apparition de bulles de gaz révèle une catalase positive. – À partir de chaque tube positif pour la recherche des formes végétatives : <ul style="list-style-type: none"> – réaliser une culture en aérobiose et la recherche de la catalase, en suivant le protocole ci-dessus ; – mettre en évidence des spores en ensemençant un tube du même milieu, en réalisant une sélection thermique (10 min à 80 °C ou à 100 °C selon le pH de la conserve) ; – incubé à 55 °C +/- 1 °C pendant 5 jours. <p>La présence d'une culture montre la capacité des bacilles à sporuler, dans la culture initiale.</p>
<p style="text-align: center;">Expression des résultats</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Culture en aérobiose –, mise en évidence des spores + ou – conclure : absence de <i>Bacillus</i> thermophiles. – Culture en aérobiose +, catalase +, mise en évidence des spores +, conclure : présence de <i>Bacillus</i> thermophiles. – Culture en aérobiose +, catalase –, mise en évidence des spores +, conclure : présence de <i>Bacillus</i> thermophiles catalase – (majorité des cas de <i>Bacillus stearothermophilus</i>) – Culture en aérobiose +, catalase + ou –, mise en évidence des spores –, conclure : présence de <i>Bacillus</i> thermophiles dont les spores n'ont pu être observées. <p>Ce dernier cas peut s'expliquer par :</p> <ul style="list-style-type: none"> – la difficulté des <i>Bacillus</i> thermophiles à sporuler dans les milieux de culture utilisés ; – une recontamination par un <i>Bacillus</i> thermophile après le traitement thermique.

Composition des milieux	Bouillon glucosé	Tryptone 4 g Digestat pancréatique de caséine 4 g Digestat pancréatique de soja 3 g Extrait de levure 4 g Chlorure de sodium 5 g Glucose 5 g Amidon soluble 1 g Agar 1 g Eau 1 000 mL
	Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes, il soit de 6,1 à 25 °C. Répartir le milieu à raison de 10 mL dans des tubes à essais.	
	Milieu de Rosenow avec amidon	Peptone 10,0 g Extrait de viande 3,0 g Chlorure de sodium (NaCl) 5,0 g Glucose 2,0 g Amidon soluble 2,0 g Indicateur d'Andrade (fuchsine acide à 5 % dans l'eau distillée) 10 mL Eau 1 000 mL
Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,2 à 25 °C. Répartir le milieu à raison de 10 mL dans des tubes à essais. Stériliser à 121 °C pendant 20 min. Conserver entre 0 °C et 5 °C, 15 jours au maximum.		
	Milieu au jus de tomate	Peptone 10 g Jus de tomate 20 mL Digestat pancréatique de lait (lait peptonisé) 10 g Eau 1 000 mL
Utiliser des jus stériles conservés dans des récipients en verre et ne contenant pas d'agents inhibiteurs de la croissance microbienne. Ajuster le pH de sorte qu'après la stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes, il soit de 5,0 à 25 °C. Répartir le milieu à raison de 10 mL dans des tubes à essais.		
Pour l'utilisation de ces milieux sous forme gélosée, ajouter 12 à 18 g d'agar par litre.		

Recherche de *Clostridium* thermophiles, formes végétatives et spores, dans les conserves

Norme AFNOR NF V 08-405 (décembre 1986)

<p>Objectifs</p>	<p>Les <i>Clostridium</i> protéolytiques sont responsables de la putréfaction des conserves. Ce type d'altération est dû :</p> <ul style="list-style-type: none"> - soit à des <i>Clostridium</i> thermophiles (<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>) rencontrés dans des produits faiblement acides (conserves de légumes) ayant subi un sous-traitement thermique. Ces bactéries produisent de l'H_2S qui peut entraîner le bombage de la boîte et une odeur d'œuf pourri à l'ouverture ; - soit à des <i>Clostridium</i> mésophiles (<i>Clostridium sporogenes</i>, <i>Clostridium putrefaciens</i>) qui décomposent les protéines en substances malodorantes (indole, scatol...). Une forte production de gaz (H_2, CO_2, H_2S) se manifeste par un bombage très important des boîtes. <p>REMARQUE <i>Clostridium botulinum</i> fait partie des mésophiles, mais en général, aucune altération n'est visible, et cependant la conserve est hautement toxique.</p> <p>Les <i>Clostridium</i> butyriques ou saccharolytiques transforment le contenu des conserves en un produit fermenté, aigre, ayant une odeur butyrique, et s'accompagnant d'une très forte production de gaz responsable du bombage, voire même de l'explosion de la boîte. Ce type d'altération est dû :</p> <ul style="list-style-type: none"> - soit à des <i>Clostridium</i> thermophiles (<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>) dans les conserves peu ou moyennement acides ($pH \geq 4,5$) ; - soit à des <i>Clostridium</i> mésophiles (<i>Clostridium butyricum</i> ou <i>Clostridium pasteurianum</i> et parfois <i>Clostridium perfringens</i> dans les conserves acides ($pH < 4,5$).
<p>Principe</p>	<p>Les <i>Clostridium</i> thermophiles sont des bacilles sporulés se développant uniquement en anaérobiose à la température de 55 °C. Ces bactéries sont présentes dans le cas d'un produit ayant subi un sous-traitement thermique ou dans le cas d'une charge microbienne initiale très élevée des matières premières.</p> <p>La recherche de <i>Clostridium</i> thermophiles, à l'état de formes végétatives ou de spores revivifiables, s'effectue dans des tubes de milieu de Rosenow cystéiné additionné d'amidon et/ou de bouillon glucosé, recouverts de paraffine, d'huile de vaseline, ou de gélose blanche, et par ensemencement d'une gélose sulfitée au citrate de fer après une incubation à 55 °C jusqu'à 8 jours.</p>
<p>Mode opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement de l'échantillon Se conformer aux recommandations pour le prélèvement aseptique à partir d'une conserve (Voir chap. II 5.3.3). • Examen microscopique - Réaliser une coloration de Gram à partir d'un frottis, éventuellement dégraissé. - Observer la présence de formes végétatives et de spores. <p>REMARQUE Les deux espèces <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> et <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> apparaissent Gram négatif.</p>

	<ul style="list-style-type: none"> • Ensemencement et incubation – Recherche des formes végétatives Pour les conserves hétérogènes, la composition de l'inoculum doit être représentative de la totalité de la conserve analysée. – Ensemencer 3 tubes de milieu de Rosenow cystéiné et/ou de bouillon glucosé et 3 tubes de gélose sulfitée au citrate de fer, préalablement régénérés, en transférant un inoculum de 1 g ou de 1 mL de produit pour 10 mL de milieu liquide (inoculum plus faible dans le cas d'un milieu solide). – Recouvrir tous les tubes des milieux liquides avec de l'huile de vaseline stérile, de la paraffine stérile, ou de la gélose blanche préalablement fondues. – Refroidir rapidement dans un bain d'eau froide la gélose sulfitée au citrate de fer. – Recherche des formes sporulées – Ensemencer comme précédemment les différents milieux, puis en recouvrir la surface sans utiliser de gélose blanche, et les immerger pendant 10 minutes dans un bain d'eau bouillante. – Vérifier que le niveau de l'eau du bain est supérieur à celui du milieu de culture dans les tubes. – Sortir les tubes et les refroidir immédiatement sous un courant d'eau froide. – Incuber tous les milieux ensemencés dans une étuve à 55 +/- 1 °C jusqu'à 8 jours.
<p>Lecture et interprétation</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Réaliser chaque jour une lecture des tubes. – En l'absence de culture, laisser les tubes à l'étuve pendant 8 jours. – Retirer de l'étuve les tubes de milieux présentant une culture : <ul style="list-style-type: none"> – milieu de Rosenow : virage de l'indicateur au rouge ou au vert, trouble du milieu, avec éventuellement dégagement gazeux ; – bouillon glucosé : trouble du milieu, dégagement gazeux ; – gélose sulfitée au citrate de fer : présence de colonies, noires s'il s'agit de <i>D. nigrificans</i>. – Après les 8 jours d'incubation à 55 °C, si aucun développement n'est apparu dans tous les milieux ensemencés, conclure : absence de <i>Clostridium</i> thermophiles.
	<ul style="list-style-type: none"> • Essais de confirmation À partir des tubes positifs pour la recherche des spores, le caractère anaérobie strict doit être vérifié. – Si la gélose sulfitée au citrate de fer est positive (milieu solide), réaliser les opérations suivantes : <ul style="list-style-type: none"> – repérer, au fond du tube, une colonie isolée pour chaque type morphologique et la repiquer dans un milieu de Rosenow cystéiné ou un bouillon glucosé, préalablement régénérés, puis recouvrir les tubes avec de l'huile de vaseline stérile, de la paraffine stérile ou de la gélose blanche préalablement fondues ; – dans le cas où les colonies ne sont pas isolées, prélever à l'aide d'une pipette Pasteur stérile soit du liquide présent dans le milieu, soit du milieu gélosé ; – incuber à 55 +/- 1 °C pendant 8 jours si nécessaire ; – s'il y a présence d'une culture, poursuivre les essais de confirmation, comme dans le cas des milieux de culture positifs liquides. – Si le milieu de Rosenow cystéiné ou le bouillon glucosé est positif (milieu liquide), réaliser les opérations suivantes : <ul style="list-style-type: none"> – ensemencer en stries, avec une anse, quatre boîtes de gélose Columbia à partir de chacun des milieux liquides ; – incuber deux boîtes, à l'endroit, dans la jarre pour culture en anaérobiose, à 55 °C +/- 1 °C jusqu'à 4 jours dans le cas d'une absence de culture ; – incuber les deux autres boîtes en aérobie à 55 +/- 1 °C et les laisser 4 jours à l'étuve dans le cas d'une absence de culture ;

	<ul style="list-style-type: none"> - en présence d'une culture à la fois en anaérobiose et en aérobiose, repérer selon les types morphologiques isolés les colonies se développant en anaérobiose ; - ensemencer par stries, avec l'anse, une colonie isolée de chaque type morphologique à la surface de deux boîtes de gélose Columbia ; - incuber à 55 +/- 1 °C une boîte en aérobiose et l'autre en jarre pour culture en anaérobiose ; - en l'absence de culture, prolonger l'incubation 4 jours. 	
Expression des résultats	<ul style="list-style-type: none"> - Culture en aérobiose + pour tous les types morphologiques isolés, aptitude à la sporulation + ou -, conclure : absence de <i>Clostridium</i> thermophiles. - Culture en aérobiose - pour au moins un type morphologique isolé, aptitude à la sporulation +, conclure : présence de <i>Clostridium</i> thermophiles. - Culture en aérobiose- pour au moins un type morphologique isolé, aptitude à la sporulation -, conclure : présence de <i>Clostridium</i> thermophiles, dont les spores n'ont pu être observées. <p>Ce dernier cas peut s'expliquer par :</p> <ul style="list-style-type: none"> - la difficulté des <i>Clostridium</i> thermophiles à sporuler dans les milieux de culture utilisés ; - une recontamination par un <i>Clostridium</i> thermophile après le traitement thermique. 	
Composition des milieux	Milieu de Rosenow cystéiné avec amidon, cervelle et marbre	Peptone 10,0 g Extrait de viande 3,0 g Chlorure de sodium 5,0 g Glucose 2,0 g Amidon soluble 2,0 g Chlorhydrate de cystéine 0,3 g Indicateur d'Andrade (fuchsine acide à 5 % dans l'eau distillée) 10 mL Eau 1 000 mL
	Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,2 à 25 °C. Répartir le milieu à raison de 10 mL dans des tubes à essais et ajouter dans chaque tube un morceau de marbre blanc et un morceau de cervelle fraîche ou lyophilisée de bœuf ou de mouton. Stériliser à 121 °C pendant 20 min. Conserver entre 0 et 5 °C, 15 jours au maximum.	
	Bouillon glucosé	Tryptone 4 g Digestat pancréatique de caséine 4 g Digestat pancréatique de soja 3 g Extrait de levure 4 g Chlorure de sodium 5 g Glucose 5 g Amidon soluble 1 g Agar 1 g Eau 1 000 mL
	Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes, il soit de 6,1 à 25 °C. Répartir le milieu à raison de 10 mL dans des tubes à essais.	
	Gélose sulfitée au citrate de fer	Tryptone 10 g Métabisulfite de sodium 0,5 g Citrate de fer 0,5 g Agar 12 à 18 g Eau 1 000 mL
Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes, il soit de 7,2 à 25 °C. Répartir le milieu de culture par quantités de 12 mL dans des tubes de 16 mm x 160 mm.		

Gélose Columbia

Tryptone	5 g
Peptone pepsique	5 g
Hydrolysate de peptones animales et végétales	10 g
Peptone trypsique de cœur	3 g
Amidon	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	10 à 15 g
Eau	1 000 mL

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation à 121 °C pendant 20 min, il soit de 7,3 à 25 °C.

Répartir le milieu par quantités de 15 mL environ dans des tubes de 16 mm x 160 mm.

Dénombrement des spores « butyriques » dans les laits destinés à la fabrication des fromages à pâte cuite et dans les fromages

Méthode approuvée par l'Institut technique du gruyère

Objectifs	<p>Deux espèces bactériennes sont fréquemment rencontrées : <i>Clostridium butyricum</i> et <i>Clostridium tyrobutyricum</i>.</p> <p>Les spores de ces bactéries présentes dans le sol se retrouvent fréquemment dans les ensilages, puis dans le lait. Il s'agit soit d'une contamination directe du lait, soit d'une contamination indirecte à partir des fèces des animaux nourris sous ensilage.</p> <p>Ces <i>Clostridium</i> sont responsables du gonflement tardif et de l'éclatement des fromages, à pâte cuite surtout (comté, emmental, beaufort...). Ils réalisent, à partir du lactate, la fermentation butyrique avec production de gaz (CO₂ et H₂), accompagnée d'une dénaturation du goût (goût de rance). Ces accidents de fabrication se manifestent à partir d'un nombre limité de spores (200/L de lait), ils sont fréquents au-dessus de 500 spores/L et sont généralisés à 3 000 spores/L. Les laits d'ensilage sont interdits pour la fabrication de ces fromages.</p>
Principe	<p>Le dénombrement des spores butyriques est effectué sur le milieu liquide de Bryant-Burkey modifié par Bergère, par la technique du nombre le plus probable, après une incubation à 37 °C pendant 7 jours.</p>
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement des échantillons <ul style="list-style-type: none"> – Lait : méthode habituelle pour l'analyse bactériologique. – Fromage : <ul style="list-style-type: none"> – meule : prélever avec une sonde au milieu d'un rayon ; – plaquette, bloc : prélever une mince tranche sur toute la hauteur, incluant la croûte ; – morceau : couper et râper l'ensemble du morceau. • Préparation des échantillons <ul style="list-style-type: none"> – Lait : réchauffer le lait pendant 10 min à 25-30 °C et bien homogénéiser, les spores remontant avec la crème. – Fromage : broyer 1 min environ 10 g de fromage dans 90 mL d'eau citratée à 2 %, préalablement réchauffée à 35-40 °C. • Réalisation des dilutions <ul style="list-style-type: none"> – Lait : préparer les dilutions 10⁻¹ et 10⁻². – Fromage : préparer les dilutions jusqu'à 10⁻⁶. • Ensemencement et incubation <ul style="list-style-type: none"> – Régénérer avant ensemencement le milieu de culture 20 min au bain d'eau bouillante, puis le refroidir à 30 °C. L'inoculum dans chaque tube est de 1 mL. – Ensemencer les dilutions de lait 10⁰, 10⁻¹ et 10⁻² à raison de 5 tubes par dilution pour pouvoir déceler de faibles concentrations avec une précision suffisante. – Pour le fromage, ensemencer les dilution 10⁻² à 10⁻⁶ à raison de 3 tubes par dilution. – Couler 2 mL de paraffine stérile fondue à 60 °C. – Porter les tubes à 75 °C pendant 15 minutes, puis les refroidir sous un courant d'eau froide. Ce traitement thermique sélectionne les spores. – Incuber les tubes à 37 °C pendant 7 jours.

Lecture et interprétation	Observer chaque jour après 48 h d'incubation : les tubes positifs sont ceux qui présentent un décollement du bouchon de paraffine dû au dégagement gazeux.	
Expression des résultats	<ul style="list-style-type: none"> - Utiliser les tables du NPP pour 3 tubes et pour 5 tubes. - Déterminer le nombre de spores butyriques par mL de lait ou par gramme de fromage, en multipliant le coefficient NPP par l'inverse du taux de la dilution retenue la moins élevée (celle ayant la plus forte concentration en échantillon). - Exprimer le résultat par un nombre compris entre 1,0 et $9,9 \cdot 10^x$. 	
Composition du milieu	Milieu de Bryant-Burkey modifié par Bergère	Peptone de caséine 15 g Extrait de levure 5 g Extrait de viande 10 g Acétate de sodium 5 g L-cystéine chlorhydrate 0,5 g Lactate de sodium 5 g Eau 1 000 mL
	Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation à 120 °C pendant 20 min, il soit de 6,0 à 25 °C. Répartir en tubes de 16 mm x 160 mm à raison de 10 mL par tube.	

Dénombrement des levures et moisissures dans les épices et aromates

Norme AFNOR NF V 03-454 (décembre 1981)

Principe	Les levures et moisissures sont des microorganismes qui, après ensemencement en surface sur un milieu inhibiteur pour les bactéries aérobies (gélose OGA), forment des colonies après une incubation à 20 °C pendant 5 jours.
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation des milieux <ul style="list-style-type: none"> – Faire fondre le milieu de base et le refroidir à 45/48 °C. – Ajouter à 10 mL de milieu de base fondu 1 mL de la solution d'oxytétracycline. – Bien mélanger, et couler en boîtes de Petri. – Après solidification, sécher la surface du milieu à l'étuve à 55 °C, couvercle entrouvert, et laisser refroidir couvercle fermé. • Préparation de l'échantillon <p>La quantité d'échantillon pour laboratoire doit être suffisante pour les besoins de l'analyse. Réaliser une suspension mère au 1/10.</p> • Réalisation des dilutions <p>Préparer 2 tubes de dilution au 10^{-2} à partir de la suspension mère et préparer un tube de dilution au 10^{-3} à partir de chacun de ces tubes.</p> • Ensemencement et incubation <ul style="list-style-type: none"> – Suspension mère <ul style="list-style-type: none"> – Transférer à l'aide d'une pipette de 1 mL, à la surface de 4 boîtes de Petri contenant la gélose OGA, 0,1 mL de la suspension mère. – Répartir sur toute la surface du milieu à l'aide d'un étaleur en verre stérile. – Dilutions <ul style="list-style-type: none"> – Transférer à l'aide d'une nouvelle pipette de 1 mL à la surface de 2 boîtes de Petri contenant la gélose OGA, 0,1 mL prélevé après agitation du premier tube de dilution 10^{-2}. – Répartir sur toute la surface de la gélose à l'aide d'un étaleur en verre stérile. – Réaliser les mêmes opérations à partir du deuxième tube de dilution 10^{-2}, et de même à partir des tubes de la dilution 10^{-3}. – Incuber les boîtes retournées pendant 5 jours à 20-25 °C.
Lecture	<ul style="list-style-type: none"> – Après 48 h d'incubation, repérer chaque jour les colonies sur les boîtes. – Dénombrer les colonies de levures et de moisissures sur les boîtes présentant au total 10 à 100 colonies.
Expression des résultats	Exprimer le résultat par un nombre de levures et de moisissures compris entre 1,0 et $9,9 \cdot 10^x$ par gramme d'épice.

Composition du milieu	Gélose glucosée à l'oxytétracycline (OGA)	Milieu de base Extrait de levure déshydraté 5 g Glucose 20 g Agar 16 à 24 g Eau 1 000 mL
		Solution d'oxytétracycline à 0,1 %
<p>Répartir le milieu, soit en tubes de 20 mm x 200 mm, à raison de 20 mL par tube, soit en fioles de 150 mL, à raison de 100 mL par fiole. Stériliser à l'autoclave à 121 °C +/- 1 °C pendant 20 min.</p> <p>Au moment de l'utilisation :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Faire fondre le milieu de base et le refroidir à 45-48 °C. Ajouter à 10 mL de milieu de base fondu 1 mL de la solution d'oxytétracycline. - Mélanger, et couler en boîtes de Petri. - Laisser solidifier, puis sécher la surface du milieu à l'étuve à 55 °C, couvercle entrouvert, et laisser refroidir couvercle fermé. 		

CHAPITRE V

RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES RESPONSABLES DE TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES

1. Microorganismes responsables de toxi-infections alimentaires collectives

Une toxi-infection alimentaire (TIA) est définie comme un ensemble de dysfonctionnements de l'organisme résultant de l'ingestion d'un aliment contaminé par des microorganismes pathogènes. Elle est qualifiée de collective (TIAC) lorsque peuvent être observés deux cas au moins présentant la même symptomatologie et dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Le rôle de l'aliment dans la transmission des bactéries entéropathogènes est généralement actif. L'aliment est le siège d'une multiplication de l'agent pathogène, avec ou sans production de toxines. La contamination étant presque toujours paucimicrobienne, elle ne représente qu'un risque potentiel qui ne devient réel qu'après la multiplication microbienne dans l'aliment.

La plupart des agents responsables d'infections d'origine alimentaire présentent un tropisme intestinal. Ils sont capables d'adhérer à la membrane apicale des entérocytes. Les troubles observés sont à relier à la capacité de ces microorganismes de se multiplier dans les entérocytes (bactéries entéro-invasives) ou de sécréter une toxine perturbant le fonctionnement de l'entérocyte (bactéries entérotoxiques).

1.1. *Salmonella*

1.1.1. Classification et nomenclature

Au sein de la vaste famille des *Enterobacteriaceae*, le genre *Salmonella* est identifié en pratique courante par un ensemble de caractères biochimiques : absence d'ONPG hydrolase, d'uréase, de tryptophane, phénylalanine et lysine désaminases, réaction VP négative, présence d'une lysine et d'une ornithine décarboxylases, production d'H₂S (sauf exceptions).

Les travaux de Kauffmann et White, en débouchant sur l'élaboration d'une carte antigénique des *Salmonella*, ont conduit à les classer en 38 groupes antigéniques « O » (en fonction de la nature chimique de leurs antigènes pariétaux, en particulier du lipopolysaccharide (LPS), et à identifier plus de 2 800 sérotypes différents (en recherchant les antigènes flagellaires «H»).

Ces sérotypes ont eu le statut d'espèces. Un nom usuel (écrit alors en italique) leur a été attribué :

- parfois en fonction de la nature du syndrome associé à leur action : ainsi, *S. typhi*, *S. paratyphi* A, B et C sont les agents des fièvres typhoïde et paratyphoïdes ; *S. typhimurium* a été isolé pour la première fois de souris mortes d'un syndrome typhoïdique, *S. abortus ovis* a été mise en évidence à la suite de l'avortement d'une brebis...
- plus fréquemment, en relation avec le nom de la ville dans laquelle ils ont été isolés pour la première fois : *london*, *heidelberg*, *panama*, *dublin*, *montevideo*, *newport*...
- quelquefois, il s'agit du nom du microbiologiste l'ayant découverte (*wirchow*).

Les études génétiques évaluant la parenté génomique entre les souches (par dénaturation des ADN, étude des % de recombinaison et détermination de la stabilité thermique des recombinants) ont modifié ces données. Il a été établi que toutes les souches connues pouvaient être rassemblées en deux espèces : *S. enterica* et *S. bongori*. Au sein de l'espèce *enterica*, ces études génétiques ont permis d'individualiser six sous-espèces : *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) et *indica* (V).

Espèce	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
Sous-espèce	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gélatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Culture en KCN	-	-	-	-	+	-	+
d-tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutamyltransférase	+(1)	+	-	+	+	+	
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucates	+	+	+	- (70 %)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	- (75 %)	+(75%)	-	d	-
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Habitat	Animaux à sang chaud			Animaux à sang froid et environnement			

(1) Typhimurium et certaines souches du sérotype Dublin sont négatifs.
 + : 90 % ou plus de résultats positifs.
 - : 90 % ou plus de résultats négatifs.
 d : résultats différents suivant les sérovars de la sous-espèce considérée.

 Tableau 1 – Caractères distinctifs des espèces et sous-espèces de *Salmonella*

Selon les études du CNEVA, 98,5 % des souches isolées appartiennent à l'espèce *enterica subsp enterica* (I). La dénomination des différents sérotypes découle des indications du nouveau code de nomenclature. Ainsi, le sérotype Montevideo doit s'écrire : *Salmonella enterica subsp enterica* ser Montevideo. Les sérotypes n'ayant plus statut d'espèces ne s'écrivent plus en italique, la première lettre de leur nom est une majuscule. Cette dénomination posant, du fait de sa complexité, des problèmes en pratique courante, une nomenclature abrégée est admise pour les sérotypes de la sous-espèce *enterica*. Ainsi peut-on écrire : *Salmonella* ser Montevideo, voire *Salmonella* Montevideo. Les *Salmonella* correspondant aux autres sous-espèces ou à l'espèce *bongori* sont associées à leur formule antigénique.

REMARQUE

Nous avons adopté pour la nomenclature des *Salmonella* celle proposée par Le Minor et Popoff. Cependant, cette nomenclature est encore discutée.

1.1.2. *Salmonella* et toxi-infections alimentaires

Les salmonelloses peuvent être classées en deux catégories :

- les fièvres typhoïde et paratyphoïdes, dues à des sérovars strictement humains : *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi* A, et, à un degré moindre, *S. Paratyphi* B.

La transmission est essentiellement interhumaine et se fait par l'eau et les aliments souillés ;

- les toxi-infections alimentaires et gastro-entérites du nourrisson, dues à des sérovars ubiquitaires, donc pouvant transiter chez l'homme et chez l'animal. C'est cet aspect de la pathologie des *Salmonella* que nous développons, bien que les aliments puissent être aussi incriminés dans les salmonelloses « majeures ».

1.1.2.1. Symptomatologie des salmonelloses

La fièvre typhoïde associée, en période d'état, la diarrhée, des taches cutanées rosées et lenticulaires, une fièvre en plateau à 40 °C, (le *tuphos*). Des complications sont possibles avec hémorragies et perforations intestinales.

Les gastro-entérites à *Salmonella* donnent une symptomatologie beaucoup moins grave que les fièvres typhoïdes. Les signes cliniques apparaissent généralement 24 à 48 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé. Céphalées, frissons, douleurs abdominales sont rapidement associés à de la fièvre et de la diarrhée, parfois des vomissements. La guérison est de règle, en général en quelques jours. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, les vieillards et les enfants, la maladie peut se compliquer par une septicémie. Ce phénomène est aussi observé, chez des sujets présentant une immunité normale, avec des souches dont le pouvoir pathogène est exceptionnellement élevé ; il est alors à relier à l'acquisition d'un plasmide.

1.1.2.2. Épidémiologie

• Incidence

Dans les pays industrialisés, le nombre de salmonelloses dues aux sérotypes strictement humains (fièvres typhoïde et paratyphoïdes) diminue régulièrement. La plupart des cas sont, aujourd'hui, importés des pays à forte endémicité. Au contraire, le nombre des toxi-infections dues aux sérotypes ubiquitaires est en augmentation régulière.

Selon les déclarations recueillies par les DDASS et les DSV, les *Salmonella* furent responsables, en 1994, de 68 % des foyers de TIAC pour lesquels un agent causal avait été identifié.

La plupart des souches isolées appartiennent aux groupes O : 4, O : 7, O : 8, O : 9, O : 3,10, O : 1,3,19 et O : 13. La majorité des TIAC à *Salmonella* est due à un petit nombre de sérotypes dont l'incidence annuelle présente d'importantes et imprévisibles fluctuations. Certains sérotypes sont permanents : Typhimurium (14 % des salmonelloses en 1994), Enteritidis (65 % en 1993). D'autres sérotypes (récemment *S. Virchow*, *S. Newport*, *S. Derby*) émergent puis régressent, leur évolution chez l'animal précédant leur apparition en pathologie humaine.

• Réservoir

Le réservoir de *Salmonella* ubiquitaires est essentiellement animal. La plupart des animaux d'élevage peuvent héberger des *Salmonella* dans leur tube digestif :

- soit du fait d'une maladie dont les signes cliniques sont aisément repérables (entérite, avortement), c'est le cas des bovins, des ovins et du cheval, quelquefois des volailles ;
- soit du fait d'un portage asymptomatique, c'est le cas des volailles et du porc. Ce portage se traduit par une excrétion intermittente des *Salmonella* présentes dans le tube digestif, mais aussi par leur présence possible dans les monocytes et les macrophages de l'animal.

Les déjections de ces animaux souillent l'environnement, contaminent leur eau de boisson et leurs aliments. Ainsi se développent, dans les élevages intensifs, des épidémies dont le sérovar responsable apparaît souvent, avec un certain décalage, en pathologie humaine.

Le réservoir humain est constitué par les porteurs sains et les malades. Son rôle n'est pas négligeable car les contaminations d'aliments sont souvent le fait de leur manipulation par des porteurs sains asymptomatiques.

• Nature des aliments contaminés

Toutes les denrées animales peuvent être vectrices de salmonelloses. Cependant, les œufs et les ovoproduits jouent un rôle prédominant puisqu'ils furent à l'origine de 35 % des TIAC à *Salmonella* en 1993. Les autres aliments mis en cause sont les viandes et les volailles (18 %), les poissons et les fruits de mer (13 %), le lait et les produits laitiers (10,3 %), les produits mixtes (20 %).

• Modalités de la transmission à l'Homme

La contamination des aliments est, directement ou indirectement, liée à un contact avec les excréments d'animaux, ou à un milieu souillé par ces matières. Elle peut être aussi le fait de porteurs sains humains : 5 % de la population héberge des *Salmonella* dans les voies biliaires et les élimine dans ses matières fécales. Elle est paucimicrobienne : seule une multiplication des *Salmonella* dans l'aliment peut être à l'origine d'une diarrhée aiguë. Cette multiplication se produit à l'occasion de fautes commises sur la chaîne alimentaire, en général une rupture de la chaîne du froid.

Les sujets dont l'acidité gastrique est réduite (très jeune enfant, vieillard, sujets gastrectomisés) sont plus réceptifs ; les salmonelles franchissent alors plus facilement l'estomac et de très faibles doses peuvent être suffisantes.

Des toxi-infections causées par l'ingestion de très faibles doses de *Salmonella* ont aussi été signalées chez des sujets présentant une activité gastrique normale. Ce phénomène reste exceptionnel et s'explique par la nature de l'aliment qui permet de protéger la bactérie lors de la traversée de l'estomac (aliments riches en lipides, par exemple).

1.1.2.3. Mécanismes physiopathologiques

L'invasion de la muqueuse intestinale par les *Salmonella* requiert l'adhésion des bactéries à des récepteurs cellulaires spécifiques. Un des sites de l'adhésion est le récepteur cellulaire à l'EGF (*epithelial growth factor*). La fixation des *Salmonella* sur ce récepteur active une protéine-kinase, la phosphorylase A2, et déclenche ainsi une série de réactions aboutissant au remaniement du cytosquelette. On note le gonflement des microvillosités, une vacuole d'endocytose se forme, les *Salmonella* s'y multiplient. La vacuole migre vers la membrane latérobasale et est expulsée de la cellule. Les bactéries sont prises en charge par les macrophages des follicules lymphoïdes et des ganglions mésentériques. Si elles sont éliminées, l'infection reste localisée et n'atteint pas le stade de la septicémie (coproculture positive et hémoculture négative). Dans le cas inverse, les *Salmonella* sont déversées dans le sang et sont responsables d'un épisode septicémique (coproculture et hémoculture positives).

1.2. *Shigella*

1.2.1. Classification et nomenclature

Les *Shigella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Génétiquement, ce sont des *E. coli* « dégénérés ». Leur identification est fortement orientée par leur immobilité et par leur inertie biochimique. Ils ne fermentent pas le lactose, ne possèdent ni uréase, ni TDA, ni LDC, ne produisent pas d'H₂S, d'acétoïne, ne se développent pas sur le milieu au citrate de Simmons, sont agazogènes. Les quelques caractères positifs varient selon les espèces et permettent de les identifier (Tableau 2).

	ONPG hydrolase	Mannitol	Indole	ODC	Dulcitol	Xylose	Rhamnose
<i>Shigella dysenteriae</i>	– ou +	–	d	–	– ou +	d	d
<i>Shigella flexneri</i>	–	+ ou –	d	–	– ou +	– ou +	d
<i>Shigella boydii</i>	–	+	d	+ ou –	– ou +	d	– ou +
<i>Shigella sonnei</i>	d	+	–	+	–	–	+

+ : 90 % ou plus de résultats positifs.
 – : 90 % ou plus de résultats négatifs.
 d : résultats différents suivant les sérovars de la sous-espèce considérée.

Tableau 2 – Caractères distinctifs des *Shigella*

L'identification des espèces peut être facilitée en faisant appel aux immunsérums commercialisés.

1.2.2. *Shigella* et toxi-infections alimentaires

1.2.2.1. Symptomatologie des shigelloses

Shigella dysenteriae est responsable de la dysenterie bacillaire, colite infectieuse se manifestant, en phase aiguë, par l'émission de selles afécales, souvent glaireuses et sanglantes, très fréquentes. La maladie s'accompagne de fièvre et de fortes douleurs abdominales. C'est la forme la plus sévère des shigelloses, qui peut faire l'objet de complications sous la forme d'un syndrome hémolytique et urémique. Elle sévit essentiellement dans les zones surpeuplées dont l'hygiène est précaire.

Les autres shigelloses ne présentent pas le même caractère de gravité. Les aspects cliniques sont identiques mais atténués, la maladie est beaucoup plus bénigne.

1.2.2.2. Épidémiologie

Les *Shigella* sont responsables de 100 000 cas d'infections intestinales dans le monde. En France, les shigelloses représentent 1 % de ces infections (contre 23 % en Asie).

- **Réservoir**

Il est strictement humain.

- **Nature des aliments contaminés et modalités de la transmission à l'Homme**

La contamination est réalisée par l'eau et les aliments contaminés par les selles de porteurs sains ou par de l'eau souillée. Le réservoir étant strictement humain, la contamination est exclusivement oro-fécale. La dose infectante est très faible, de l'ordre de 10 à 100 bactéries.

1.2.2.3. Mécanismes physiopathologiques

Les *Shigella* possèdent la propriété d'adhérer à la muqueuse intestinale et de provoquer leur internalisation. Ce sont des bactéries invasives qui se multiplient au sein des entérocytes et perturbent leur fonctionnement. L'invasion reste limitée à la couche superficielle de l'épithélium colique, du fait d'une forte réaction inflammatoire responsable de l'élimination des bactéries mais aussi d'ulcérations et de micro-abcès. La gravité de l'infection à *Shigella dysenteriae* peut être expliquée par la production d'une toxine protéique cytolitique (toxine de Shiga), qui contribue à la destruction de la muqueuse.

1.3. *Escherichia coli*

1.3.1. Classification et nomenclature

Au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*, l'espèce *Escherichia coli* est identifiée en pratique courante par les caractères lactose+, indole+, uréase–, H₂S–, TDA–, VP– et LDC+ (sauf exceptions). Certaines souches immobiles et agazogènes, parfois lactose–, ONPG hydrolase–, ont un profil biochimique proche de celui des *Shigella*.

Les différentes souches d'*Escherichia coli* sont identifiées avec précision en fonction de leurs caractères antigéniques :

- la nature de leurs antigènes somatiques O permet de les classer en sérogroupes : on en connaît 171 différents ;
- les antigènes protéiques F constituant les pili sont également des éléments d'identification intéressants des souches entéropathogènes (et uropathogènes) car ils correspondent aux structures d'adhésion aux entérocytes (ou à l'épithélium rénal). Les antigènes F1, spécifiques de nombreux récepteurs membranaires comprenant du mannose, sont communs à d'autres entérobactéries. Les polysides de surface des érythrocytes contenant du mannose, les souches F1, ont des propriétés hémagglutinantes et sont identifiables par cette propriété. Les autres antigènes F (F2 à F13) sont des structures d'adhésion mannose indépendantes et sont spécifiques de récepteurs portés par un seul type de cellules ;
- les antigènes polyosidiques d'enveloppe K sont de type L, A ou B. On connaît 80 antigènes K de type L, de spécificité différente. Enfin, la détermination précise d'*Escherichia coli* peut faire appel aux antigènes flagellaires H dont 56 ont été identifiés.

Les souches responsables d'épidémies sont caractérisées par une formule rassemblant l'ensemble des caractères antigéniques qui sont déterminés dans des laboratoires spécialisés.

1.3.2. *Escherichia coli* et infections intestinales

Escherichia coli constitue la bactérie aéro-anaérobie la mieux représentée dans la flore commensale du côlon. La plupart des souches sont donc dépourvues de pouvoir entéropathogène. Les infections intestinales à *E. coli* sont dues à certains sérotypes disposant de plasmides leur conférant leurs propriétés entéropathogènes. Elles sont réparties en cinq pathovars principaux.

1.3.2.1. Les EIEC (*Escherichia coli* entéro-invasifs)

Ce sont des souches possédant des facteurs de virulence voisins de ceux identifiés chez les *Shigella*. Elles sont responsables (comme les *Shigella*) de diarrhées sanglantes et purulentes, d'aspect dysentérique, avec fièvre. La dose minimale infectante est voisine de 10^8 bactéries. La maladie, peu fréquente en Europe, touche principalement l'Asie du Sud-Est et l'Amérique du Sud intertropicale.

1.3.2.2. Les ETEC (*Escherichia coli* entérotoxiques)

Transmis par l'eau et les aliments contaminés, ils sont responsables de la turista (diarrhée du voyageur) et représentent la principale cause de diarrhée dans les pays en voie de développement. Le mécanisme du pouvoir pathogène est bien connu et peut être décomposé en quatre étapes :

- ① les ETEC se fixent aux entérocytes par leurs antigènes F (pili F2 et F3, encore appelés facteurs de colonisation ou CFA : Colonisation Factor Antigen). L'adhésion est mannose dépendante, les ETEC ont donc des propriétés hémagglutinantes ;
- ② la fixation à l'entérocyte provoque la libération de deux types de toxines (les toxines thermolabiles LT1 et LT2 et la toxine thermostable ST). La toxine LT se fixe par sa sous-unité B sur un récepteur spécifique de nature gangliosidique ;
- ③ la fixation de la sous-unité B crée les conditions de la pénétration de la sous-unité A dans l'entérocyte ;
- ④ la sous-unité A exerce son action en stimulant l'adényl-cyclase, donc la production d'AMPc, et par voie de conséquence la sécrétion de l'eau et des ions minéraux.

La toxine ST agit par un mécanisme voisin en stimulant la production de GMPc.

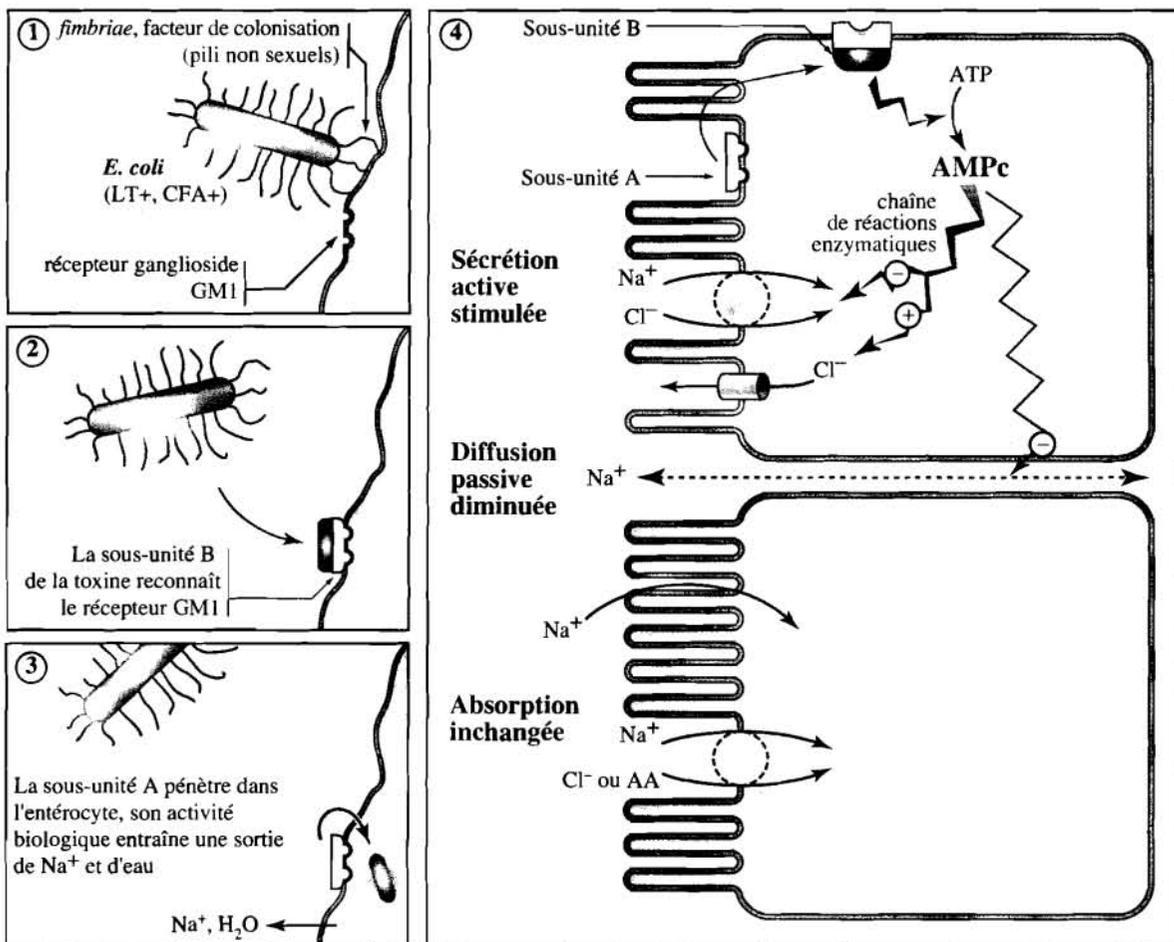


Fig. 1 – Mécanisme physiopathologique des diarrhées engendrées par les ETEC

1.3.2.3. Les EHEC (*Escherichia coli* entérohémorragiques)

Ils correspondent à quelques sérotypes particuliers, le plus fréquent étant O157 : H7.

Transmis principalement par la viande contaminée, ils sont responsables d'une diarrhée sanglante, non purulente et non fébrile (donc d'aspect différent des diarrhées dues aux EIEC et aux EPEC). La diarrhée est souvent associée, chez les jeunes enfants et les personnes âgées, à un syndrome hémolytique avec insuffisance rénale. Leur incidence est élevée aux États-Unis et, récemment, au Japon, où les EHEC ont été mis en cause de janvier à août 1996 dans plus de 10 000 cas de toxi-infections et ont été responsables de 11 décès.

Leur pouvoir pathogène est caractérisé par leur capacité à adhérer aux entérocytes de l'iléon distal et à sécréter une toxine *Shigella-like* (encore appelée vérotoxine du fait de son action sur les cellules Véro en culture).

1.3.2.4. Les EPEC (*Escherichia coli* entéro-pathogènes)

Jadis responsables d'épidémies dans les crèches et les services de pédiatrie, les diarrhées à EPEC ont pratiquement disparu aujourd'hui en Europe. Les EPEC restent responsables d'infections intestinales dans les pays en voie de développement. La diarrhée est aqueuse, non purulente, non sanguinolente, avec un mucus abondant. Elle s'accompagne fréquemment de fièvre et de vomissements.

Le pouvoir pathogène des EPEC est conditionné par un facteur d'adhésion aux entérocytes : l'EAF (EPEC *Adherence Factor*). Les EPEC s'attachent à la bordure en brosse des microvillosités sur laquelle ils forment des microcolonies du fait de l'agrégation de leurs cellules par leurs pili. Cette adhésion est suivie par un effacement des microvillosités sous l'action d'une protéine : l'intimine. L'aspect et les contours de la membrane entérocytaire sont donc profondément modifiés.

1.3.2.5. Les *Escherichia coli* entéroagrégatifs

Proches des EPEC, ils s'en distinguent par la persistance de la diarrhée et la sécrétion d'une entérotoxine thermostable différente de la toxine LT des ETEC.

1.4. *Yersinia*

1.4.1. Classification et nomenclature

Au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*, le genre *Yersinia* est identifié en pratique courante par l'observation de bacilles de petite taille dont la mobilité dépend de la température (+ à 25 °C, – à 37 °C), qui forment de petites colonies translucides (moins de 1mm de diamètre), lactose–, ONPG+, uréase+, agazogènes.

Le genre *Yersinia* comprend plusieurs espèces dont trois sont pathogènes : *Yersinia pestis*, agent de la peste, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica* responsables de symptômes voisins mais dont l'origine alimentaire n'est démontrée et admise que pour *Yersinia enterocolitica*.

L'identification est conduite à partir du milieu d'isolement sélectif (milieu CIN). Les problèmes de diagnostic différentiel ne se posent guère qu'entre les *Yersinia* pathogènes et *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Providencia rettgeri* qui peuvent donner des colonies d'aspect voisin, bien que de taille en général plus importante. Dans ces conditions, *Yersinia enterocolitica* peut être identifiée selon les indications du tableau ci-dessous :

	Uréase	H ₂ S	TDA	Saccharose	Mannitol
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	–	–	+	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	+	–	–	–	+
<i>Serratia</i>	–	–	–	+	+
<i>Enterobacter</i>	–	–	–	+	+
<i>Citrobacter</i>	–	Variable	–	Variable	+
<i>Providencia rettgeri</i>	+	–	+	Variable	Variable

Tableau 3 – Caractères d'identification de l'espèce *Yersinia enterocolitica*

Seule l'espèce *Yersinia enterocolitica* est impliquée dans des infections intestinales d'origine alimentaire. Il a été décrit, pour cette espèce, 36 antigènes somatiques O et 19 antigènes flagellaires, permettant d'identifier 60 sérotypes (seul l'antigène O est, en général, mentionné). Il existe également plusieurs biogroupes de *Yersinia enterocolitica*.

Biogroupes	1A	1B	2	3	3A	3B	4	5
Lipase	+	+	-	-	-	-	-	-
Esculine	+/-	-	-	-	-	+	-	-
Indole	+	+	+	-	-	-	-	-
D xylose	+	+	+	+	+	+	-	+/-
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	-
ODC	+	+	+	+	-	-	+	+
VP	+	+	+	+	-	-	+	+
Pyrazinamidase	+	-	-	-	+	+	-	-
Inositol	+	+	+	+	+/-	-	+	+
Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	+	+	-

Tableau 4 – Caractères d'identification des biogroupes de *Yersinia enterocolitica*

1.4.2. *Yersinia enterocolitica* et infections intestinales

1.4.2.1. Symptomatologie

Les yersiniose peuvent présenter un ou plusieurs des tableaux cliniques suivants :

- entérocolite : diarrhée invasive, glairo-sanglante, avec une fièvre modérée et des douleurs coliques. Elle survient à tout âge mais prédomine chez le jeune enfant.
- adénite mésentérique : elle donne un syndrome pseudo-appendiculaire avec douleur à la fosse iliaque droite, diarrhée et fièvre.
- septicémie : elle survient, généralement, sur des terrains particuliers : diabète, thalassémie, surcharge ferrique.

1.4.2.2. Épidémiologie

Yersinia enterocolitica est un germe tellurique et peut, de ce fait, contaminer un grand nombre d'aliments. Consommés crus et insuffisamment lavés, les légumes constituent la principale source de contamination chez l'homme (par ordre décroissant : la carotte, la tomate, les salades et les betteraves). Parmi les aliments d'origine animale, le lait et ses dérivés (crème, glace, pâtisserie, mais non le fromage) contiennent fréquemment *Yersinia enterocolitica*. Les viandes et charcuteries contaminées par l'environnement ou par des porteurs peuvent également véhiculer *Yersinia enterocolitica*.

Bien que *Yersinia enterocolitica* soit connue depuis longtemps, les toxi-infections dont elle est responsable sont d'apparition récente. En 1963, au Danemark, la première souche est isolée de selles humaines diarrhéiques. La France est touchée à partir de 1967. Depuis cette date, le nombre de cas croît exponentiellement.

Cette progression peut s'expliquer :

- par la généralisation de la pratique de la réfrigération. *Y. enterocolitica* est une bactérie psychrotrophe, sa croissance est seulement ralentie à + 4 °C, alors que celle de la plupart des autres bactéries pathogènes est arrêtée ;
- par l'évolution de nos habitudes alimentaires, en particulier l'augmentation de la consommation de légumes crus tant en restauration familiale que scolaire ou collective. Or, nous l'avons vu, ce sont les aliments les plus fréquemment contaminés par *Y. enterocolitica*.

On considère aujourd'hui que les souches devraient, pour acquérir un pouvoir entéropathogène, avoir déjà parasité l'homme sous forme d'une infection non intestinale. Ainsi, il existe des souches adaptées qui sont entéropathogènes et des souches en voie d'adaptation. Cela explique que seuls certains sérotypes soient incriminés dans des diarrhées aiguës (03 et 09) et que de nouveaux sérotypes entéropathogènes soient régulièrement découverts (05, 08, 013).

1.4.2.3. Mécanismes physiopathologiques

Les *Yersinia* pénètrent au niveau des cellules M recouvrant les plaques de Peyer. Leur internalisation est liée à l'action d'une invasine capable de se lier aux β -intégrines cellulaires. Il en résulte une modification du cytosquelette permettant la pénétration de *Yersinia*. Les entérocytes sont détruits par l'action d'une série de protéines codées par un plasmide de virulence. Habituellement, les *Yersinia* sont éliminées par la réaction inflammatoire : l'infection s'arrête à ce stade et s'installe alors une entérocolite lésionnelle avec atteinte des plaques de Peyer. Plus rarement, l'infection s'étend, gagne les formations lymphoïdes et donne une adénite mésentérique. À partir des ganglions, *Yersinia enterocolitica* peut gagner le sang et engendrer des formes septicémiques.

1.5. Vibrionaceae et Aeromonadaceae

1.5.1. Classification et nomenclature

Ces bactéries correspondent à l'ancienne famille des *Vibrionaceae*, définie par Véron en 1965. Ce sont des bacilles Gram-, droits ou incurvés, cultivant bien sur les milieux ordinaires, non sporulants, aéro-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose et oxydase+.

Parmi les bacilles Gram négatif non exigeants, ces bactéries se distinguent des *Pseudomonas* et genres apparentés par leur type respiratoire (les *Pseudomonas* sont aérobies stricts) et des entérobactéries par leur caractère oxydase +.

Au sein des familles des *Vibrionaceae* et des *Aeromonadaceae*, trois genres comprennent des bactéries entéropathogènes, les genres *Vibrio*, *Aeromonas* et *Plesiomonas* dont les critères d'identification sont présentés dans le tableau ci-dessous.

	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>
Flagelle polaire engainé	+	-	-
Oxydase	+	+	+
Voie d'attaque du glucose	F	F	F
Gaz en glucose	-	V	-
LDC	+	V	+
ODC	V	-	+
ADH	-	+	+
Mannitol	+	+	-
Sensibilité au composé vibriostatique	+	-	V
Halophilie	+ (1)	-	-

(1) sauf *V. nereis*, *V. anguillarum* biovar II, *V. costicola*

Tableau 5 – Caractères différentiels des genres *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*

Seule une étude biochimique détaillée permet de différencier de façon précise les espèces constituant le genre *Vibrio*. On utilise les critères fournis par le tableau de caractères suivant :

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. carcharia</i>	<i>V. vulnificus</i>
ONPG	+	-	-	V	V	V	-	-	V
Oxydase	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Croissance en absence de NaCl	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Croissance avec 1 % de NaCl	+	+	+	-	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	V	V	-	-	+	+
ODC	+	+	V	-	-	-	-	-	V
ADH	-	-	-	V	+	+	-	-	-
Uréase	-	V	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	V	-	-	V	+	+	+
VP	V	-	+	V	+	-	-	V	-
Gaz en glucose	-	-	-	-	V	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	-	+	-	V	V
Saccharose	+	-	-	+	-	+	-	V	V
Arabinose	-	V	V	-	-	+	+	-	-

V : variable selon les souches.

Tableau 6 – Critères d'identification des *Vibrio*

1.5.2. Vibrions et infections d'origine alimentaire

Les espèces, appartenant au genre *Vibrio*, dont le pouvoir entéropathogène est reconnu sont : *Vibrio cholerae* O1 et O139, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio hollisae*. Parmi les genres, *Aeromonas* et *Plesiomonas*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas caviae*, *Plesiomonas shigelloides* peuvent être impliqués, bien que rarement, dans des toxi-infections alimentaires.

1.5.2.1. *Vibrio cholerae*

- *Vibrio cholerae* O1

Ils correspondent aux vibriens agglutinés dans le sérum O1 et représentent l'agent du choléra. On distingue classiquement deux biotypes : *Vibrio cholerae cholerae* et *el tor*.

Le choléra est une affection strictement humaine, à transmission essentiellement interhumaine par les vomissements, les selles des malades, les eaux et les aliments contaminés. Il se manifeste, sous sa forme la plus grave, par une diarrhée profuse devenant assez rapidement aqueuse, associée à des vomissements, de vives douleurs abdominales et une déshydratation intense des malades. La maladie peut évoluer de façon moins alarmante : diarrhée simple, ou même infection bénigne asymptomatique.

Vibrio cholerae O1 agit principalement par la production, au niveau de l'entérocyte, de deux entérotoxines (toxines LT thermolabile et ST thermostable). La nature de ces toxines et leur mécanisme d'action sont voisins de ceux décrits précédemment pour les ETEC.

La dose infectante est de 10^8 à 10^9 bactéries ; elle peut être moins importante dans tous les cas où l'acidité gastrique est diminuée : vieillards, nourrissons, sujets en état de dénutrition... Associée à de l'hydrogencarbonate, une dose de 10^3 bactéries s'est avérée suffisante pour déclencher un choléra chez des volontaires. 597 000 cas de choléra ont été déclarés dans le monde en 1991 ; ils touchent principalement l'Amérique du Sud (391 190 cas), l'Afrique (153 367 cas) et l'Asie du Sud-Est. L'Europe est peu touchée (316 cas dont 270 en Roumanie et 46 en Russie) ; les seuls cas de choléra déclarés en Europe occidentale sont importés de pays à forte endémie.

- *Vibrio cholerae non O1*

Des cas de choléra ou de syndromes voisins dus à des souches de *Vibrio cholerae non O1* (O2 à O139) ont été récemment signalés, leur incidence est en progression. Ces bactéries, contrairement aux souches O1, sont fréquemment isolées de l'environnement, en particulier de l'eau de mer, ainsi que de divers produits de la mer. Ils ont été quelquefois isolés de la flore intestinale humaine. Une épidémie imputée à *Vibrio cholerae* O139 a été constatée au Bangladesh, où il a causé le décès de 25,8 % des malades. Cependant, ces bactéries sont, plus fréquemment, mises en cause dans des diarrhées aiguës de type entéro-invasif avec présence de sang et de pus dans les selles.

- *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus fait partie de la flore des eaux côtières et des animaux marins : mollusques bivalves, poissons, crustacés. Il est mis en cause dans des cas de gastro-entérites consécutives à l'ingestion de produits de la mer contaminés, crus ou peu cuits. Très sensible à l'action de la température, il ne peut être transmis que par des aliments dont le degré de cuisson est insuffisant. C'est un des agents les plus fréquents de toxi-infections au Japon (du fait, probablement, des traditions culinaires de ce pays). Les toxi-infections à *Vibrio parahaemolyticus* ont une incidence non négligeable dans tous les pays de l'Asie du Sud-Est et en Afrique. Elles sont moins fréquentes en Europe.

La diarrhée est aqueuse, elle peut être associée à des vomissements et à une fièvre modérée.

Parmi les souches de *Vibrio parahaemolyticus*, certaines semblent être beaucoup plus entéropathogènes que d'autres. Elles sont identifiées par leur aptitude à hémolyser les hématies humaines et celles de lapin sur un milieu particulier : le milieu de Wagatsuma. La production de cette hémolysine est démontrée pour 95 % des souches isolées de toxi-infections, elle est corrélée avec la production d'une toxine de type cholérique (ou ETEC) LT.

1.5.2.2. Autres vibriens entéropathogènes

Vibrio mimicus (qui est, par ses caractères phénotypiques, un variant de *Vibrio cholerae*, et peut être recherché avec les *V. cholerae non O1*), *Vibrio fluvialis* et *Vibrio hollisae* ont été mis en cause dans des gastro-entérites entéro-invasives. Leur incidence est nettement moindre que celle des vibriens étudiés précédemment.

1.6. *Campylobacter*

1.6.1. Place dans la classification

De forme incurvée et mobiles par ciliation polaire, ces bactéries furent classées, dans un premier temps, avec les vibriens. En fait, elles diffèrent des vibriens par leurs caractères métaboliques (elles ne fermentent pas les glucides et sont micro-aérophiles) et par leur G + C % qui est compris entre 29 et 35 %. C'est pourquoi, Sebald et Véron proposèrent de les classer dans un genre nouveau : *Campylobacter*, inclus aujourd'hui, avec les genres *Helicobacter* et *Arcobacter*, dans le groupe des « bacilles à Gram-, aérobies ou micro-aérophiles, mobiles, de forme hélicoïdale, vibroïde » au sein de la famille des *Campylobacteraceae*. Quinze espèces et sous-espèces sont répertoriées.

1.6.2. *Campylobacter* et toxi-infections alimentaires

Deux espèces sont concernées : *C. jejuni* et *C. coli*, la première étant de loin la plus fréquente et représentant 99 % des campylobactérioses. *C. jejuni* est actuellement reconnu comme la cause la plus fréquente de diarrhée dans le

monde. Aux États-Unis et en Grande-Bretagne, *C. jejuni* est isolé, tous âges confondus, deux fois plus fréquemment que *Salmonella* et 4,5 fois plus que *Shigella*, dans les établissements qui en pratiquent systématiquement la recherche sur les selles diarrhéiques. Sur 21 pays disposant d'un réseau de surveillance, 12 isolent plus fréquemment *Campylobacter* que *Salmonella*.

1.6.2.1. Symptomatologie des campylobactérioses

L'infection à *C. jejuni* est moins alarmante que celle à *Salmonella*. Après une période d'incubation de 2 à 5 jours, elle se manifeste par une diarrhée aiguë et aqueuse, sanglante dans la moitié des cas, avec fièvre et douleurs abdominales. Le retour à la normale s'effectue en 5 à 7 jours. Les complications sont rares : selon une étude conduite aux États-Unis pendant la période 1982-1989, les infections intestinales à *Campylobacter* sont associées à un épisode septicémique dans 0,3 % des cas seulement (pour comparaison : 3 % avec les *Salmonella* dans la même étude).

Les cas de décès sont exceptionnels. Les infections asymptomatiques sont nombreuses.

1.6.2.2. Épidémiologie

• Nature des aliments contaminés

C. jejuni est responsable d'épidémies (assez peu fréquentes) qui sont presque toujours dues à l'ingestion de lait cru ou à l'absorption d'eau non potable. Les mêmes sérotypes ont pu être isolés des selles des malades et du lait et de la flore intestinale des vaches ayant produit le lait incriminé. Dans la plupart des cas, *C. jejuni* est la cause d'infections sporadiques à caractère familial qui ont pu être reliées à l'ingestion de volailles (poulet essentiellement) mal cuites (cuisson type barbecue) ou recontaminées après cuisson, ou encore de viandes peu cuites. Le rôle de la volaille a pu être affirmé, comme pour le lait cru, par la concordance des sérotypes isolés des selles de malades et des carcasses contaminées.

• Le réservoir

On trouve *C. jejuni* :

- presque constamment dans la flore intestinale (en particulier dans le *caecum*) des volailles et de nombreuses espèces d'oiseaux, en concentration de 10^6 à 10^7 /g, sans que ces animaux ne présentent de pathologie observable ;
- fréquemment dans l'intestin d'animaux d'élevage (bovins, caprins) et de compagnie (chiens, chats).

Le réservoir de *C. coli* est l'intestin du porc.

• Modalités de la transmission à l'homme

Les carcasses de volailles sont, le plus souvent, contaminées par le contenu intestinal de l'animal lors de son éviscération. Les concentrations microbiennes sont généralement de 10^5 à 10^6 microorganismes par gramme de viande. *C. jejuni* résiste mal à la dessiccation et à l'exposition à l'air (il est micro-aérophile). Il est détruit par la cuisson et ne se multiplie pas dans l'aliment (contrairement aux autres agents de TIA). Ceci explique que seuls des aliments assez fortement contaminés ($> 10^3$ /g) et soumis à une cuisson insuffisante (poulet) ou consommés crus (lait, viande) puissent être à l'origine de campylobactérioses. Cependant, la dose infectante peut être faible (quelques centaines de bactéries), d'où la fréquence des infections.

1.7. *Listeria*

1.7.1. Classification et nomenclature

Les *Listeria* sont de petits coccobacilles Gram +, isolés ou en courtes chaînettes, mobiles à 20-25 °C par quelques flagelles péritriches, asporulés, aéro-anaérobies facultatifs, catalase+, oxydase-.

Observée pour la première fois en 1926, *Listeria monocytogenes* fut, jusqu'en 1948, la seule espèce décrite. On a identifié, aujourd'hui, par hybridation ADN/ADN et séquençage des ARN 16S, six espèces (l'espèce *denitrificans* étant considérée comme un nouveau genre, le genre *Jonesia*). Ces espèces sont distinguées par les caractères suivants :

	Hémolyse	Camp-test <i>S. aureus</i>	Camp-test <i>R. equi</i>	Ribose	D-xylose	L-rhamnose	D-mannitol	α-méthyl-D mannoside
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	-	V	-	+
<i>L. ivanovii</i>								
<i>subsp ivanovii</i>	++	-	+	-	+	-	-	-
<i>subsp londoniensis</i>	++	-	+	+	+	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-	-	+	nd
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	-	+	-	-	V
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	-	+	V	-	+

V : variable nd : non déterminé

Tableau 7 – Caractères différentiels des 6 espèces de *Listeria*

Parmi ces six espèces, deux seulement sont pathogènes : *Listeria monocytogenes* (homme et animaux) et *Listeria ivanovii* (caprins et bovins). Les souches de *Listeria* isolées dans les produits alimentaires appartiennent, par ordre décroissant, aux espèces : *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* et *L. ivanovii*.

1.7.2. *Listeria* et toxi-infections alimentaires

1.7.2.1. Symptomatologie des listérioses

La listériose humaine est due, de façon exclusive, à *Listeria monocytogenes*.

• La listériose fœto-maternelle

Bénigne chez la mère (pharyngite, fièvre, myalgies), la listériose est une affection grave pour le fœtus. L'infection par *Listeria monocytogenes* peut entraîner l'avortement si elle se développe avant le 3^e trimestre de la grossesse. Après ce stade, un accouchement prématuré est observé et l'infection peut prendre une des deux formes suivantes :

- une forme septicémique précoce (dans les premiers jours de la vie), associée fréquemment à une méningite, avec 20 à 50 % de mortalité et des séquelles neurologiques fréquentes ;
- une forme méningée plus tardive qui est de meilleur pronostic.

• La listériose de l'adulte

Elle atteint, le plus souvent, les personnes âgées ou immunodéprimées. Cependant, 30 à 50 % des malades ne sont pas immunodéprimés. La maladie se présente généralement sous la forme d'une méningite, plus rarement d'une encéphalite ou d'abcès cérébraux isolés. On connaît des formes localisées, oculaires et cutanées, ainsi que des formes inapparentes ou pseudogrippales.

1.7.2.2. Épidémiologie

• Incidence

La listériose est une maladie peu fréquente (elle représentait, en 1986, 14,7 cas par million d'habitants en France), mais grave (le taux de mortalité varie entre 25 et 30 %).

• Réservoir

Les *Listeria* sont des bactéries ubiquitaires, très répandues dans l'environnement (sol, végétaux, eaux de rivière, eaux d'égout, eaux salées). Elles persistent en effet plusieurs années à + 4 °C dans le milieu extérieur. On considère aujourd'hui que leur réservoir est essentiellement terrestre. Ce sont aussi des hôtes des êtres vivants : *Listeria monocytogenes* a été isolée d'une cinquantaine d'animaux, qu'il s'agisse d'une infection ou d'un portage intestinal. Ce portage existe aussi chez l'homme ; il est plus important au sein du personnel des abattoirs.

• Nature des aliments contaminés

De nombreux aliments sont fréquemment contaminés. Selon différentes études, *Listeria monocytogenes* contaminerait 86 % des viandes fraîches, 45 % des laits crus, 32 % des produits de charcuterie crue, 21 % des légumes, 10 % des fromages, 2,5 % des produits laitiers. On a également retrouvé *L. monocytogenes* dans les produits de la mer, les salades et les champignons.

La pasteurisation du lait ramène le nombre de *L. monocytogenes* à des niveaux ne présentant plus de risque pour la santé humaine. La contamination des fromages, plus importante au niveau de la croûte, est, en fait, imputable aux manipulations de la pâte lors de l'affinage.

• Modalités de la transmission à l'homme

L'infection à *Listeria monocytogenes* est commune à l'homme et aux animaux. Les animaux sont contaminés à partir du sol. Le rôle des ensilages semble important (10 % des ensilages contiendrait des *Listeria*). Les viandes sont ainsi contaminées, de même que le lait. Chez l'animal, *Listeria monocytogenes* est responsable de petites épidémies (encéphalites, infections génitales avec avortement, mammites dont le rôle dans la contamination du lait a été établi). L'hypothèse d'une transmission à l'homme par les aliments est aujourd'hui admise par tous. Depuis 1981, de nombreuses épidémies de listériose ont pu, en effet, être attribuées, sur la base d'enquêtes épidémiologiques, à la consommation d'aliments contaminés. La presse médicale anglo-saxonne continue de rapporter régulièrement des épidémies de listériose attribuées à une contamination d'origine alimentaire : fromages à pâte molle non pasteurisés, laitues crues préemballées, poulets vendus cuits en restauration rapide.

En France, plusieurs épidémies de listériose ont été mises en relation avec la contamination d'aliments. En 1992, 279 cas ont été attribués à une seule souche : le sérotype 4b lysovar 2389/2425/3274/2671/147/108/340. Ce lysovar représentait à lui seul 41,5 % de l'ensemble des listérioses recensées la même année. Dans le cadre d'une vaste enquête, 203 aliments ont été identifiés comme contaminés par la souche épidémique, principalement des jambons, pâtés, produits en gelée, quelques fromages. L'analyse épidémiologique a pu identifier l'aliment responsable de l'épidémie : il s'agissait d'une langue de porc en gelée. En 1993, une autre épidémie due au même lysovar épidémique a pu être reliée à la consommation de rillettes. Plus récemment, en 1999, une épidémie due au sérotype 4 b lysovar 2389/3552/2425/1444/3274/2671/47/52/108/340 a pu être reliée elle aussi à la consommation de rillettes.

1.7.2.3. Mécanismes physiopathologiques

Les *Listeria* présentes dans la lumière de l'intestin pénètrent dans les macrophages et les monocytes à partir desquels elles peuvent envahir les entérocytes.

Plusieurs protéines constitutives de la bactérie interviennent successivement pour expliquer le processus invasif :

- l'internaline, protéine de surface, commune à d'autres bactéries à Gram positif, facilite l'adhésion et provoque (par liaison avec les intégrines cellulaires) des modifications du cytosquelette, entraînant la formation d'un phagosome ;
- à l'intérieur du phagosome, les *Listeria* subissent des conditions défavorables susceptibles d'entraîner leur destruction : acidification par les pompes à protons, burst oxydatif. L'action d'une protéine cytolytique, la listériolysine, associée à une phosphatidyl-inositol phospholipase conduit à leur libération par éclatement de la vésicule. La survie de *Listeria monocytogenes* dépend donc de la rapidité d'action de ces substances ;
- l'action d'une autre protéine, l'act A, provoque la polymérisation de l'actine F en actine G autour de la bactérie, ce qui permet son déplacement à l'intérieur du phagocyte à une vitesse de 1mm par seconde. Les *Listeria* peuvent ainsi envahir les cellules voisines et s'y multiplier.

In vivo, les *Listeria*, parvenues dans l'intestin avec les aliments ingérés, pénètrent la paroi intestinale au niveau des plaques de Peyer (qui contiennent des macrophages). La propagation se fait ensuite vers les entérocytes. Elles gagnent le chorion et pénètrent dans les vaisseaux afin d'atteindre les organes cibles privilégiés que sont le système nerveux central et le foie.

1.8. *Staphylococcus aureus*

1.8.1. Classification et nomenclature

Les staphylocoques sont des coques Gram+, catalase+, aéro-anaérobies, métabolisant le glucose par la voie fermentative. L'identification du genre *Staphylococcus* peut être aisément réalisée en fonction des critères suivants :

	<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Pediococcus...</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>
Catalase	+	+	-	-
Type respiratoire	Aéro-anaérobie	Aérobie strict	Anaérobie aérotolérant	Anaérobie aérotolérant
Voie d'attaque du glucose	F	O	F	F
Sensibilité à la nitrofurantoïne	+	-		
Sensibilité à la lysostaphine	+	-		
Culture sur BEA	-	-	-	+

F : fermentatif O : oxydatif

Tableau 8 – Classification des cocci Gram+

Les staphylocoques comprennent une vingtaine d'espèces. *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus fréquemment impliquée dans des infections d'origine alimentaire. Il se distingue des autres espèces par la pigmentation jaune d'or de ses colonies, son aptitude à produire une coagulase libre active sur le plasma humain et celui de lapin, la possession de récepteurs au fibrinogène (*clumping factor* ou coagulase liée) et celle d'une protéine A.

L'identification du biotype peut être intéressante pour connaître l'origine humaine ou animale d'une contamination. Elle repose sur les critères suivants :

	Biotype A	Biotype B	Biotype C	Biotype D
Pigment	+	+	+	V
Coagulase sur plasma humain	+	+	+	+
Coagulase sur plasma bovin	-	-	+	-
Fibrinolysine	+	-	-	-
Protéine A	+	v	v	-
Hémolyse complète à bords flous sur sang de mouton	- (exceptions)	+	+	+
Hémolyse incomplète à bords nets sur sang de mouton	+	v	v	-
Hôte dominant	Homme	Volailles – Porc	Bovins – Ovins	Lièvre

Tableau 9 – Critères d'identification des biotypes de *Staphylococcus aureus*

1.8.2. *Staphylococcus aureus* et toxi-infections alimentaires

1.8.2.1. Symptomatologie de l'intoxication staphylococcique

L'incubation est courte. Deux à quatre heures après l'ingestion de l'aliment contaminé, apparaissent, de façon brusque et violente, des céphalées, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements violents, incoercibles et répétés (c'est le signe le plus caractéristique) et, généralement, une diarrhée non sanglante et non purulente.

Il n'y a pas de fièvre. C'est une maladie courte mais éprouvante. La guérison est pourtant de règle dans les 24 heures bien que persiste pendant quelques jours une certaine fatigue.

1.8.2.2. Épidémiologie

• Incidence

En 1994, l'intoxication staphylococcique représentait la troisième cause de toxi-infections alimentaires en France avec 60 foyers déclarés, provenant de cuisines de restaurants ou de cantines scolaires. De nombreux cas ne sont pas répertoriés, en particulier en restauration familiale.

• Réservoir

Staphylococcus aureus est une bactérie parasite de l'homme et des animaux. Le réservoir humain est le plus important dans le cadre des TIAC : on considère que 20 à 50 % des individus sont porteurs de *Staphylococcus aureus* au niveau des fosses nasales et de la gorge. La dissémination du germe explique sa présence fréquente sur la peau dont il fait partie de la flore commensale transitoire. *Staphylococcus aureus* est responsable d'infections cutanées (furoncles, anthrax) qui sont fréquemment mises en cause dans la contamination d'aliments.

Chez l'animal, il faut signaler le rôle des mammites dans la contamination du lait.

• Nature des aliments contaminés

Les aliments en cause sont des produits cuits contaminés après la cuisson : viandes, poissons, tranches de charcuterie, plats cuisinés divers, crèmes glacées et pâtisseries, ou des aliments à faible Aw : salaisons, laits concentrés, laits en poudre. L'aliment ne devient toxique qu'après la multiplication des staphylocoques : des concentrations en bactéries de l'ordre de 10^6 à 10^9 /g doivent être réalisées, ce qui suppose le maintien de l'aliment trois à quatre heures à la température ambiante.

• Modalités de la transmission à l'homme

La contamination de l'aliment peut être originelle (laits de mammites) et concerne alors des biotypes animaux, mais elle résulte en général de la manipulation d'aliments par les porteurs sains, ou par des personnes atteintes d'une rhinopharyngite à staphylocoques, ou de lésions cutanées suppurées (furoncles, anthrax). La transmission est donc essentiellement manuportée, plus exceptionnellement aéroportée.

1.8.2.3. Mécanismes physiopathologiques

Une intoxication staphylococcique ne peut se développer que si les conditions suivantes sont réunies :

- la contamination, par une souche de *Staphylococcus aureus* productrice d'une entérotoxine, d'un aliment dont la composition est propice au développement de ce germe et à la production de l'entérotoxine. C'est le cas des aliments de pH voisin de la neutralité, riches en protéines, et dont la flore associée n'est pas inhibitrice ; 40 à 60 % des souches isolées des fosses nasales de porteurs sains produisent une entérotoxine ;
- des conditions favorables (température, temps d'exposition) à la multiplication de *Staphylococcus aureus* dans l'aliment. Des concentrations de l'ordre de 10^6 à 10^9 /g sont nécessaires pour provoquer une TIAC ;
- l'accumulation, dans l'aliment, d'une quantité suffisante d'entérotoxine. En effet, la toxine est seule responsable des manifestations cliniques observées.

Plusieurs types antigéniques différents d'entérotoxine staphylococcique ont été identifiés : A, B, C1, C2, C3, D, E, F et G. L'entérotoxine A est responsable de 80 % des intoxications déclarées. Elle résiste à l'acidité gastrique et à des traitements thermiques assez importants : 3 heures à 100 °C et 10 à 30 minutes à 120 °C.

Ingérée avec l'aliment, l'entérotoxine possède des propriétés essentiellement émétiques.

1.9. *Bacillus cereus*

1.9.1. Position taxinomique

Les bactéries du genre *Bacillus* sont des bacilles à Gram positif, sporogènes, mobiles par ciliature péritriche, aéro-anaérobies ou aérobies stricts, donnant une réaction négative au test oxydase. Leur endospore leur confère une grande résistance dans le milieu extérieur. Les bactéries du genre *Bacillus* sont classées en trois groupes selon les caractéristiques de la spore :

- I : spore ovale et non déformante ;
- II : spore ovale et déformante ;
- III : spore ronde et déformante.

Les résultats des études génétiques confirment la pertinence de ce classement.

L'identification des espèces fait appel aux caractères biochimiques ; les critères sont donnés par le *Tableau 10*. *Bacillus cereus* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les toxi-infections alimentaires. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sphaericus* ont été également incriminés dans des TIAC.

	Groupe	Ana	VP	GEL	LEC	ESC	URE	SAC	LAC	XYL	ARA	RAF	MAN
<i>B. cereus</i>	I	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	I	-	-	+	-	+	d	+	+	d	d	+	d
<i>B. coagulans</i>	I	+	+	d	-	+	-	d	d	d	d	+	d
<i>B. licheniformis</i>	I	+	+	+	-	+	-	+	d	+	+	d	+
<i>B. pumilus</i>	I	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>B. subtilis</i>	I	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>B. polymyxa</i>	II	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. maceans</i>	II	+	-	d	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. stearothermophilus</i>	II	-	-	+	-	d	-	+	-	d	d	d	d
<i>B. brevis</i>	II	-	-	d	-	d	-	-	-	d	d	-	d
<i>B. circulans</i>	II	-	-	-	-	+	d	+	+	-	-	+	+
<i>B. laterosporus</i>	II	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>B. alvei</i>	II	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>B. larvae</i>	II	+	-	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	d
<i>B. sphaericus</i>	III	-	-	ND	-	-	d	-	-	-	-	-	+
<i>B. pasteurii</i>	III	+	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	ND

Ana : culture en anaérobiose ; Gel : gélatinase ; LEC : lécitinase ; ESC : esculinase ; URE : uréase ; SAC : saccharose ; LAC : lactose ; XYL : xylose ; ARA : arabinose ; RAF : raffinose ; MAN : mannitol.

Tableau 10 – Identification différentielle des principales espèces de *Bacillus*

1.9.2. *Bacillus cereus* et toxi-infections alimentaires

1.9.2.1. Mécanismes physiopathologiques et symptomatologie

Bacillus cereus sécrète, pendant la phase exponentielle de sa croissance, l'une des deux toxines suivantes :

- une toxine émétique thermostable, responsable de vomissements ;
- une toxine diarrhéigène thermolabile.

Il existe des souches émétiques et des souches diarrhéigènes, les deux types pouvant coexister dans un même aliment.

Une intoxication à *Bacillus cereus* peut donc se manifester sous deux formes :

- un syndrome émétique avec nausées, vomissements qui surviennent une demi-heure à six heures après l'ingestion de l'aliment et sont comparables à ceux provoqués par les staphylocoques entérotoxiques, violents et incoercibles ;
- un syndrome diarrhéique avec apparition, après six à quinze heures d'incubation, de diarrhée aqueuse et de crampes abdominales sans fièvre.

La guérison est rapide (24 heures).

1.9.2.2. Épidémiologie

Les intoxications à *Bacillus cereus* restent assez fréquentes dans certains pays : Danemark, Italie, Suède ; elles sont assez rares en France.

Bacillus cereus est une bactérie du sol ; elle peut être présente, en petite quantité, dans la flore intestinale. Le riz préparé dans les restaurants orientaux est le principal aliment responsable des formes émétiques. En effet, *Bacillus cereus* se développe bien dans les aliments riches en polysaccharides, il peut contaminer le riz après sa cuisson et se multiplier lorsque l'aliment est laissé plusieurs heures à la température ambiante. Les traitements thermiques ultérieurs (grillade) sélectionnent la toxine émétique qui est thermostable. La toxine diarrhéigène a pu être mise en évidence dans des aliments plus variés : purée de pommes de terre, saucisses, plats cuisinés.

1.10. *Clostridium perfringens*

1.10.1. Position taxinomique

Les bactéries du genre *Clostridium* sont des bacilles Gram positif, sporulés et anaérobies stricts. Elles peuvent tolérer de faibles pressions en dioxygène.

Parmi les *Clostridium*, l'espèce *perfringens* est la seule mise en cause dans des toxi-infections d'origine alimentaire. À l'examen microscopique, *Clostridium perfringens* se présente sous la forme de gros bacilles à bouts carrés, Gram positif. La spore ovalaire, centrale ou subterminale, déformante, n'apparaît que rarement. Sur géloses au sang, *Clostridium perfringens* forme généralement des colonies de 3 à 5 mm de diamètre, lisses, grisâtres, bombées, à bord net, entourées d'une zone d'hémolyse, complète ou incomplète selon les souches.

Les autres caractères d'identification sont les suivants :

- mobilité- ;
- lécithinase+ ;
- lipase- ;
- gélatinase+ ;
- H₂S+ (à partir des sulfites) ;
- indole- ;
- glucose, lactose, maltose, saccharose+ ;
- salicine- ;
- amidon variable.

La croissance de *Clostridium perfringens* est possible entre 15 et 50 °C (selon les souches) avec un optimum compris entre 37 et 45 °C. Elle est exaltée par la présence de glucides, possible en présence de bile (jusqu'à une concentration de 20 %) et inhibée par une concentration de 6,5 % en chlorure de sodium.

Selon la constitution de sa toxine létale, on distingue cinq types antigéniques. Seuls les *Clostridium perfringens* de type A sont impliqués dans les toxi-infections alimentaires.

1.10.2. *Clostridium perfringens* et toxi-infections alimentaires

1.10.2.1. Symptomatologie

Elle est dominée par l'apparition, 6 à 8 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé, de douleurs abdominales et d'une diarrhée abondante, aqueuse, sans pus ni sang. Généralement, on n'observe pas de vomissements ni de fièvre. La guérison est de règle, sans séquelles, en 24 à 48 heures. Les complications sont rares et concernent les jeunes enfants et les personnes âgées sensibles à la déshydratation engendrée par la diarrhée.

1.10.2.2. Épidémiologie

• Incidence

Les toxi-infections alimentaires à *Clostridium perfringens* restent assez fréquentes. En France, 1681 cas ont été recensés en 1994, correspondant à 29 foyers déclarés. La maladie est probablement sensiblement sous-déclarée du fait d'une symptomatologie peu alarmante.

• Aliments mis en cause

Tous les aliments préparés en grande quantité (pour des banquets, des collectivités) peuvent être responsables de TIAC à *C. perfringens*. En effet, leur cuisson n'est pas suffisante pour détruire les spores thermorésistantes. Au cours du refroidissement, les spores sont placées dans des conditions de température et de milieu favorisant leur germination et libèrent l'entérotoxine.

Dans plus de la moitié des cas (64 % en 1994 en France), il s'agit de pièces de viande, produits carnés, aliments mixtes ou de volailles, avec une prédilection pour la langue de bœuf et les préparations de type viandes bouillies.

• Réservoir et contamination des aliments

Clostridium perfringens est une espèce commensale participant à la flore intestinale de l'homme et des animaux de boucherie. C'est également une espèce tellurique.

Son passage dans le sang est classique dans le cas de bactériémies post-prandiales. Ceci explique que *C. perfringens* puisse être présent dans les chairs, proliférer et sporuler dans les viandes lorsque la règle de l'abattage à jeun n'a pas été respectée. C'est pourquoi les produits carnés sont fréquemment impliqués dans ce type d'intoxication.

Les contaminations d'origine tellurique sont négligeables car seuls les organismes présents en profondeur de la pièce de viande ou de la préparation culinaire sont susceptibles de résister à la cuisson et de germer au cours du refroidissement.

Les aliments potentiellement toxiques contiennent au moins 10⁵ à 10⁷ organismes par gramme de produit.

1.10.2.3. Mécanismes physiopathologiques

Clostridium perfringens, ingéré avec l'aliment, agit sur l'intestin par l'intermédiaire d'une entérotoxine de masse moléculaire 34 000. Sa structure comprend deux zones : une zone hydrophile qui permet à la toxine de se fixer sur la membrane de l'entérocyte (sur une protéine spécifique), et une partie hydrophobe qui est internalisée et stimule la sécrétion hydrominérale. Les cellules de la bordure en brosse ne sont pas (ou très peu) altérées.

Seul *C. perfringens* type A2 est sécréteur de cette entérotoxine et peut donc être impliqué dans des TIAC. La toxine est produite au cours de la formation de la spore et libérée lors de sa germination.

1.11. *Clostridium botulinum*

1.11.1. Position taxinomique

Les souches responsables du botulisme ont été regroupées dans une même espèce : *Clostridium botulinum*. Cette espèce, définie par son pouvoir pathogène, est très hétérogène. M. Sebald considère que « *C. botulinum* correspond davantage à un consortium d'espèces qu'à une espèce taxonomiquement définie ». Ces bactéries sécrètent une neurotoxine parmi les plus actives que l'on connaisse.

Il y a sept neurotoxines immunologiquement différentes, correspondant à sept types de *C. botulinum* : A, B, C, D, E, F, G. Ces sept types ont des caractères biochimiques sensiblement différents. Par ailleurs, en fonction de ses caractères biochimiques, *C. botulinum* est classé en quatre groupes : I, II, III et IV.

1.11.2. Botulisme

1.11.2.1. Épidémiologie

C. botulinum est un germe tellurique. À partir de la terre ou des sédiments marins, il peut passer dans l'intestin d'animaux, contaminer les poissons (type E) ou les légumes.

Le type A prédomine sur la côte Est des États-Unis, le type B en Europe et sur la côte Ouest de l'Amérique du Nord, les types C et D sont plus fréquents en Afrique et dans les pays de l'Europe du Nord ; le type E, transmis en général par les produits de la mer, est le plus fréquent en URSS et au Japon. Les cas de botulisme concernent aujourd'hui les conserves artisanales ou familiales insuffisamment stérilisées, les jambons crus (60 % des cas en France), et les poissons fumés.

1.11.2.2. Physiopathologie du botulisme

Le développement de la bactérie dans les aliments est possible lorsque les conditions de milieu suivantes sont réunies :

- un potentiel d'oxydoréduction peu élevé. Cette condition est réalisée dans les conserves et en profondeur d'un jambon ;
- un pH supérieur à 4,5 ;
- une température supérieure à + 10 °C (+ 3 °C pour le type E) et inférieure à 48 °C.

Dans les conserves mal stérilisées, les spores survivent et germent pour donner des formes végétatives viables du fait des conditions d'anaérobiose existantes. Dans le cas des jambons, *C. botulinum* est presque toujours d'origine intestinale. Si le porc est abattu sans être à jeun, des germes intestinaux peuvent être présents dans le sang du fait d'une bactériémie post-prandiale fréquente chez cet animal. Un abattage mal conduit aboutit, par ailleurs, à la production de viandes à pH élevé et à faible teneur en oxygène, ou exsudatives et retenant mal le sel. *C. botulinum* se retrouvera donc viable au cœur du muscle et s'y développera, du fait de conditions d'anaérobiose et de pH favorables et de la faible teneur en sel et en nitrites (destinés à inhiber sa croissance). Il y produira sa toxine qui, ingérée avec l'aliment, résiste à l'action des enzymes protéolytiques du tube digestif, passe dans le sang et atteint, par cette voie, ses récepteurs au niveau des jonctions neuromusculaires. Les toxines botuliques bloquent le couplage entre la sécrétion d'acétylcholine et l'excitation du muscle en inhibant la libération d'acétylcholine à partir des vésicules de stockage. Elles provoquent, de ce fait, la paralysie des muscles concernés.

1.11.2.3. Symptomatologie

L'action des toxines reproduit les symptômes du botulisme.

La période d'incubation est très variable, en général de deux à vingt-quatre heures. Apparaissent d'abord une paralysie des muscles de l'accommodation avec diplopie (vision double), des difficultés à la déglutition, la sécheresse de la bouche.

Dans les formes graves, les paralysies atteignent les muscles respiratoires. Le botulisme présente une mortalité de 50 % aux États-Unis, de seulement 4 % en France ; les sérotypes A et E semblant les plus dangereux.

2. Méthodes utilisées pour la recherche et l'identification des bactéries entéropathogènes

La recherche de bactéries entéropathogènes dans un aliment est mise en œuvre dans le cadre du contrôle microbiologique des aliments, et, plus exceptionnellement, pour rechercher l'étiologie d'une toxi-infection alimentaire. Seules les *Salmonella* et les *Listeria* sont recherchées en analyse de routine. Leur présence dans un aliment n'est pas tolérée, même en très faible concentration.

L'interprétation de l'analyse est donc réalisée selon un plan à 2 classes admettant deux réponses seulement : présence ou absence de *Salmonella* dans le nombre d'échantillons prévu par la réglementation. Pour la viande hachée, par exemple, les critères microbiologiques sont les suivants : absence dans 25 g avec $n = 5$, $c = 0$, c'est-à-dire que la recherche doit être négative dans les 5 échantillons imposés par les textes (Voir chapitre II).

Dans le cas de l'expertise d'un aliment suspecté d'être à l'origine d'une infection, l'investigation peut porter sur d'autres bactéries entéropathogènes comme *Shigella*, *Campylobacter*, *E. coli* entéropathogènes, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* producteurs d'entérotoxine, *Listeria*...

Ces bactéries peuvent exister dans un aliment contaminé, en très faibles concentrations, parfois au sein de flores abondantes et variées. Il est possible, dans ces conditions, qu'un isolement sélectif réalisé directement à partir de l'aliment ne permette pas d'observer de colonies caractéristiques et qu'un enrichissement soit nécessaire.

Leur mise en évidence peut faire appel à différentes méthodologies.

2.1. Méthodes traditionnelles

Le produit à analyser fait généralement l'objet d'un enrichissement dans un milieu sélectif liquide, parfois précédé d'un préenrichissement dans un milieu non sélectif liquide.

- Milieu de préenrichissement

Le plus fréquent est l'eau peptonée tamponnée. L'échantillon est dilué au 1/10. L'ensemble est incubé 16 à 20 h à 37 °C.

- Milieux d'enrichissement

Ils contiennent des agents chimiques sans action sur la bactérie entéropathogène recherchée mais inhibant un grand nombre d'espèces pouvant lui être associées au sein de la flore de l'aliment. Plusieurs substances inhibitrices peuvent être utilisées afin de renforcer la sélectivité du milieu. On peut aussi jouer sur les conditions d'incubation (température, atmosphère d'incubation...). Au cours de l'enrichissement, la proportion de la bactérie recherchée par rapport aux autres populations augmente avec le temps. Après 18 heures d'incubation, cette proportion est suffisante pour qu'un milieu sélectif d'isolement soit exploitable et que des colonies d'aspect caractéristique puissent y être observées.

- Milieux sélectifs d'isolement

Ils sont complémentaires des milieux d'enrichissement. Ils contiennent généralement des inhibiteurs différents de ceux qui entrent dans la composition du bouillon d'enrichissement. Après étalement sur milieu sélectif, le développement des espèces de la flore associée s'étant maintenues pendant l'enrichissement est inhibé ou fortement ralenti.

Afin de repérer, sur le milieu d'isolement, les colonies susceptibles de correspondre à la bactérie recherchée, le milieu d'isolement sélectif contient des substrats permettant la lecture de caractères biochimiques discriminants. Ainsi, les *Salmonella* ne fermentent ni le lactose, ni le saccharose, ni la salicine, les milieux sélectifs appropriés contiennent un ou plusieurs de ces glucides associés à un indicateur de pH. Certains milieux sélectifs pour *Salmonella* contiennent une source de soufre (thiosulfate) et un indicateur de sulfure d'hydrogène (sels de fer) afin de révéler le caractère H₂S, qui est généralement positif pour ce genre.

Ainsi repérées sur les milieux d'isolement, et après avoir éventuellement été soumises à des tests complémentaires plus discriminatifs, les bactéries formant les colonies suspectes font l'objet d'une identification selon les procédures adaptées.

Les méthodes traditionnelles mises en œuvre pour rechercher et identifier des bactéries entéropathogènes comprennent donc les étapes suivantes :

- enrichissement dans un milieu sélectif liquide ;
- isolement sur milieu sélectif ;
- repérage sur le milieu sélectif, après incubation, des colonies caractéristiques de la bactérie recherchée et réalisation des tests permettant l'identification.

L'identification doit être la plus précise possible afin de permettre les études épidémiologiques, ce qui peut nécessiter la recherche du sérotype et (ou) du lysotype.

2.2. Méthodes rapides

De conception plus récente, elles permettent de détecter la bactérie recherchée dans un bouillon de préenrichissement, parfois dans une préparation de l'aliment. Elles font appel à l'immunologie ou à la biologie moléculaire. Ces méthodes sont utilisées pour la recherche des *Salmonella* et des *Listeria*.

2.2.1. Méthodes immunoenzymologiques

2.2.1.1. La méthode ELISA de type sandwich

Des anticorps hautement purifiés, spécifiques de la bactérie recherchée, sont adsorbés sur les puits d'une plaque pour microtitration. Les échantillons à analyser sont répartis dans ces puits. Dans le cas d'une réaction positive, la bactérie recherchée s'associe aux anticorps et reste ainsi, après lavage, fixée à la surface du puits. La révélation est réalisée par addition des mêmes anticorps marqués avec une enzyme (technique sandwich), puis, après lavage, par addition du substrat de l'enzyme. Dans le cas d'un résultat positif, la réaction entre l'enzyme fixée et son substrat libère des produits colorés. L'interprétation du test fait appel à des témoins positif et négatif.

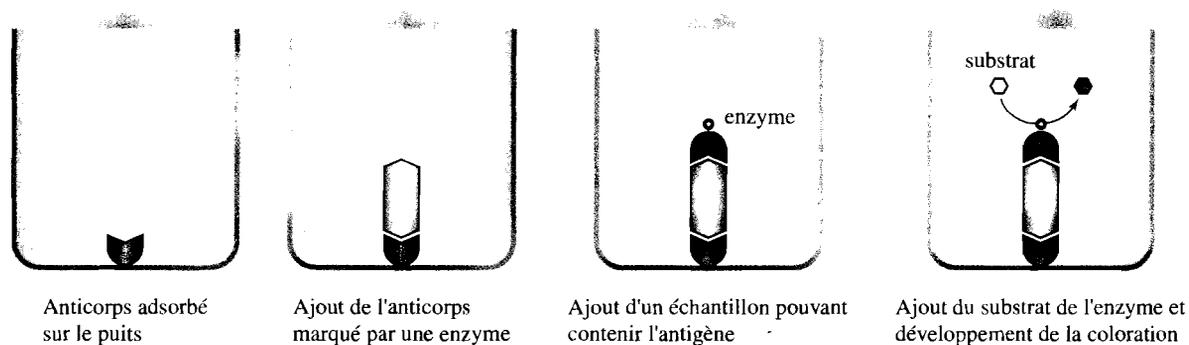


Fig. 2 – Principe de la méthode ELISA

2.2.1.2. L'immunoséparation magnétique et l'IMS-ELISA

Cette technique consiste en une immunocapture des bactéries recherchées par des billes de polystyrène magnétiques sur lesquelles sont adsorbés les anticorps spécifiques (anti *Salmonella* ou anti *Listeria*). Les billes sont ensuite récupérées et rassemblées sur une plaque aimantée, puis lavées et concentrées.

L'immunoséparation magnétique remplace avantageusement, en moins de 30 minutes, l'étape d'enrichissement sélectif des méthodes traditionnelles (qui demande un délai de 24 heures). Elle peut être suivie de l'étape d'isolement, par la méthode traditionnelle ou associée à une détection immunoenzymatique des anticorps fixés par IMS-ELISA.

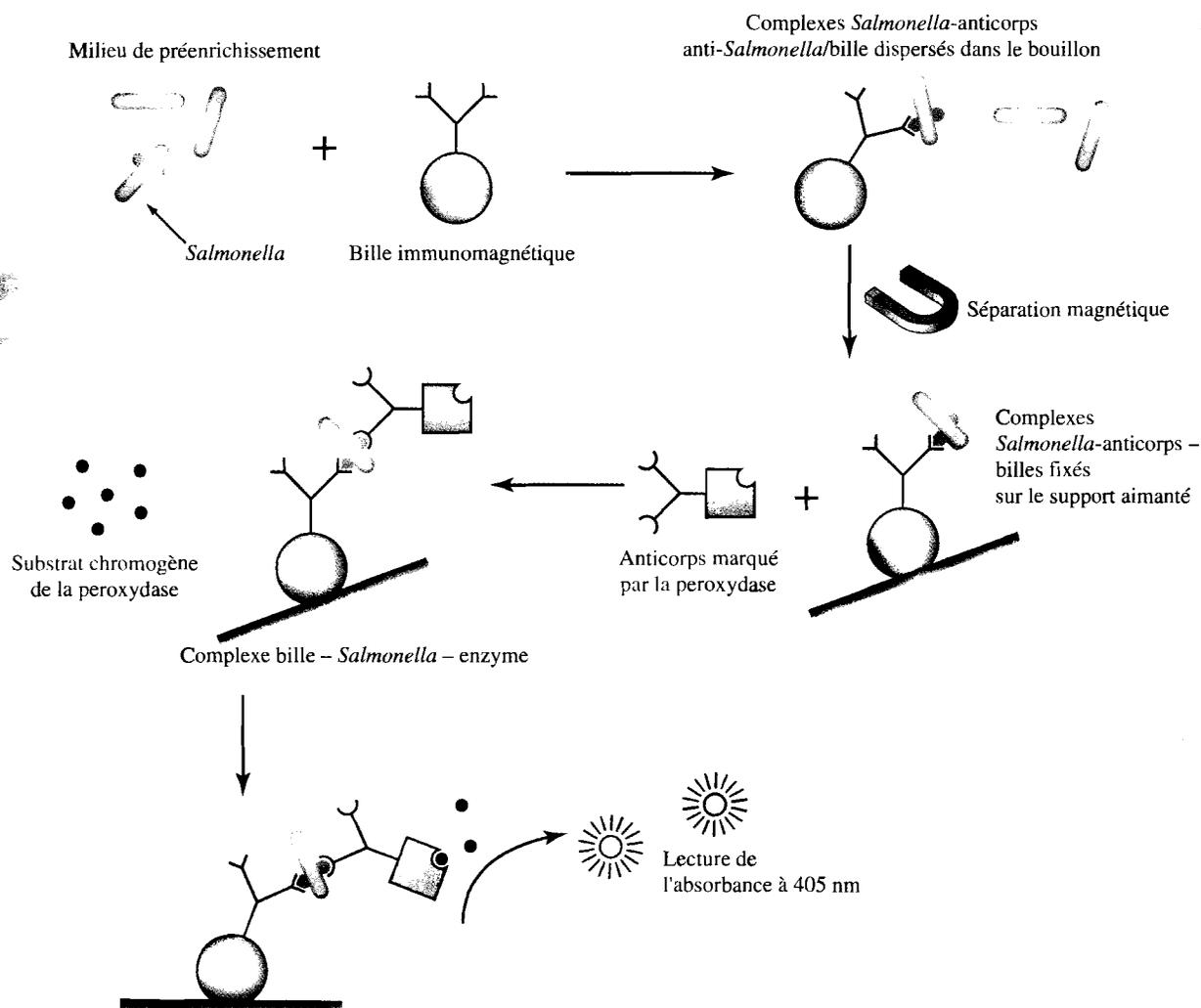


Fig. 3 – Principe de l'IMS-ELISA

Ces méthodes sont utilisées pour la recherche des *Salmonella* et des *Listeria*

2.2.2. Utilisation de sondes nucléiques

Des fragments d'ADN ou d'ARN simple brin, d'origine microbienne, sont capables de s'hybrider avec des fragments complémentaires, les sondes, pour former des duplex stables.

La mise en évidence de l'hybridation entre la sonde et l'acide nucléique cible est effectuée par détection directe ou par détection indirecte de l'hybride nucléique.

2.2.2.1. Détection directe de l'hybride nucléique

Des sondes froides de 15 à 120 bases sont couplées à un marqueur qui peut être la phosphatase alcaline (fixée sur le C5 de la thymine), ou un ester d'acridinium. L'hybridation est, dans ce cas, révélée :

- par l'addition d'un substrat chromogène de la phosphatase alcaline et le développement d'une coloration ;
- par luminescence dans le cas d'un ester d'acridinium.

EXEMPLE

Sonde Gen Probe® pour la détection des *Campylobacter* thermotolérants dans les produits alimentaires. La sonde utilisée est spécifique de l'ARN ribosomal 16S de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* et *Campylobacter lari*. Elle est marquée par l'ester d'acridinium.

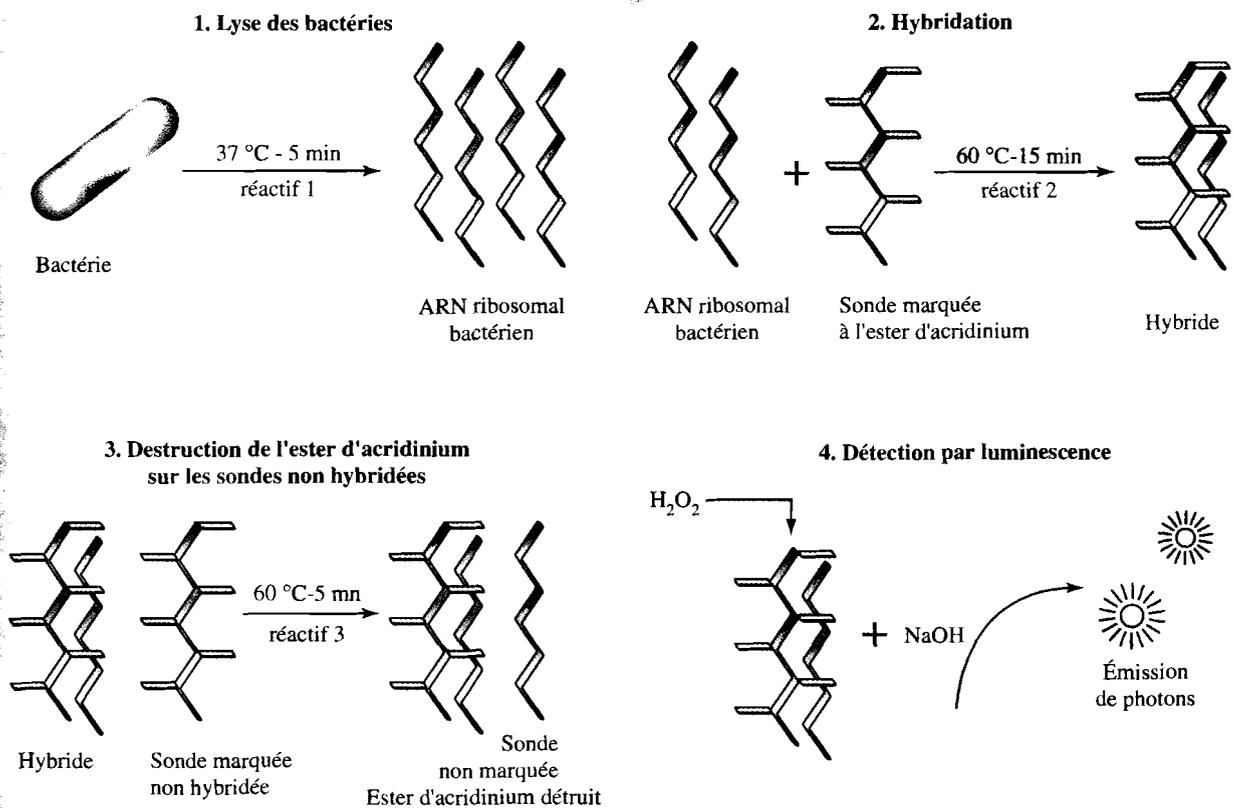


Fig. 4 – Principe de la sonde Gen Probe®

2.2.2.2. Détection indirecte de l'hybride nucléique

Dans ce cas, on ajoute une molécule capable de reconnaître le marqueur fixé sur la sonde. Cette molécule est directement liée à une enzyme. Les premières sondes utilisaient la biotine comme marqueur, la biotine est détectée par sa grande affinité pour l'avidine, elle-même couplée à une enzyme. La sonde peut être également marquée par la digoxygénine qui est révélée par un anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline.

Les sondes sulfonées se caractérisent par la fixation d'un groupement sulfone sur la cytosine. Ce groupement est ensuite reconnu par un anticorps monoclonal de souris, lui-même reconnu par un anticorps polyclonal de chèvre anti-souris marqué par une enzyme.

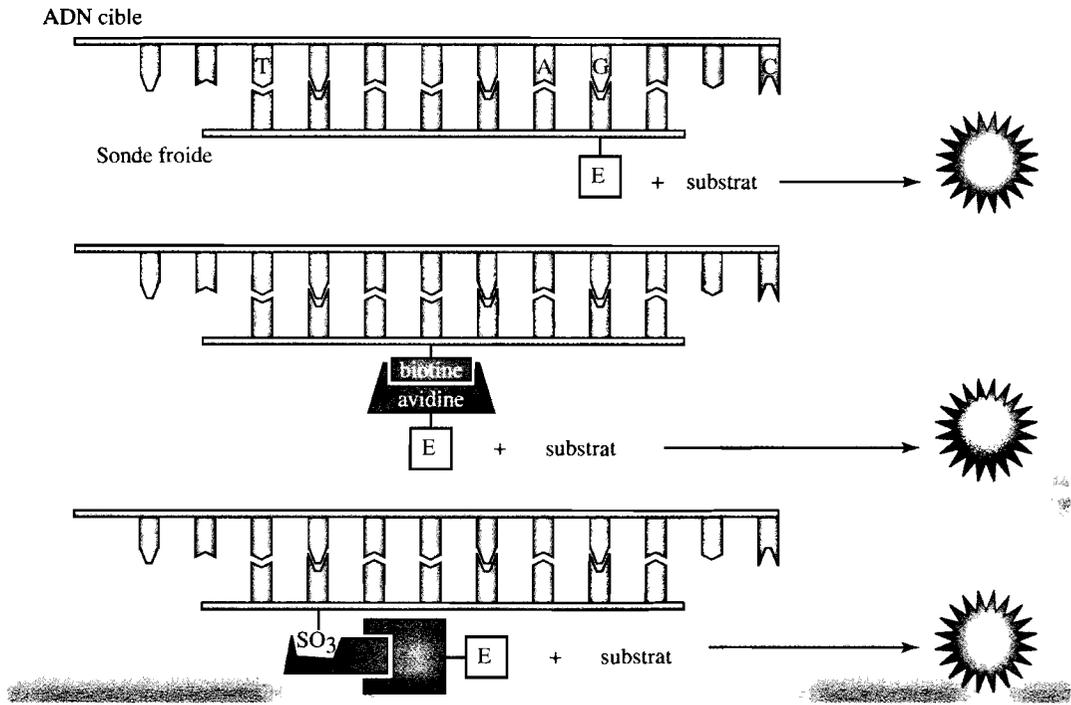


Fig. 5 – Détection des hybrides ADN-ADN

2.2.2.3. Le système Gene-Trak

Les bactéries sont lysées par une solution alcaline (supplémentée, pour les bactéries Gram – par du lysozyme) afin d'extraire l'ARN ribosomique. Après neutralisation, deux sondes spécifiques d'ADN (reconnaissant les séquences de l'ARN ribosomique des bactéries recherchées) sont ajoutées :

- une sonde de détection marquée à la fluorescéine ;
- une sonde de capture contenant une queue de poly A et qui est destinée à se fixer sur les hybrides nucléiques produits.

Le complexe capturé est mis en contact avec des anticorps antifuorescéine conjugués à une peroxydase. Après lavages, le substrat chromogène de la peroxydase est introduit et l'absorption mesurée à 450 nm.

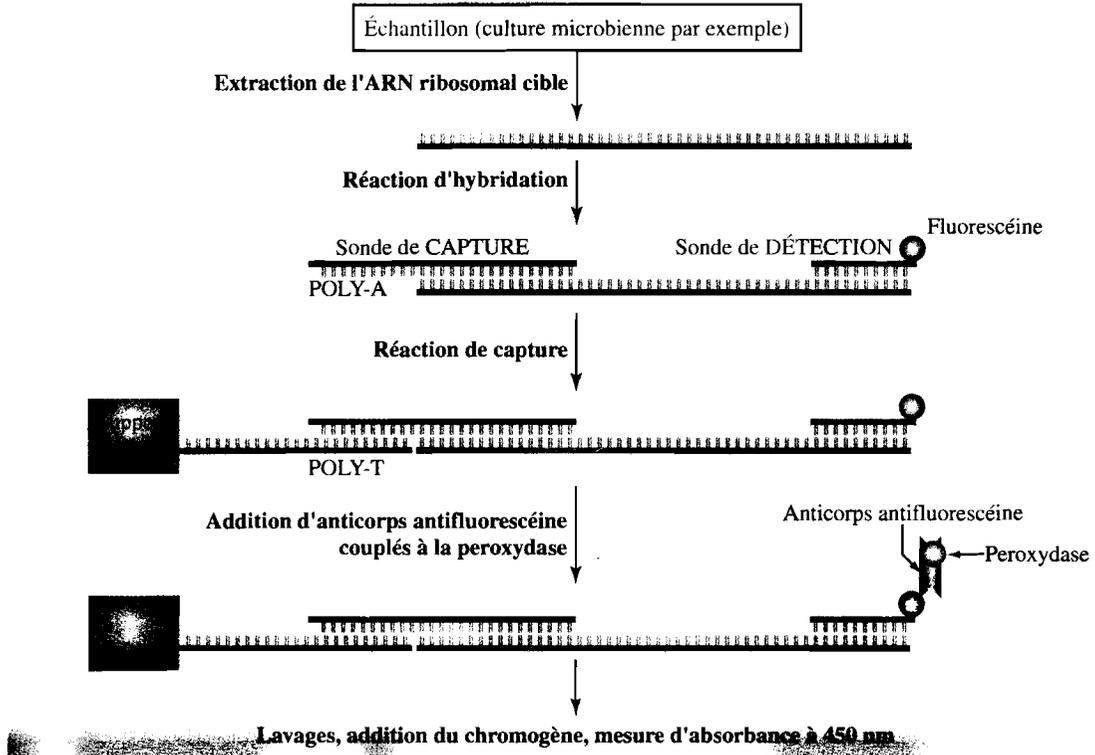


Fig. 6 – Le système Gene-Trak®

Le système Gene-Trak permet de rechercher avec une bonne sensibilité *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* dans les produits alimentaires.

2.2.2.4. Le système LUMIPROBE 24

Il utilise le principe de l'hybridation sandwich en phase solide avec l'ARN ribosomal de la bactérie à détecter.

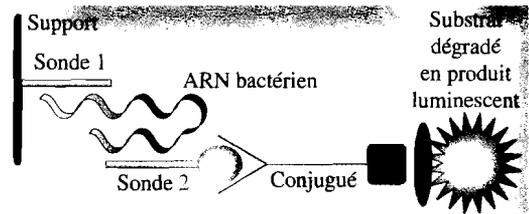


Fig. 7 – Hybridation sandwich

2.2.2.5. Les principaux dispositifs commercialisés

Fournisseur	Espèce microbienne	Délai d'obtention des résultats	Seuil de détection	Nom commercial
DNA	<i>E. coli</i>	24/48 h	10 ⁶	Gene-Trak
DNA	<i>Salmonella</i>	48/72 h	10 ⁶	Gene-Trak
DNA	<i>Listeria</i>	48/72 h	10 ⁶	Gene-Trak
DNA	<i>Listeria monocytogenes</i>	48/72 h	10 ⁶	Gene-Trak
DNA	<i>Staphylococcus aureus</i>	30 h	10 ⁶	Gene-Trak
Euralam	<i>Listeria</i>	24 h	0,9/25 g	LUMIPROBE
Euralam	<i>Samonella</i>	24 h	0,9/mL	LUMIPROBE

Tableau 11 – Caractéristiques des principales sondes nucléiques commercialisées en 2001

2.2.3. Utilisation de l'amplification génique (amplification en chaîne par polymérase (PCA) ou *polymerase chain reaction* (PCR))

2.2.3.1. Principe général de l'amplification génique

La PCR consiste à amplifier spécifiquement une séquence d'ADN double brin par l'action cyclique d'une ADN polymérase thermostable. L'initiation de la synthèse d'ADN est réalisée par une enzyme au niveau de courtes séquences oligonucléotidiques (amorces), ajoutées au milieu réactionnel, spécifiques de la séquence d'ADN que l'on souhaite amplifier. La PCR consiste ensuite en l'enchaînement cyclique de trois processus :

- la dénaturation de l'ADN : le mélange est placé à une température comprise entre 90 et 100 °C pendant une à deux minutes. Elle permet la séparation des deux brins d'ADN ;
- l'hybridation des amorces : la température est ramenée à 50-60 °C pendant une à deux minutes ;
- l'extension des amorces par une ADN polymérase thermostable, le plus souvent la Taq polymérase extraite de *Thermus aquaticus*. Le milieu réactionnel est placé alors à une température de 72 °C, valeur optimale d'activité de l'enzyme.

L'ensemble des opérations est réalisé dans un appareil automatique : le thermocycleur.

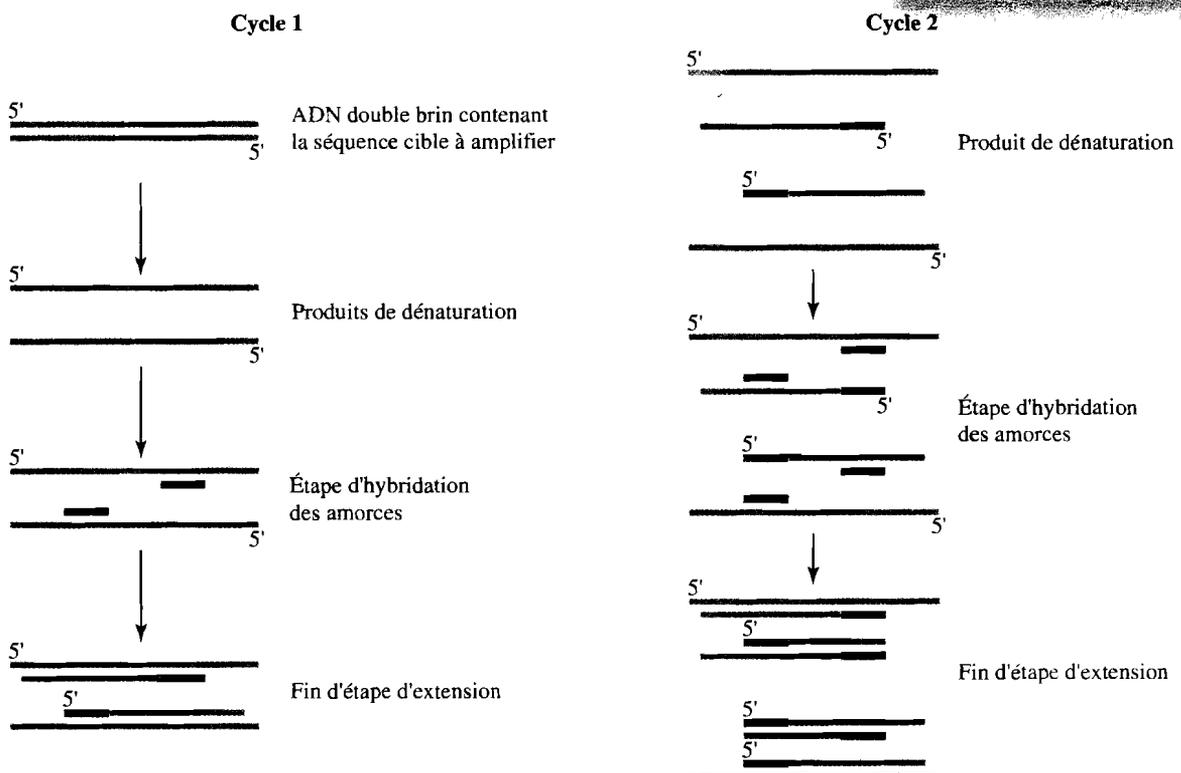


Fig. 8 – Principe de l'amplification génique

EXEMPLE D'APPLICATION DE L'AMPLIFICATION GÉNIQUE EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE : la méthode PROBELIA *Salmonella* sp (Sanofi Diagnostics Pasteur)

Cette méthode consiste, après une étape de traitement de l'échantillon et de lyse par choc thermique qui permet de libérer l'ADN bactérien, à amplifier une séquence cible spécifique de *Salmonella* contenant le gène Iag A impliqué dans le pouvoir d'invasion des *Salmonella*. L'ADN des *Salmonella* est piégé par une sonde de capture, l'hybride formé est révélé par fixation à une deuxième sonde marquée à la peroxydase.

Cette méthode peut être mise en place à partir du milieu de préenrichissement et fournit donc des résultats en 24 heures.

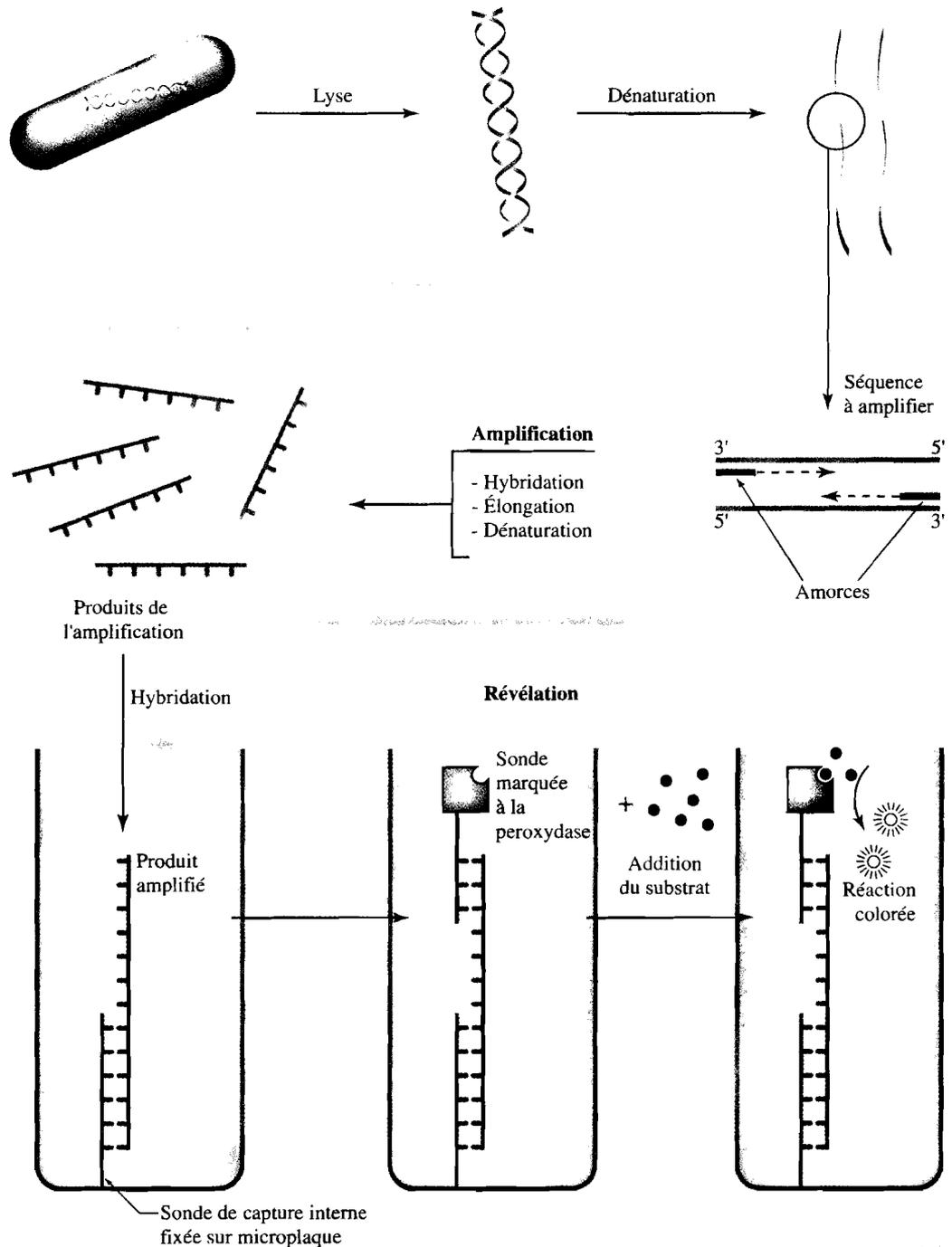


Fig. 9 – Schéma de la méthode Probelia *Salmonella* Sp (Sanofi Diagnostics Pasteur)

3. Recherche et identification des principaux microorganismes et toxines responsables de TIAC

3.1. Recherche et identification des *Salmonella*

3.1.1. Méthodologie de l'isolement et de l'identification des *Salmonella* à partir de denrées alimentaires

3.1.1.1. Milieux d'enrichissement

La recherche des *Salmonella* dans un prélèvement alimentaire implique la réalisation successive d'un préenrichissement sur milieu liquide non sélectif (eau peptonée tamponnée) et d'un enrichissement sur deux milieux liquides sélectifs (selon AFNOR) : bouillon au vert malachite et au chlorure de magnésium (bouillon Rappaport Vassiliadis) incubé à 45 °C et bouillon au sélénite-cystine.

- Le bouillon au vert malachite et au chlorure de magnésium (bouillon Rappaport Vassiliadis) incubé à 42 °C

Solution A	
- Tryptone	5 g
- NaCl	8 g
- KH_2PO_4	1,6 g
- Eau	1L
Solution B	
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	400 g
- Eau	1L
Solution C	
- Oxalate de vert malachite	0,4 g
- Eau	1L
Milieu complet	
- Solution A	1 000 mL
- Solution B	100 mL
- Solution C	10 mL

Tableau 12 – Composition du milieu de Rappaport Vassiliadis

Les cultures obtenues sur les milieux d'enrichissement sont ensuite inoculées à deux milieux sélectifs gélifiés.

3.1.1.2. Milieux de l'isolement sélectif

La norme ISO 6579 (1990) préconise l'utilisation de deux milieux d'isolement dont la gélose au rouge de phénol et au vert brillant (RPVB).

- Premier milieu d'isolement : le milieu au vert brillant et au rouge de phénol

- Extrait de viande de bœuf	5 g
- Extrait de levures	3 g
- Peptone	10 g
- Lactose	10 g
- Saccharose	10 g
- NaCl	5 g
- Na_2HPO_4	1 g
- NaH_2PO_4	0,6 g
- Gélose	12 à 18 g
- Vert brillant	5 mg
- Rouge de phénol	0,09 g
- Eau distillée	1L
pH = 6,9	

Tableau 14 – Composition du milieu au vert brillant et au rouge de phénol

La sélectivité de ce milieu est assurée par une forte concentration en vert brillant. Les colonies de *Salmonella* sont rouges.

- Deuxième milieu d'isolement

Il peut être choisi parmi les autres formules existantes, citons en particulier :

- Le bouillon au sélénite-cystine

Milieu de base	
- Tryptone	5,0 g
- Lactose	4,0 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	10,0 g
- Hydrogénosélénite de sodium	4,0 g
Dissoudre les trois premiers composants, maintenir à ébullition pendant 5 minutes, ajouter l'hydrogénosélénite de sodium.	
Solution de L-cystine	
- L-cystine	0,1 g
- Solution de NaOH à 1 mol/L	15 mL
Compléter à 100 mL avec de l'eau stérile. Ne pas stériliser.	
Milieu complet	
- Milieu de base	1 000 L
- Solution de L-cystine	10 mL
Ajouter la solution de L-cystine au milieu refroidi.	

Tableau 13 – Composition du milieu sélénite-cystine

– La gélose Hektoen

– Extrait de levures	3 g
– Peptone	12 g
– Lactose	12 g
– Saccharose	12 g
– Salicine	2 g
– Sels biliaires	9 g
– Hyposulfite de sodium	5 g
– Citrate de fer ammoniacal	1,5 g
– NaH ₂ PO ₄	0,6 g
– Gélose	13,5 g
– Bleu de bromothymol	64 mg
– Fuchsine acide	40 mg
– Eau distillée	1L
pH = 7,6	

Tableau 15 – Composition de la gélose Hektoen

L'agent inhibiteur est représenté par des sels biliaires en concentration plus importante que dans le milieu SS. Les bactéries Gram+ sont inhibées, la croissance des entérobactéries autres que *Salmonella* ou *Shigella* est fortement ralentie. La base nutritive est riche. Les *Salmonella*, qui ne fermentent aucun des trois glucides présents dans ce milieu, donnent des colonies vertes à centre noir (*Salmonella* H₂S+) ou sans centre noir (*Salmonella* H₂S-).

– La gélose au sulfite de bismuth

– Extrait de bœuf	5 g
– Peptone	10 g
– Glucose	5 g
– Vert brillant	0,025 g
– Sulfite de sodium	6,15 g
– Citrate de bismuth ammoniacal	1,85 g
– Na ₂ HPO ₄	4 g
– Sulfate de fer II	0,3 g
– Agar	20 g
– Eau distillée	1 000 mL
pH = 7,7	
Dissoudre les ingrédients dans l'eau en portant à ébullition durant 1 minute.	
Refroidir entre 45 et 50 °C en agitant doucement le précipité en suspension.	
Couler en boîtes de Petri. Ne pas stériliser.	

Tableau 16 – Composition de la gélose au sulfite de bismuth

Les agents sélectifs sont le vert brillant et le bismuth. Les *Salmonella* donnent sur ce milieu des colonies brunes ou noires (*Salmonella* H₂S+), certaines espèces (*Salmonella* H₂S-) donnent des colonies vertes.

– La gélose Rambach

– Peptone	5 g
– Extrait de levures	3 g
– Désoxycholate de sodium	1 g
– Rouge neutre	0,03 g
– 5 bromo-4-chloro-β-3-indoly1-β-galactopyranoside	1,5 g
– Agar	20 g
– Eau distillée	1 000 mL
pH = 7,4	
Dissoudre les ingrédients dans l'eau en portant à ébullition durant 1 minute.	
Refroidir entre 45 et 50 °C en agitant doucement le précipité en suspension.	
Couler en boîtes de Petri. Ne pas stériliser	

Tableau 17 – Composition de la gélose de Rambach

Le désoxycholate de sodium inhibe principalement les bactéries Gram+. Ce milieu permet un bon repérage des colonies de *Salmonella* par la lecture de deux caractères biochimiques : l'oxydation du propylène glycol (caractère positif chez les *Salmonella*) et la β-galactosidase (absente chez les *Salmonella*). Les colonies de *Salmonella* (à l'exception de *S. typhi* et *S. paratyphi* A) sont rouges alors que celles correspondant aux autres entérobactéries sont bleues, violettes (coliformes), ou incolores (*Proteus*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A).

3.1.1.6. Critères et méthodes d'identification des *Salmonella*

• Repérage des colonies pouvant correspondre à des *Salmonella*

Les cultures sont examinées après 48 à 72 heures d'incubation à 37 °C. On recherche des colonies présentant les aspects typiques des *Salmonella* tels qu'ils ont été décrits précédemment. Les milieux d'isolement permettent en général de repérer les colonies correspondant à des bactéries H₂S+ (colonies noires ou à centre noir), et de lire le caractère lactose, parfois saccharose. Les *Salmonella* sont classiquement H₂S+, lactose et saccharose- (il existe des exceptions : *S. arizonae* et *diarizonae* sont lactose+). Certaines espèces sont H₂S-. D'autres entérobactéries, pouvant être présentes dans le prélèvement et donc sur les milieux d'isolement, possèdent ces caractères ; elles posent des problèmes d'identification différentielle avec les *Salmonella*. C'est ainsi que les *Proteus*, *Edwardsiella*, les *Citrobacter* lactose- peuvent donner des colonies d'aspect identique à celles des *Salmonella* H₂S+. Par ailleurs, l'examen du tableau ci-dessous montre que le diagnostic différentiel des *Salmonella* H₂S- se pose par rapport à de nombreux genres et espèces d'entérobactéries (*Providencia*, *Morganella*, *Shigella*, *Hafnia alvei*, biotypes lactose- d'*E. coli*, *Serratia*...), les bactéries figurant sur ce tableau étant toutes lactose-.

	Uréase	Indole	TDA	H ₂ S sur TSI	ONPG hydrolase	Gaz en glucose	Mobilité	LDC	Saccharose
<i>Salmonella</i> H ₂ S+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Salmonella</i> Typhi	-	-	-	V	-	-	+	+	-
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	-	-	-	-	-	V	+	-	-
<i>Salmonella</i> Pullorum	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Salmonella</i> Abortus equi	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Salmonella</i> Abortus ovis	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Salmonella</i> Cholerae suis	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Shigella</i> (sauf <i>Shigella sonnei</i>)	-	V	-	-	-/+	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> AD	-	+	-	-	-	-	-	+	-/+
<i>Serratia</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	-	+/-	+	+	+	-
<i>Citrobacter</i> ONPG-	-	+	-	+	-	+	+	+	-/+
<i>Edwardsiella</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-/+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>Morganella</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-/+
<i>Providencia stuartii</i>	-	+	+	-	-	+	+	-	V

+ : plus de 95 % des souches possèdent le caractère recherché. +/- : La plupart des souches sont +. V : les % de souches + et - sont voisins.
- : moins de 5 % des souches possèdent le caractère recherché. -/+ : La plupart des souches sont -.

Tableau 18 – Identification des *Salmonella*

Il est donc nécessaire d'ensemencer des galeries biochimiques à partir de plusieurs colonies, après avoir réalisé un « screening » de ces colonies par un (ou plusieurs) caractère(s) suffisamment discriminant(s). L'uréase représente classiquement ce caractère : chaque colonie suspecte est mise en suspension dans 0,2 mL de milieu urée-indole. Il est nécessaire de tester entre 5 et 10 colonies suspectes. Après une incubation à 37 °C (si possible au bain-marie) pendant 1 à 3 heures, il est possible d'éliminer les colonies uréase+ qui correspondent à des *Proteus*, *Morganella* ou *Providencia rettgeri*. Les colonies correspondant à des bactéries uréase- sont ensemencées sur une galerie biochimique minimale. D'autres techniques permettent de repérer des colonies de *Salmonella*.

• Le système SM ID (bioMérieux)

Cette technique fait appel à un milieu d'isolement comprenant des agents sélectifs (vert brillant et sels biliaries), un indicateur de pH (rouge neutre) et deux substrats permettant la lecture de caractères biochimiques fortement discriminants :

- un substrat chromogène qui, sous l'action de la β -galactosidase, libère un produit de coloration bleue ;
- du β -glucuronate qui, après hydrolyse par la β -glucuronidase, libère l'acide glucuronique. L'acidification du milieu résultant de cette réaction provoque le virage de l'indicateur de pH au rose.

L'aspect des colonies obtenues sur ce milieu est le suivant :

	<i>Salmonella</i>	Autres bactéries		
β -galactosidase	-	+	+	-
Glucuronate	+	+	-	-
Coloration de la colonie	rose	violette	bleue	incolor

Tableau 19 – Aspect des colonies obtenues par le système SM ID

- Le MUCAP Test (AES Laboratoire)

Ce test consiste à ajouter, sur les colonies suspectes repérées sur les milieux sélectifs, de la méthylumbellyfêrone liée à un substrat octacarboné. En présence d'une C8 estérase, cette molécule libère de l'umbellyfêrone repérable par sa forte fluorescence sous lampe de Wood.

Parmi les colonies suspectes sur les milieux d'isolement sélectifs, seules celles de *Salmonella* et certaines souches de *Serratia* possèdent une C8 estérase.

- Le système API Z

3.1.1.7. Galerie d'identification

Quel que soit le système de discrimination utilisé, l'ensemencement d'une galerie biochimique minimale, puis la réalisation d'un sérotypage sont nécessaires pour identifier les *Salmonella* avec certitude et précision.

La galerie préconisée par l'AFNOR (ISO6579-NFV) est constituée des milieux suivants :

- gélose au citrate de fer et aux trois sucres (gélose TSI) qui permet de lire les caractères lactose, saccharose, glucose et H₂S, et de réaliser un test ONPG ;
- milieu à l'urée de Christensen qui permet de lire le caractère uréase ;
- milieu tryptone-tryptophane, pour rechercher la production d'indole ;
- milieu pour la recherche de la LDC (type milieu de Taylor) ;
- bouillon de Clark et Lubs (caractères lus : RM et VP) ;
- gélose nutritive inclinée afin de vérifier la pureté de la souche et d'obtenir des colonies à partir desquelles le sérotypage sera réalisé.

Le genre *Salmonella* est identifié sur les résultats suivants :

Caractère	Résultat de la lecture	% de souches de <i>Salmonella</i> présentant ce caractère
H ₂ S	+	91,6
Saccharose	-	99,5
Uréase	-	100
LDC	+	94,6
ONPG hydrolase	-	98,5
VP	-	100
Indole	-	98,9

Tableau 20 – *Salmonella* : critères d'identification du genre

3.1.1.8. Sérotypage

Il existe plus de 2 800 sérovars de *Salmonella* qui se différencient par la nature de leurs antigènes. L'identification précise d'une *Salmonella* consiste donc à déterminer sa formule antigénique, qui associe des antigènes O pariétaux et des antigènes H flagellaires. Ces derniers peuvent exister sous deux formes différentes : en phase 1 ou en phase 2. Chaque bactérie ne possède qu'une phase ; une population comprend, en général, des bactéries des deux phases. Lorsqu'une phase n'est pas représentée, il est nécessaire de réaliser une «inversion» de phase afin de l'obtenir en quantité suffisante. Cette technique consiste à faire cultiver la *Salmonella* dans une gélose semi-molle additionnée d'anticorps de la phase à éliminer et de recueillir, à distance du dépôt, les *Salmonella* (milieu de Sven Gard) qui possèdent des flagelles de la phase non agglutinée par les anticorps du milieu. On peut aussi rechercher l'antigène Vi qui correspond à une microcapsule recouvrant l'antigène O. *Salmonella* Typhi, Paratyphi C, et Dublin possèdent cet antigène.

L'identification du sérotype est réalisée en se reportant au tableau de Kauffmann et White qui donne la formule antigénique des sérotypes répertoriés.

3.1.2. Recherche de *Salmonella* : manipulation 26

Recherche de *Salmonella* dans une tranche de viande : manipulation 26.

3.2. Recherche et identification des *Escherichia coli* entéropathogènes

3.2.1. Identification des *E. coli* entéropathogènes : manipulation 27

Identification des *E. coli* entéropathogènes par agglutination sur lame : manipulation 27.

3.2.2. Identification des *E. coli* O 157 entérohémorragiques : manipulations 28 et 29

Identification des *E. coli* O 157 entérohémorragiques par agglutination de particules de latex sensibilisées : manipulation 28.

Identification des *E. coli* O 157 entérohémorragiques par la recherche des vérotoxines 1 et 2 (VT1 et VT2) : manipulation 29.

3.2.3. Recherche d'*E. coli* O 157 : H7 manipulation 30

Recherche des *E. coli* O 157 : H7 dans une viande par la méthode directe Blot Elisa : manipulation 30.

3.3. Recherche et identification des vibrions entéro-pathogènes

3.3.1. Méthodologie de la recherche de vibrions entéro-pathogènes dans un produit alimentaire (NF V.08024)

La recherche de vibrions entéro-pathogènes dans des aliments nécessite un enrichissement en bouillon sélectif, leur isolement sélectif et leur identification à partir des colonies suspectes observées sur milieux sélectifs.

3.3.1.1. Enrichissement

Le principe des milieux d'enrichissement utilisés repose sur les propriétés suivantes des vibrions :

- croissance rapide sur les milieux peptonés ;
- aptitude à se multiplier dans des milieux très alcalins ;
- halophilie de toutes les espèces, sauf *Vibrio cholerae* ;
- résistance à la polymyxine B.

Les formules des trois principaux milieux utilisés sont les suivantes :

Composition du milieu de base	
- Peptone	10,0 g
- Extrait de levure	3,0 g
- NaCl	20 g
- Eau	1 000 mL
pH 7,4 à 25°C	
Solution de polymyxine B	
- Polymyxine B	100 000 UI
- Eau	100 mL
Stériliser par filtration.	
Composition du milieu complet	
Ajouter extemporanément et stérilement 200 mL de polymyxine B à 900 mL de milieu de base préalablement refroidi. Répartir à raison de 10 mL par tube.	

Tableau 21 – Bouillon salé à la polymyxine (SPB)

- Peptone	20,0 g
- NaCl	30 g
- Eau	1 000 mL
Ajuster le pH 8,6 à 25 °C après stérilisation (121 °C, 15 min).	
Répartir à raison de 10 mL par tube.	

Tableau 22 – Eau peptonée alcaline (double concentration)

- Peptone	10,0 g
- Extrait de viande	3,0 g
- Glucose	5,0 g
- NaCl	30 g
- Méthyl violet	0,004 g
- Laurylsulfate de sodium	8 g
- Eau	1 000 mL
Ajuster le pH 8,6 à 25 °C après stérilisation (121 °C, 15 min).	
Répartir à raison de 10 mL par tube.	

Tableau 23 – Bouillon glucosé salé au lauryl sulfate de sodium (double concentration)

Les milieux d'enrichissement sont inoculés avec 10 mL d'une suspension mère au 1/3. C'est pourquoi leur formule est prévue à double concentration. Ils sont incubés à 35 ou 37 °C pendant 7 à 8 heures afin d'éviter le développement des autres bacilles Gram –.

3.3.1.2. Milieux pour l'isolement sélectif

Le milieu le plus utilisé est le milieu TCBS (thiosulfate de sodium, citrate de sodium, bile de bœuf, saccharose). C'est un milieu très sélectif qui inhibe la plupart des entérobactéries et des bactéries Gram+ (à l'exception des entérocoques). Il est généralement associé à un milieu moins sélectif comme la gélose à la tryptone, à la peptone de soja et au chlorure de triphényltétrazolium (TSAT).

– Extrait de levures	5 g
– Peptone	10 g
– Saccharose	20,0 g
– Bile de boeuf desséchée	8,0 g
– Thiosulfate de sodium	10 g
– Citrate de fer (III)	1,0 g
– NaCl	10,0 g
– Agar	8 à 18 g
– Bleu de bromothymol	0,04 g
– Bleu de thymol	0,04 g
– Eau distillée	1 L
pH = 8,6	

Tableau 24 – Milieu TCBS

Les vibrions forment, sur ce milieu, des colonies de 2 à 3mm de diamètre et deviennent, après 24 heures d'incubation, soit jaunes (vibrions saccharose+), soit vertes (vibrions saccharose-, c'est le cas de *Vibrio parahaemolyticus*). Les entérocoques donnent des colonies jaunes beaucoup plus petites et donc faciles à distinguer.

Composition du milieu de base	
– Tryptone	15,0 g
– Peptone de soja	5,0 g
– NaCl	30 g
– Sels biliaires	0,5 g
– Agar	8,0 g à 18,0 g
– Eau	1 000 mL
Ajuster le pH à 7,1 à 25°C après stérilisation (121 °C, 15 min).	
Solution à 1 % de chlorure de triphényltétrazolium	
– Chlorure de triphényltétrazolium	0,1 g
– Eau	10 mL
Milieu complet	
Ajouter stérilement 3 mL de la solution de chlorure de triphényltétrazolium à 1 000 mL de milieu de base préalablement refroidi à 45 °C.	

Tableau 25 – Gélose à la tryptone, à la peptone de soja et au chlorure de triphényltétrazolium (TSAT)

Sur ce milieu, les colonies de *Vibrio parahaemolyticus* sont lisses et plates, de 2 à 3 mm de diamètre, rouge foncé du fait de la réduction du chlorure de triphényltétrazolium.

Au moins cinq colonies suspectes sont repiquées sur gélose nutritive salée (à 30 g/L de NaCl) afin de conduire l'identification.

3.3.1.3. Identification

L'identification de *Vibrio parahaemolyticus* est réalisée sur la base des caractères phénotypiques suivants :

- bacille Gram-, très mobile, aéro-anaérobie, oxydase +, réduisant les nitrates en nitrites ;
- glucose+ ;
- gaz en glucose+ ;
- saccharose- ;
- lactose- ;
- ONPG hydrolase- ;
- H₂S- ;
- LDC+ ;
- indole+.

3.3.1.4. Examens présomptifs

• Recherche de l'oxydase

Prélever une parcelle de colonie à l'aide d'une pipette Pasteur et transférer cette culture sur un disque préimprégné commercialisé. L'apparition d'une teinte mauve, violette, virant au noir signe la production d'une oxydase.

• Examen microscopique

Préparer avec le reste de la colonie une suspension dans un petit volume d'eau physiologique stérile.

Réaliser une préparation à l'état frais et une coloration de Gram. Rechercher les aspects microscopiques décrits précédemment pour les vibrions.

3.3.1.5. Examens biochimiques

Chaque colonie suspecte est soumise à des examens présomptifs, puis est ensemencée sur une galerie minimum à l'aide de la suspension réalisée pour les examens microscopiques. La galerie minimum est constituée des milieux suivants :

- milieu VF ou VL salé à 30 g/L, pour vérifier le type respiratoire ;
- bouillon nitraté à 1 g/L et salé à 30 g/L, pour rechercher la capacité de la bactérie à réduire les nitrates en nitrites ;
- gélose TSI salée (à 30 g/L) : *Vibrio parahaemolyticus* donne une pente rouge (saccharose et lactose-), un culot jaune (glucose+) sans gaz (gaz en glucose-) ; on n'observe pas de noircissement (H₂S-). Le milieu TSI fournit la culture permettant, après incubation, de rechercher l'ONPG hydrolase ;
- milieu de type bouillon de Moeller, salé (à 30 g/L), pour la recherche de la LDC ;
- milieu tryptone-tryptophane salé pour la recherche de la production d'indole.

- Tryptone	10,0 g
- DL tryptophane	1,0 g
- NaCl	30 g
- Eau	1 000 mL

Tableau 26 – Composition du milieu tryptone tryptophane salé

On peut aussi ensemencer une galerie miniaturisée de type API 20E.

3.3.2. Recherche et identification des vibrions entéropathogènes

Recherche et identification des vibrions entéropathogènes dans les coquillages marins : manipulation 31

3.4. Recherche et identification des *Campylobacter*

3.4.1. Méthodologie de l'isolement et de l'identification de *C. jejuni* à partir des produits biologiques (selles, aliments)

3.4.1.1. Milieux d'enrichissement

L'isolement sélectif de *C. jejuni* à partir d'un prélèvement alimentaire peut être utilement précédé d'un enrichissement. Trois milieux peuvent être utilisés :

- le bouillon thioglycolate additionné d'agar à 0,16 % et des antibiotiques du milieu Campyloset. Il est incubé une nuit à + 4 °C ;
- le milieu de Preston additionné de sulfate de fer, métabisulfite de sodium et pyruvate de sodium (mélange FBP), incubation durant 18 heures à 37 °C ;
- le milieu de Park et Sanders.

3.4.1.2. Milieux de l'isolement sélectif de *C. jejuni*

• Milieu de Skirrow

Le premier milieu conçu pour l'isolement sélectif des *Campylobacter* a été mis au point par Skirrow. Il comprend une base nutritive (Columbia, Mueller-Hinton...), 7 % de sang de cheval lysé, et un mélange de trois antibiotiques : triméthoprime à 5 mg/L, vancomycine à 10 mg/L et 2 500 unités/L de polymyxine B. Triméthoprime et polymyxine inhibent, aux concentrations utilisées, la plupart des bacilles à Gram négatif de la flore fécale. La vancomycine inhibe les bactéries à Gram positif. Le sang lysé est nécessaire pour neutraliser les dérivés toxiques de l'oxygène comme les peroxydes ou les superoxydes auxquels les *Campylobacter* sont particulièrement sensibles.

Le pouvoir inhibiteur du milieu de Skirrow (Oxoid, Difco, Merck) est considéré comme assez faible et les cultures obtenues à partir d'isollements de selles sont souvent envahies par des bactéries de la flore fécale non inhibées, en particulier des souches de *Proteus* ou de *Pseudomonas*, ce qui gêne l'exploitation de l'isolement. Cependant, pour isoler *C. jejuni* à partir d'un produit alimentaire (dont la flore associée est moins dense), le milieu de Skirrow reste un des plus adaptés.

• Autres formules plus sélectives

L'amphotéricine B permet l'inhibition de la croissance des levures. L'addition de céphalosporines et (ou) de colistine est très efficace pour inhiber les autres bactéries à Gram négatif. La céfopérazone est la substance la plus active sur les *Pseudomonas*. Le milieu Campy-BAP (Difco) associe la céfalotine et l'amphotéricine B aux inhibiteurs du milieu de Skirrow ; il est enrichi par du sang de mouton. Le milieu Campyloset (bioMérieux) utilise la formule de Butzler qui associe la gélose Columbia, 5 % de sang de mouton, 15 mg/L de céfopérazone, 10 000 U/L de colistine, 2 mg/L d'amphotéricine B et 10 mg/L de vancomycine.

Ces mélanges présentent cependant pour inconvénient d'inhiber certaines souches de *C. jejuni*, ainsi que les souches fragilisées par un traitement (chaleur, froid, dessiccation), mais qui restent viables. Bien que très utiles en biologie médicale, ils ne sont donc pas recommandés pour l'isolement de *C. jejuni* à partir d'un aliment faiblement contaminé.

• Milieux dépourvus de sang

Dans les milieux de Bolton et de Karmali, le charbon remplace le sang pour neutraliser les substances toxiques des bases nutritives et les dérivés toxiques de l'oxygène. Le charbon est associé à du pyruvate de sodium dans les deux milieux, à de l'hydrolysate de caséine et du sulfate ferreux dans le milieu de Bolton et à de l'hématine dans le milieu de Karmali. Il est aujourd'hui acquis que les milieux au charbon sont aussi efficaces que les milieux au sang pour l'isolement sélectif de *C. jejuni*.

3.4.1.3. Critères et méthodes d'identification de *C. jejuni*

Les cultures sont examinées après 48 à 72 heures d'incubation en atmosphère micro-aérophile. Cette atmosphère, constituée de 5 % d'O₂, 10 % de CO₂ et 85 % de N₂, peut être obtenue en utilisant la jarre anaérobie et un sachet Gas Pack H₂ + CO₂ sans catalyseur ou des générateurs de gaz spécialement conçus et commercialisés pour cet usage. *C. jejuni* et *C. coli* se développent mieux à 42 °C qu'à 37 °C. Les milieux sont donc incubés à 42 °C.

Sur l'isolement, on recherche des colonies rondes, lisses, bombées ou plates, ayant tendance à l'envahissement. Sur ces colonies suspectes, l'identification du genre *Campylobacter* est réalisée par des examens microscopiques, la recherche de l'oxydase et de la catalase (Voir tableau 31).

Les *Campylobacter* sont des bacilles fins, incurvés en virgule ou en forme de S, Gram-, très mobiles (déplacement en « vol de moucheron »), oxydase+ et catalase généralement positive pour les espèces recherchées.

Espèces	Catalase	Réduction des nitrates	H ₂ S sur TSI	Hydrolyse de l'hippurate	Croissance à 25 °C	Croissance à 42 °C	Sensibilité à l'acide nalidixique	Sensibilité à la céfalotine
<i>C. fetus subsp fetus</i>	+	+	-	-	+	-	R	S
<i>C. fetus subsp venerealis</i>	+	+	-	-	+	-	R	S
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	V	-	+	+	R	S
<i>C. sputorum subsp sputorum</i>	-	+	-	-	-	+	S	S
<i>C. sputorum subsp bubulus</i>	-	+	-	-	-	+	R	S
<i>C. sputorum subsp faecalis</i>	+	+	-	-	-	+	R	S
<i>C. jejuni subsp jejuni</i>	+	+	-	+	-	+	S	R
<i>C. jejuni subsp doylei</i>	V	-	-	V	-	-	S	S
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	-	+	S	R
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	-	+	R	R
<i>C. upsaliensis</i>	V	+	-	-	-	+	S	S
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	-	-	+	R	S
<i>C. concisus</i>	-	+	+	-	-	+	R	R
<i>C. curvus*</i>	-	+	+	-	-	+	S	ND
<i>C. rectus*</i>	-	+	+	-	-	V	S	ND

S : sensible ; R : résistant ; V : variable selon les souches ; ND : non détectable ; + : plus de 90 % de souches possèdent le caractère ; - : plus de 90 % de souches ne possèdent pas le caractère.
* Espèces oxydase-

Tableau 27 – Critères de l'identification des espèces du genre *Campylobacter*

La mise en évidence, chez un *Campylobacter*, de sa capacité à hydrolyser l'hippurate identifie pratiquement l'espèce *jejuni*. Sa résistance à la céfalotine et sa sensibilité à l'acide nalidixique, l'aptitude à se développer à 42 °C identifient *C. jejuni subsp jejuni*, agent de la presque totalité des campylobactérioses.

• Galerie d'identification

Les colonies à examiner sont ensemencés dans un bouillon *Brucella*. Après 48 heures d'incubation, on obtient une culture de densité suffisante pour servir à l'inoculation des milieux d'identification.

– Ensemencer deux bouillons *Brucella*. Incuber l'un d'entre eux à 25 °C, l'autre à 42 °C.

– Ensemencer largement un milieu de Mueller-Hinton au sang. Placer sur chaque moitié de boîte un disque de céfalotine et un disque d'acide nalidixique. Incuber en micro-aérophilie à 42 °C.

La réduction des nitrates peut être étudiée sur bouillon *Brucella* supplémenté par 1 % de nitrate de potassium. La production d'H₂S est observée sur milieu de Kligler ou milieu TSI après 5 jours d'incubation en atmosphère micro-aérophile.

• Technique de la recherche de l'hydrolyse de l'hippurate

– Faire une suspension de la souche étudiée dans un faible volume (0,4 mL) d'une solution d'hippurate à 1 % en tampon PBS pH 7,2.

– Incuber 2 heures au bain d'eau à 37 °C.

– Ajouter 0,2 mL d'une solution extemporanée de ninhydrine à 3,5 % en mélange butanol acétate (50/50) et examiner 10 minutes plus tard.

L'hydrolyse de l'hippurate se traduit par l'apparition d'une coloration violette. Ainsi, le jour même de l'obtention d'une culture sur le milieu d'isolement sélectif, l'identification de *C. jejuni* est possible par la mise en oeuvre de ce test. Les autres caractères sont étudiés pour confirmation.

3.4.2. Recherche de *Campylobacter jejuni*

Recherche de *Campylobacter jejuni* dans les denrées alimentaires : manipulation 32

3.5. Recherche et identification des *Listeria*

3.5.1. Méthodologie de l'isolement et de l'identification des *Listeria* à partir de denrées alimentaires par les méthodes traditionnelles

La recherche de *Listeria monocytogenes* dans les produits laitiers nécessite au moins quatre phases successives : un enrichissement en milieu sélectif, un isolement sélectif et identification présomptive, une confirmation de l'identité de l'espèce.

3.5.1.1. Milieux d'enrichissement : formule de Fraser

Composition du bouillon de base (Oxoïd Code CM 895) – Protéose peptone 5 g – Tryptone 5 g – Extrait de viande de bœuf 5 g – Extrait de levures 5 g – NaCl 20 g – Na ₂ HPO ₄ 12 g – Na H ₂ PO ₄ 1,35g – Esculine 1 g – Chlorure de lithium 3 g – Eau 1 000 mL pH : 7,2	Supplément de Fraser (Oxoïd code SR 156), par flacon : – Citrate de fer ammoniacal 0,25 g – Acide nalidixique 10 mg – Acriflavine 12,5 mg Composition du milieu de Fraser Ajouter un flacon de supplément pour 500 mL de bouillon de base. Composition du milieu de « Fraser demi » Ajouter un flacon de supplément pour un litre de bouillon de base.
---	--

Tableau 28 – Composition du milieu de Fraser

Les agents sélectifs sont représentés par l'acide nalidixique, l'acriflavine et le chlorure de lithium.

D'autres formules existent : le bouillon EB associe l'acide nalidixique, l'acriflavine et la cycloheximide ; le bouillon Dominguez associe l'acide nalidixique et la polymyxine.

Les cultures obtenues sur les milieux d'enrichissement sont ensuite inoculées sur des milieux sélectifs gélosés.

Dans le cas des produits laitiers, on procède à deux enrichissements successifs : le premier sur un bouillon de « Fraser demi », le deuxième sur un bouillon de Fraser.

3.5.1.2. Milieux de l'isolement sélectif des *Listeria*

• Milieu Oxford

Composition de la base gélosée (Oxoïd CM 856) – Gélose Columbia 39 g – Esculine 1 g – Citrate ammoniacal ferrique 0,5 g – Chlorure de lithium 15 g pH 7,0	Supplément (Oxoïd SR 140E), par flacon : – Cycloheximide 200 mg – Colistine 10 mg – Acriflavine 2,5 mg – Céfotétan 1 mg – Fosfomycine 5 mg Composition du milieu Oxford Ajouter le contenu d'un flacon de supplément à 500 mL de milieu gélosé de base.
---	--

Tableau 29 – Composition du milieu Oxford

La sélectivité de ce milieu est assurée par les cinq constituants du supplément. Les *Listeria* forment en 24 heures des colonies grises ou gris verdâtre, luisantes, d'environ 1mm de diamètre, entourées d'un halo brun-noir. Après 48 heures d'incubation, elles ont 2 mm de diamètre, sont incrustées dans la gélose et présentent une dépression centrale.

• Milieu Palcam

<p>Composition de la gélose de base (Oxoid CM 877)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gélose Columbia 39g - Extrait de levures 3 g - Esculine 0,8g - Citrate ammoniacal ferrique 0,5g - Glucose 0,5g - Mannitol 10 g - Rouge de phénol 0,08g - Chlorure de lithium 15g <p>pH 7,2</p>	<p>Supplément (Oxoid SR 150E), par flacon</p> <ul style="list-style-type: none"> - Polymyxine B 5 mg - Acriflavine 2,5 mg - Céfotaxime 10 mg <p>Composition du milieu Palcam Ajouter le contenu d'un flacon de supplément, reconstitué avec 2 mL d'eau stérile à 500 mL de milieu gélosé de base stérilisé 15 minutes à 115 °C puis refroidi à 50 °C.</p>
---	--

Tableau 30 – Composition du milieu Palcam

Les colonies de *Listeria* ont un aspect voisin de celui observé sur gélose Oxford, mais sont de couleur verdâtre.

3.5.1.3. Critères et méthodes d'identification de *Listeria monocytogenes*

• Critères de l'identification du genre *Listeria*

L'identification du genre *Listeria* s'établit à l'aide des examens suivants :

– Examen des colonies sur milieu Tsaye

<ul style="list-style-type: none"> - Bouillon tryptone soja 30 g - Extrait de levures 6 g - Agar 12 à 18 g <p>pH : 7,2</p>

Composition du milieu Tsaye (Oxoid CM862)

Repiquer en stries les colonies sélectionnées sur les milieux sélectifs Oxford ou Palcam.

Les colonies de *Listeria* mesurent environ 1mm de diamètre, elles sont translucides, non pigmentées. Soumises à un éclairage oblique par-dessous (45°, illumination de Henry) et examinées par-dessus, les colonies de *Listeria* sont de couleur bleue et présentent une surface granuleuse.

– Recherche de la catalase

Sur une lame, mettre une colonie en suspension dans une goutte d'eau oxygénée à 3 %. Une réaction positive se traduit par la formation de bulles de gaz. Les *Listeria* sont catalase +.

– Recherche de la mobilité

L'examen de la mobilité est réalisé sur une préparation à l'état frais d'une gouttelette de bouillon TSBYE inoculé avec une colonie suspecte et incubé à 20-25 °C pendant 8 à 24 h. La mobilité des *Listeria* est lente, « en pirouette ». Développées à une température supérieure à 25 °C, les cultures peuvent ne pas présenter cette mobilité.

On peut également rechercher la mobilité en inoculant en piqûre centrale une gélose molle de type SIM (Oxoid CM435).

– Coloration de Gram

• Tests de confirmation de l'espèce *Listeria monocytogenes*

– Caractère hémolytique

L'hémolyse est mise en évidence sur gélose trypticase-soja au sang de mouton ou de cheval.

Bien sécher la surface de la gélose avant l'utilisation. Inoculer la gélose par piqûres à partir de colonies prélevées sur milieu Tsaye. Incuber à 37 °C pendant 48 h.

Listeria monocytogenes donne des zones claires, étroites et légères de β-hémolyse.

– Camp-test

– Ensemencer chacune des deux cultures de *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi* en une strie simple sur la gélose trypticase-soja au sang de mouton, de manière à ce que les deux stries soient parallèles et diamétralement opposées. Il est nécessaire que l'inoculum soit étroit et régulier. Pour cela, maintenir, pendant l'ensemencement, l'anse perpendiculaire à la gélose ; de façon similaire, et perpendiculairement à ces cultures, ensemencer la souche d'essai, de sorte que la touche d'essai et celles de *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi* ne se touchent pas, mais ne soient séparées que de 1 à 2 mm. Plusieurs souches peuvent être testées sur la même boîte.

– Incuber à 37 °C pendant 18 à 24 h.

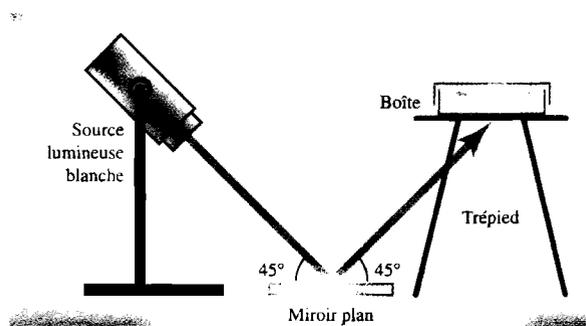


Fig. 10 – Illumination de Henry

La réaction est considérée comme positive si l'on observe une augmentation de la zone de β -hémolyse à l'intersection de chacune des souches d'essai et de celles des cultures de *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*. La réaction avec *Rhodococcus equi* se traduit par la présence d'une large zone d'hémolyse (5 à 10 mm) « en pelle ». De petites zones d'hémolyse à l'intersection de la culture d'essai avec celle de *Rhodococcus equi* sont considérées comme négatives.

Une réaction positive avec *Staphylococcus aureus* se manifeste sous la forme d'une petite zone arrondie d'hémolyse accentuée, ne s'étendant qu'à 2 mm environ de la souche d'essai et dans la zone légèrement hémolytique due à la croissance de *S. aureus*. *Listeria monocytogenes* ne donne un Camp-test positif qu'avec *Staphylococcus aureus*.

– Utilisation des glucides

Inoculer, avec 0,1 mL de culture en TSYE, des bouillons protéose-peptone au pourpre de bromocrésol additionnés de 1 % des glucides à tester : D-xylose, L-rhamnose, mannitol, D-ribose. Le virage de l'indicateur traduit l'utilisation des glucides.

Listeria monocytogenes ne métabolise que le L rhamnose.

Une alternative est l'ensemencement d'une galerie API *Listeria*.

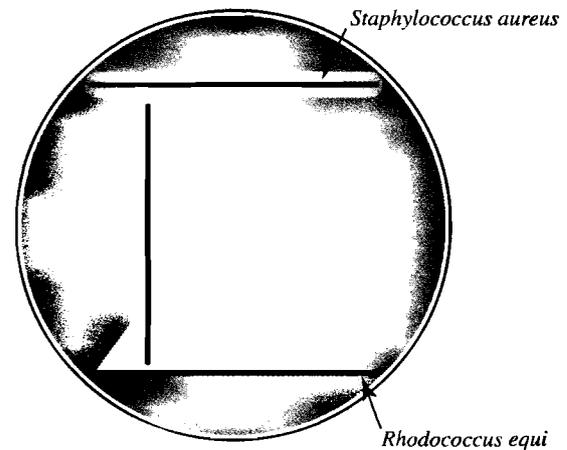


Fig. 11 – Réalisation du Camp-test sur gélose au sang

3.5.2. Recherche de *Listeria monocytogenes*

Recherche de *Listeria monocytogenes* dans les produits laitiers par la méthode traditionnelle normalisée (Norme AFNOR V 08-055) : manipulation 33

3.5.3. Méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* par hybridation moléculaire et par utilisation d'une sonde froide (protocole Gene-Trak *Listeria* de Diagnostics nouveaux alimentaires (DNA))

3.5.3.1. Méthodologie générale

Après enrichissement sur un milieu sélectif liquide, les cultures sont étalées sur un milieu sélectif gélosé. À partir de ces cultures sont préparées des suspensions épaisses qui seront soumises à un double traitement, afin de libérer les ARN ribosomiaux :

- prétraitement au lysozyme pour lyser le peptidoglycane de la paroi bactérienne ;
- traitement avec une solution de soude pour dénaturer les protéines et détruire la membrane plasmique.

Au terme de cette étape, les constituants bactériens sont libérés, en particulier l'ARN ribosomal libre (les protéines sont dénaturées). C'est une séquence nucléotidique de l'ARN ribosomal, spécifique de *Listeria monocytogenes*, qui sera mise en évidence par hybridation, d'une part avec une sonde de détection dont la séquence est complémentaire et marquée à la fluorescéine, d'autre part avec une sonde permettant la « capture » du duplex formé. La fixation sur le support est réalisée à l'aide d'une séquence oligo dT présente sur la sonde de capture. Après lavage, un anticorps antifluorescéine marqué par une enzyme (peroxydase de raifort : HRP) reconnaît la fluorescéine. La révélation sera réalisée par ajout d'un substrat chromogène dans le milieu et mesure de l'absorbance du produit coloré de la réaction enzymatique.

3.5.3.2. Principe de la détection par hybridation moléculaire

Après lyse des bactéries, deux sondes d'ADN (sonde de capture et sonde de détection), homologues de deux séquences spécifiques d'un ARN ribosomal cible sont mises en présence de la suspension traitée. Si l'échantillon contient *Listeria monocytogenes*, ces sondes s'hybrident sur des régions adjacentes d'une même molécule d'ARN ribosomal de la bactérie.

• Hybridation de la sonde de détection

La sonde de détection comprend 35 à 40 nucléotides complémentaires d'une séquence spécifique de l'ARN ribosomal de *Listeria monocytogenes* ; elle est marquée par la fluorescéine à ses deux extrémités. Elle forme, à 65 °C, une molécule hybride avec la séquence d'ARN ribosomal homologue.

• Capture de la molécule hybride

La sonde de capture contient une queue de polyA du côté 3' de la sonde. Son rôle est de capturer les molécules hybrides formées (sonde de détection-ARN ribosomal) par hybridation spécifique avec une autre séquence de l'ARN ribosomal et de les fixer sur le support par son extrémité poly dA qui s'hybride avec une séquence poly dT préalablement fixée sur le support solide (dipstick). Un lavage permettra d'éliminer les sondes non fixées sur le dipstick.

• **Détection par méthode immunoenzymatique**

L'existence de molécules hybrides est révélée par une réaction immunoenzymatique : après fixation, le complexe est mis en présence d'anticorps anti-fluorescéine marqués à la peroxydase.

Après lavage, l'immun complexe formé est révélé par l'addition d'un substrat chromogène de la peroxydase : la benzidine. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration bleue. L'arrêt de la réaction par ajout d'acide sulfurique modifie la coloration qui passe de bleu à jaune et qui sera mesurée par lecture de l'absorbance au spectrophotomètre. Les lavages intervenant entre chaque étape sont essentiels à la réussite de la manipulation.

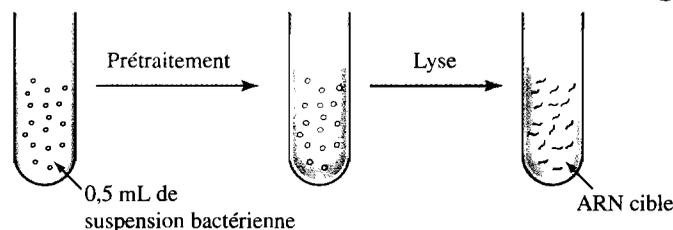
Préparation de l'échantillon

25 g d'échantillon dans 225 mL de milieu de Frazer
Incubation à 30 °C 24 h

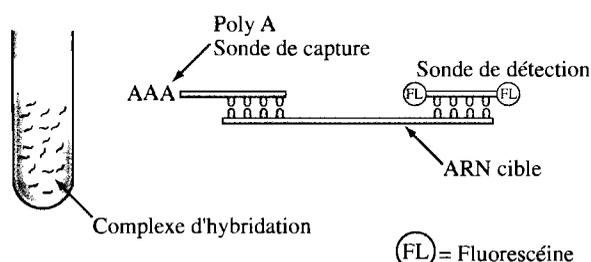
↓
Isolement de 0,1 mL sur milieu Oxford

↓
Récupérer les colonies
et remettre en suspension dans 1 mL de PBS

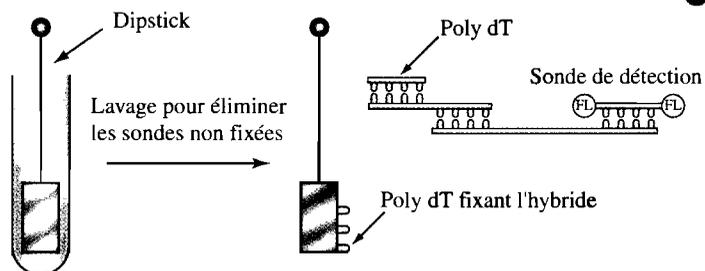
1 Lyse des bactéries



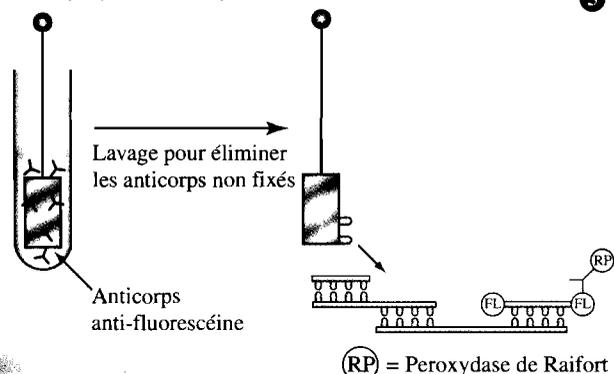
Réaction d'hybridation



3 Capture du complexe d'hybridation



Marquage enzymatique



5 Développement de la coloration

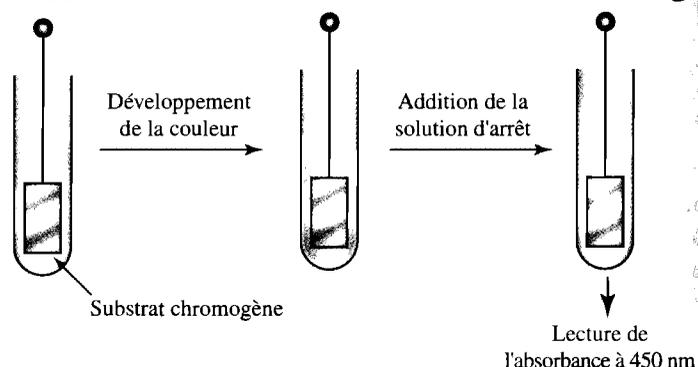


Fig. 12 – Principe d'une sonde froide utilisant le système Gene-Trak

3.5.4. Recherche de *Listeria monocytogenes*

Recherche de *Listeria monocytogenes* dans un produit laitier par hybridation de sondes froides : manipulation 34.

3.6. Recherche et identification de *Staphylococcus aureus*

3.6.1. Méthodologie de la recherche de *Staphylococcus aureus* dans un produit alimentaire

3.6.1.1. Principe général

La recherche de *Staphylococcus aureus* dans un aliment comprend plusieurs étapes.

- Broyage, homogénéisation et dilution au 1/10 de l'aliment

- **Enrichissement en bouillon lactosé hypersalé (facultatif)**

- Extrait de viande de bœuf	3 g
- Peptone de caséine ou tryptone	5 g
- Protéose peptone	5 g
- Lactose	7,5 g
- Chlorure de sodium	75 g
- Bacto-agar	0,5 g
- Eau	1 000 mL

Tableau 31 – Composition du bouillon lactosé hypersalé

La sélectivité du bouillon est due à la propriété des staphylocoques de se développer en présence de 7,5 % de Na Cl. On peut aussi utiliser le milieu de Buttiaux et Cantoni.

- **Isolement sélectif de la culture obtenue sur le milieu d'enrichissement**

On utilise les propriétés sélectives du milieu de Baird-Parker.

Milieu de base	
- Tryptone	10,0 g
- Extrait de levure	1,0 g
- Extrait de viande	5,0 g
- Glycocolle	12,0 g
- LiCl	5,0 g
- Agar-agar	12 à 20 g
- Eau	1000 mL
Solution de tellurite (stérilisée par filtration)	
- Tellurite de potassium	1,0 g
- Eau	100 mL
Solution de pyruvate (stérilisée par filtration)	
- Pyruvate de sodium	20,0 g
- Eau	100 mL
Émulsion de jaune d'œuf à environ 20 %	
Utiliser une préparation commerciale.	
Milieu complet	
- Milieu de base	90 mL
- Solution de tellurite de potassium	1,0 mL
- Solution de pyruvate de sodium	5,0 mL
- Émulsion de jaune d'œuf	5,0 mL
Faire fondre le milieu de base, le refroidir à environ 50 °C, ajouter les solutions en mélangeant soigneusement après chaque transfert. Couler en boîtes de Petri à raison de 15 à 20 mL.	

Tableau 32 – Composition du milieu de Baird-Parker

La sélectivité du milieu lui est conférée par sa concentration en tellurite et par le chlorure de lithium.

- **Repérage des colonies suspectes sur le milieu de Baird-Parker**

Les colonies typiques de *Staphylococcus aureus* sont :

- typiquement noires, brillantes et convexes (1, à 1,5 mm après 24 h d'incubation, 1,5 à 2,5 mm après 48 h d'incubation), entourées d'une zone claire qui peut être partiellement opaque ;
- non caractéristiques : elles sont analogues aux précédentes, mais dépourvues de zone claire.

- **Identification de *Staphylococcus aureus***

À partir de ces colonies, *Staphylococcus aureus* est identifié par la recherche de la coagulase libre ou (et) d'un récepteur au fibrinogène.

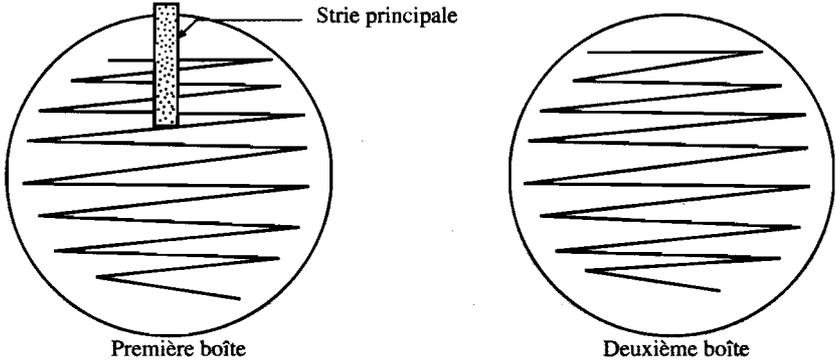
3.6.2. Recherche de *Staphylococcus aureus*

Recherche de *Staphylococcus aureus* dans une gélatine alimentaire (Norme NF V 59-105) : manipulation 35.

3.6.3. Recherche de l'entérotoxine staphylococcique

Recherche de l'entérotoxine staphylococcique dans les produits laitiers par méthode immunoenzymatique : manipulation 36.

Recherche de *Salmonella* dans une tranche de viande

Prélèvement et réalisation de la suspension mère au 1/10	<p>Dégager la tranche de viande de son conditionnement et découper, à l'aide d'un couteau ou d'un bistouri, une languette dans la zone médiane du morceau de viande, perpendiculairement à son grand axe. Découper cette languette en petits fragments qui seront placés dans le flacon taré de l'homogénéisateur ou dans le sac plastique du Stomacher. Soit m (au moins 25 g) la masse prélevée. Ajouter 9 mL d'eau peptonée tamponnée. Homogénéiser 1 à 2 minutes à l'homogénéisateur péristaltique. Si l'on utilise l'homogénéisateur rotatif, le nombre total de tours devra être compris entre 15 000 et 20 000, et le temps d'homogénéisation ne pas excéder 2 min 30.</p> <p>Laisser sédimenter 10 à 15 minutes les plus grosses particules, puis prélever, avec une grosse pipette, 20 à 50 mL dans la couche supérieure. On obtient ainsi la suspension mère.</p>
Pré-enrichissement	<p>Incuber la suspension mère pendant 16 à 20 heures à 37 °C.</p>
Enrichissement	<p>Transférer 0,1 mL de la culture obtenue par le préenrichissement dans 10 mL de bouillon de Rappaport Vassiliadis et 10 mL de la même culture dans 100 mL de bouillon au sélénite. Incuber le premier ensemencement à 42 °C et le deuxième à 37 °C.</p>
Isolements sélectifs	<p>Après 24 à 48 heures d'incubation, étaler le contenu d'une anse de chaque milieu d'enrichissement sur deux milieux sélectifs coulés dans une grande boîte de Petri : une gélose lactosée au vert brillant et au rouge de phénol, et un deuxième milieu, au choix du laboratoire : SS, Hektoen, Rambach... On peut utiliser, pour chaque milieu, une grande boîte de Petri (diamètre 120 mm) ou deux boîtes de diamètre habituel (90 mm) sur lesquelles l'inoculum est épaisé en stries selon la méthode normalisée schématisée ci-dessous. Incuber les cultures à 37 °C pendant 18 à 24 heures.</p> <div style="text-align: center;">  <p>Strie principale</p> <p>Première boîte</p> <p>Deuxième boîte</p> <p>Technique d'isolement en deux boîtes</p> </div>
Repérage des colonies suspectes	<p>Les colonies suspectes sont repérées par les caractères biochimiques révélés sur le milieu d'isolement : lactose et saccharose-, H₂S+ ou -. L'identification doit être conduite, à partir de chaque isolement, sur au moins 5 colonies. Si l'isolement ne présente pas 5 colonies suspectes, les retenir toutes. Chaque colonie suspecte est ensemencée en stries sur une gélose nutritive coulée en boîte de Petri. Afin de limiter le nombre de boîtes ensemencées, on procédera à un « screening » par une des techniques présentées précédemment.</p>

Si aucune colonie suspecte n'est observée ou si la culture est pauvre, ensemercer à nouveau les mêmes milieux d'isolement sélectifs à partir des bouillons d'enrichissement.

Ensemencement d'une galerie biochimique d'identification

On ensemece :

- une galerie traditionnelle minimum comprenant les milieux TSI, tryptone-tryptophane, à l'urée de Christensen, Clark et Lubs, milieu pour la recherche de la LDC, gélose nutritive inclinée (pour réaliser le sérotypage) ;
- une galerie miniaturisée adaptée (API 20E ou API 10E)

Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.

Lecture des caractères biochimiques

Ils permettent l'identification du genre *Salmonella*.

Sérotypage

Il est réalisé par une technique d'agglutination directe sur lame mettant en jeu les bactéries à sérotyper et différents antisérums. Il nécessite :

- une culture pure de *Salmonella* sur gélose non sélective (une gélose nutritive inclinée est recommandée car l'atmosphère y est plus humide et les flagelles s'y expriment mieux) ;
- des antisérums spécifiques ;
- un tableau de Kauffmann White.

Sont commercialisés :

- **Des sérums mélanges O (OMA, OMB, OMC...) et des sérums mélanges H (HMA, HMB, HMC...) dont la composition est la suivante**

Nom	Composition	Groupes de <i>Salmonella</i> agglutinées
OMA	1,2,3,4,5,9,10,12,19,21,46	A, B, D, E, L
OMB	6,7,8,11,13,14,20,22,23,24	C, F, G, H
OMC	16,17,18,28,30,35,38	I, J, K, L, M, N, O, P
OMD	39,40,41,42,43,44,45	Q, R, S, T, U, V, W
OMF	47,48,50,51,52,53	X, Y, Z
HMA	a, b, c, d, i, z10, z29	
HMB	e, h, n, x, G	
HMC	h, r, y, z, L, Z4	
HMD	z35, z36, z38, z39, z41, z42, z44, z60	
HM III	z52, z53, z54, z55, z56, z57, z61	
H1	1, 2, 5,6,7, z6 (phase 2)	
HL	l, v, w, z13, z28, z40	
HE _n	e, n, x, z15	
HZ ₄	z4, z23, z24, z32	
HG	f, g, p, m, s, t	

Principaux sérums mélanges

- **Des sérums monovalents O et H.**

Les sérums monovalents commercialisés par Sanofi Diagnostics Pasteur sont :

Anti-O	Anti-H	Anti-O	Anti-H	Anti-O	Anti-H
1, 2	a w	8	g, m z10	15	k 6
4, 5	b x	9	g, p z15	1, 3, 19	m 7
6, 7, 8	c y	3, 10, 15	h 2	11	p
7	d z	10	i 5	13, 22, 23	r
				6, 14, 24	v

Principaux sérums monovalents

- **Technique du sérotypage**

- Déposer une goutte d'antisérum sur une lame de verre parfaitement propre.
- Mettre en suspension une parcelle de culture de *Salmonella* de façon à obtenir un trouble homogène.
- Agiter la lame par mouvements lents et réguliers et observer l'apparition ou non d'agglutinats bien distincts. Les agglutinats obtenus avec les sérums anti-O sont fins et granulaires, difficiles à dissocier, ceux obtenus avec les sérums anti-H sont floconneux et faciles à dissocier.

• Conduite du sérotypage

– Rechercher l'agglutination en eau physiologique.

Le sérotypage ne pourra être poursuivi qu'en cas de réaction négative. Une réaction positive signerait le caractère autoagglutinant de la souche (souche *rough*) qui, de ce fait, réagirait avec tous les sérums.

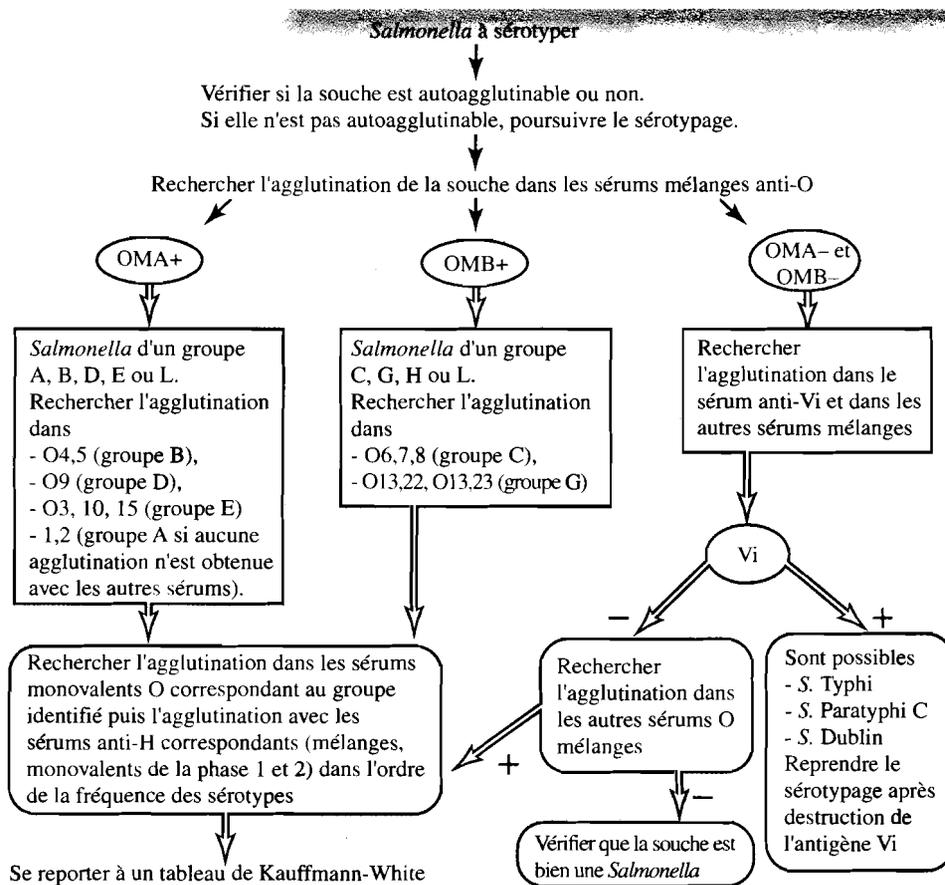
– Tester ensuite les sérums mélanges anti-O dans l'ordre suivant :

– OMA : si l'on obtient une agglutination avec OMA, la souche de *Salmonella* appartient à un des groupes A, B, D, E ou L. On recherche alors l'agglutination dans les sérums anti-O caractéristiques de ces groupes : O4 pour le groupe B, O9 pour le groupe D, O3, 10, 15 pour le groupe E ;

– OMB : on teste ce sérum dans le cas d'une réaction négative dans OMA. Une agglutination dans OMB signifie que la souche de *Salmonella* à sérotyper appartient à un des groupes C, F, G ou H. On recherche alors l'agglutination dans les sérums anti-O caractéristiques de ces groupes : O6, 7, 8 pour le groupe C, O13,22 et O 13,23 pour le groupe G ;

– 98 % des souches de *Salmonella* réagissent avec OMA ou OMB. Si l'on n'obtient pas de réaction avec l'un de ces deux sérums, il faut poursuivre la recherche avec le sérum anti-Vi et, éventuellement, avec les autres sérums mélanges.

– Après avoir déterminé le groupe et, éventuellement, le sous-groupe, compléter la recherche avec les sérums anti-H existants. Utiliser les sérums anti-H correspondant aux sérotypes du groupe déjà identifié, en suivant l'ordre de fréquence des sérotypes (Voir schéma suivant).



Méthodologie du sérotypage des *Salmonella*

• Schéma récapitulatif

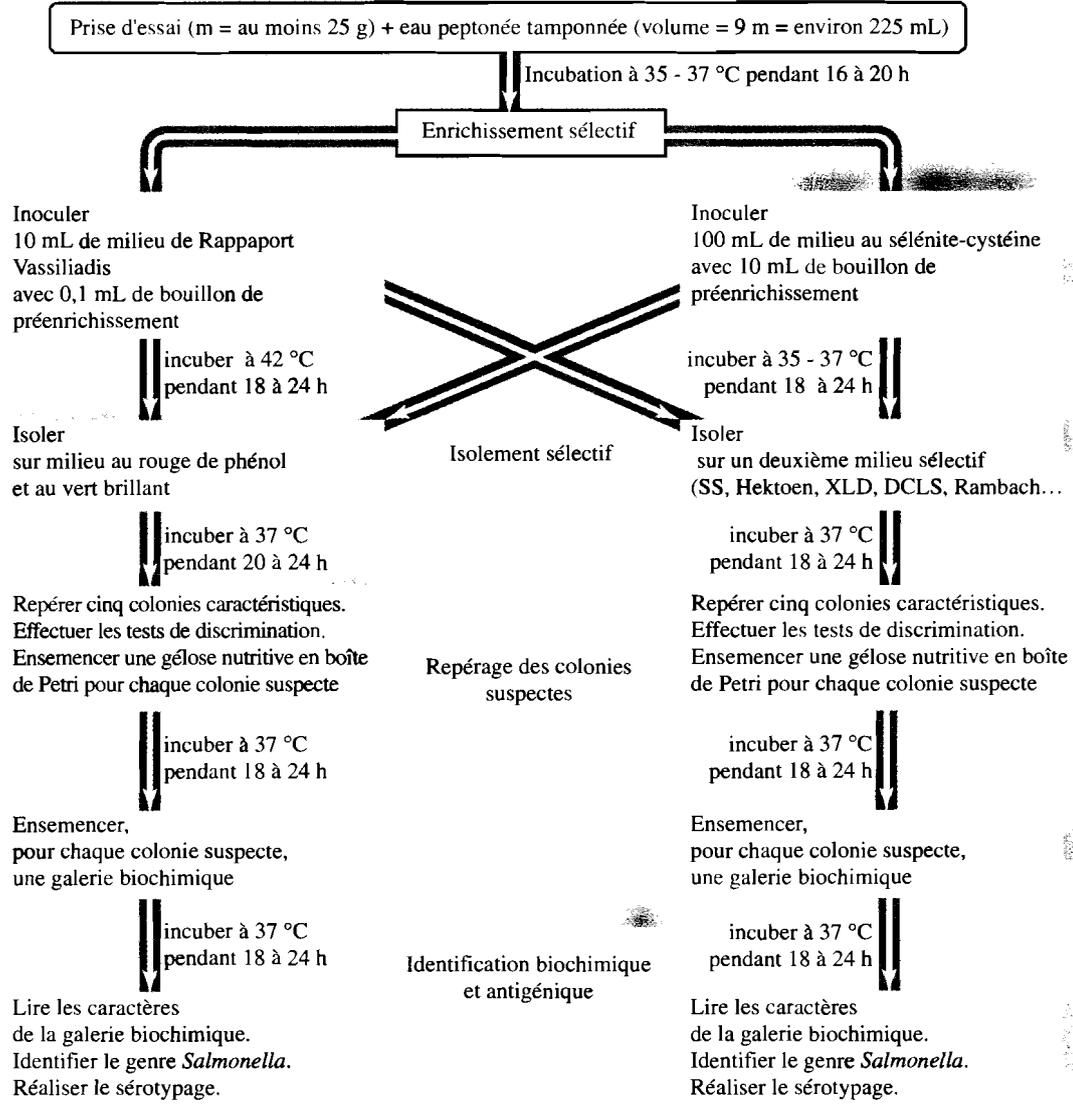


Schéma récapitulatif de l'analyse

Identification des *Escherichia coli* entéropathogènes par agglutination sur lame

<p>Principe général</p>	<p>Des sérums agglutinants sont disponibles et permettent l'identification des sérotypes ayant déjà été signalés dans la littérature comme responsables d'infections intestinales. Les sérums commercialisés par les laboratoires EURO BIO sont les suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les sérums polyvalents 1, 2 et 3 qui correspondent aux EPEC <ul style="list-style-type: none"> – sérotypes O1, O26, O86a, O111, O119, O127a et O128 pour le sérum polyvalent 1 ; – sérotypes O44, O55, O125, O126, O146, et O166 pour le sérum polyvalent 2 ; – sérotypes O18, O114, O142, O151, O157, O158 pour le sérum polyvalent 3. • Les sérums polyvalents 4, 5 et 6 qui correspondent aux sérotypes entérotoxiques décrits <ul style="list-style-type: none"> – O6, O27, O78, O148, O159, O168 (polyvalent 4) ; – O20, O25, O163, O513, O167 (polyvalent 5) ; – O8, O15, O115, O169 (polyvalent 6). • Les sérums polyvalents 7 et 8 qui agglutinent les bactéries appartenant à des sérotypes reconnus comme entéro-invasifs <ul style="list-style-type: none"> – O28ac, O112ac, O124, O136, O144 (polyvalent 7) ; – O29, O143, O152, O164 (polyvalent 8). <p>La recherche est réalisée selon les protocoles classiques de l'agglutination sur lame. Seules les réactions franchement positives en 1 minute sont prises en considération. Cette méthode présente des limites. En effet, tous les sérotypes potentiellement entéropathogènes ne sont pas représentés. Par ailleurs, pour affirmer la pathogénicité d'un sérotype identifié par agglutination sur lame, des tests spécifiques doivent être pratiqués.</p>
<p>Technique</p>	<p>C'est celle de toute agglutination sur lame.</p> <ul style="list-style-type: none"> – Préparer, à partir de colonies caractéristiques sur milieu sélectif gélosé (colonies bleues sur milieu de Mac Conkey + sorbitol), une suspension bactérienne dense dans de l'eau physiologique stérile. – Sur une lame propre et sèche, déposer une goutte du sérum à tester. – À l'aide d'une öse, prélever une goutte de suspension et la transférer à proximité du dépôt d'immun-sérum. – Mélanger à l'aide de l'öse, incliner la lame d'avant en arrière et observer l'agglutination. On ne tiendra compte que des agglutinations franches, apparues dans un délai de moins de 1 minute. Il conviendra de vérifier la non-autoagglutination des bactéries dans l'eau physiologique.

Identification des *Escherichia coli* entérohémorragiques O 157 par agglutination de particules de latex sensibilisées

ATTENTION !

Compte tenu du risque infectieux représenté par les souches d'*E. coli* O157, les échantillons doivent être manipulés avec les précautions appropriées. L'emploi de gants à usage unique est recommandé.

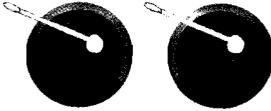
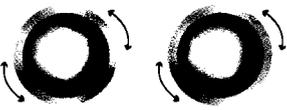
Identification des souches d' *E. coli* O157

Cette technique, très simple et précise, est réalisée à partir de colonies caractéristiques prélevées sur milieu Mac Conkey- sorbitol (*E. coli* O157 ne fermente pas le sorbitol, contrairement à la majorité des souches d'*E. coli*). On dispose :

- de latex test : suspension de particules de latex de polystyrène colorées en rouge et sensibilisées avec des anticorps anti O 157 ;
- de latex non sensibilisés.

Ces suspensions de latex doivent être ramenées à la température ambiante et homogénéisées avant utilisation.

Protocole opératoire

1 – Distribution en eau physiologique		Pour chaque échantillon, distribuer une goutte (40 microlitres) d'eau physiologique dans les deux cercles.												
2 – Prélèvement des colonies		À l'aide d'un bâtonnet, prélever une quantité de colonies suffisante pour en couvrir l'extrémité plate.												
3 – Homogénéisation		Mettre en suspension la culture dans l'eau physiologique. Couvrir la moitié du cercle. À l'aide d'un autre bâtonnet, mettre en suspension une quantité équivalente de culture dans l'autre cercle.												
4 – Distribution des latex		Pour chaque échantillon, ajouter : – 1 goutte de latex test (sensibilisé) dans le premier cercle ; – 1 goutte de latex non sensibilisé dans le second cercle.												
5 – Mélange		Mélanger, à l'aide d'un bâtonnet, le contenu de chaque cercle en l'étalant sur toute la surface du cercle à réaction. Couvrir la totalité du cercle.												
6 – Agitation		Agiter doucement la carte pendant 30 secondes et lire.												
7 – Lecture		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Latex contrôle</th> <th>Latex test</th> <th>Résultat</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>+</td> <td>-</td> <td><i>E. coli</i> O 157</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>-</td> <td>Négatif</td> </tr> <tr> <td>+</td> <td>+</td> <td>Ininterprétable</td> </tr> </tbody> </table>	Latex contrôle	Latex test	Résultat	+	-	<i>E. coli</i> O 157	-	-	Négatif	+	+	Ininterprétable
Latex contrôle	Latex test	Résultat												
+	-	<i>E. coli</i> O 157												
-	-	Négatif												
+	+	Ininterprétable												

Méthodologie de l'identification des *E. coli* O 157 par agglutination des particules de latex sensibilisées

Identification des *Escherichia coli* O157 par la recherche des vérotoxines 1 et 2 (VT1 et VT2)

Principe général	La production d'une vérotoxine active sur les cellules Véro (VT) correspond à un autre caractère distinctif des <i>E. coli</i> O 157 entérohémorragiques. Deux types antigéniques de vérotoxine peuvent être produits : les types 1 et 2 (VT1 et VT2). Des particules de latex sensibilisées avec des anticorps anti-VT1 et anti-VT2 sont agglutinées lorsqu'elles sont mélangées à différentes dilutions du surnageant de la centrifugation d'une culture agitée en milieu CA-YE (Eurobio) d' <i>E. coli</i> producteurs de vérotoxines. Le titre de la toxine correspond à la dilution la plus étendue du surnageant de culture donnant encore une agglutination visible.
Réactifs et matériel	<ul style="list-style-type: none"> • Réactifs (laboratoires Eurobio) : <ul style="list-style-type: none"> – latex sensibilisé VT1 ; – latex sensibilisé VT2 ; – contrôle latex (latex non sensibilisé) ; – contrôle vérotoxine 1 ; – contrôle vérotoxine 2 ; – diluant. • Matériel : <ul style="list-style-type: none"> – plaques à microtitration (puits en V) ; – agitateur pour plaques à microtitration ; – compte-gouttes délivrant des gouttes de 25 µL ; – diluteurs (25 µL) ; – chambre humide.
Préparation de l'échantillon	Inoculer la souche à étudier dans le milieu de culture CA-YE et pratiquer une culture agitée (120 à 150 oscillations par minute) à 37 °C pendant 18 à 20 heures. Centrifuger à 3 000 tours/min. Recueillir le surnageant, il sera utilisé pour les tests.
Protocole opératoire (laboratoires Eurobio)	<ul style="list-style-type: none"> – Organiser la plaque de façon à ce que chaque rangée comporte 8 puits. Chaque échantillon nécessite l'utilisation de trois rangées. – À l'aide d'une pipette compte-gouttes, distribuer 25 µL de diluant dans chacun des puits des trois rangées. – Ajouter 25 µL de l'échantillon à tester dans le premier puits de chaque rangée. – À l'aide d'une pipette ou d'un diluteur, reporter 25 µL du mélange de puits en puits (en prenant soin de bien homogénéiser avant chaque report), à partir du puits n°1 jusqu'au puits n°7 de chacune des trois rangées. On réalise ainsi une série de dilutions au 1/2. Laisser le huitième puits qui ne contiendra que du diluant. – Réaliser les mêmes opérations dans deux autres rangées en utilisant le contrôle vérotoxine 1 et le contrôle vérotoxine 2. – Ajouter : <ul style="list-style-type: none"> – 25 µL de latex sensibilisé VT1 dans chaque puits de la 1^{re} rangée et dans les puits de la rangée « contrôle vérotoxine 1 » ; – 25 µL de latex sensibilisé VT2 dans chaque puits de la 2^e rangée et dans les puits de la rangée « contrôle vérotoxine 2 ». – Agiter pour homogénéiser. – Recouvrir la plaque avec du papier adhésif pour limiter l'évaporation, placer en chambre humide pendant 18 à 20 heures.

Lecture et interprétation

Observer les agglutinations sur fond noir.
Le résultat sera quantifié selon les indications de la figure suivante et du tableau ci-dessous.



(-)



(+/-)



(+)



(++)



(+++)

Pas d'agglutination dans le contrôle latex	Agglutination avec le latex sensibilisé	Résultat positif. Le titre de la toxine correspond au facteur de dilution le plus élevé permettant l'observation d'une agglutination.
Pas d'agglutination dans le contrôle latex	Agglutination avec le latex sensibilisé	Résultat négatif. Le titre de la toxine est inférieur à 1/2.
Agglutination avec le contrôle latex	Quand la plus grande dilution de latex sensibilisé est quatre fois supérieure à celle du contrôle latex, le résultat est interprété positif.	

Interprétation de la recherche de la vérotoxine

Recherche d'*Escherichia coli* O157 : H7 dans une viande par la méthode directe Blot Elisa

<p>Principe général</p>	<p>La procédure présentée correspond à la méthode TECRA (3M Santé), elle comprend deux étapes successives :</p> <ul style="list-style-type: none"> – l'inoculation, pour chaque échantillon, d'un Pétrifilm <i>E. coli</i> avec 1 mL de bouillon d'enrichissement ; – la détection sur la gélose Pétrifilm des souches O157 : H7 par méthode directe Blot Elisa sur membrane. <p>Les bactéries présentes dans le bouillon d'enrichissement forment des colonies sur le Pétrifilm incubé à 42 °C. Leurs antigènes sont transférés sur la membrane de réaction et l'empreinte ainsi réalisée est révélée par l'utilisation d'anticorps anti-O157 : H7 marqués par une enzyme. Après lavage, l'addition du substrat provoque la libération de produits colorés. Les colonies d'<i>Escherichia coli</i> O157 : H7 apparaissent donc colorées (noires dans le cas de la technique utilisée).</p>														
<p>Protocole opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation de l'échantillon – Dans un sac Stomacher, mélanger 25 g d'échantillon (s'il s'agit de viande crue) ou 50 g (s'il s'agit de viande cuite) et 225 mL de bouillon EC modifié. Homogénéiser 2 minutes au Stomacher. – Transférer dans un flacon de 1 L. Incuber 6 à 8 heures à 36 °C sur un agitateur réglé à 100 tours/minute. – Diluer au 1/10 dans le tampon phosphate. <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>Tryptone</td> <td>20 g</td> </tr> <tr> <td>Sels biliaires</td> <td>1,126 g</td> </tr> <tr> <td>Lactose</td> <td>5,1 g</td> </tr> <tr> <td>K₂HPO₄</td> <td>4 g</td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>1,5 g</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td>H₂O</td> <td>qsp 1 L</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">Composition du bouillon EC</p> <ul style="list-style-type: none"> – Ajuster le pH à 6,9 avec de l'acide chlorhydrique 1M. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. – Refroidir, puis ajouter 5 mL d'une solution (stérilisée sur membrane) de novobiocine à 4 mg/mL à un litre de milieu stérilisé. • Ensemencement du Pétrifilm (voir manipulation 5) Pour chaque échantillon, ensemer et incuber un Pétrifilm, selon les indications avec 1 mL de la dilution préparée. Incuber les Pétrifilms à 42 °C pendant 18 h. 	Tryptone	20 g	Sels biliaires	1,126 g	Lactose	5,1 g	K ₂ HPO ₄	4 g	KH ₂ PO ₄	1,5 g	NaCl	5 g	H ₂ O	qsp 1 L
Tryptone	20 g														
Sels biliaires	1,126 g														
Lactose	5,1 g														
K ₂ HPO ₄	4 g														
KH ₂ PO ₄	1,5 g														
NaCl	5 g														
H ₂ O	qsp 1 L														
<p>Révélation des colonies d'<i>E. coli</i> O157 : H7</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation des réactifs (Kit TECRA) – Solution de lavage : reconstituer la solution de lavage avec de l'eau distillée pour obtenir 3 L de solution. – Conjugué : ajouter stérilement 500 mL de glycérol à 50 % au contenu du flacon de conjugué. Laisser dissoudre à température ambiante. – Témoin positif : reconstituer le témoin positif selon les indications du fabricant. 														

<p>Mode opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Marquer au crayon, sur l'une des deux faces de la membrane, le numéro de l'échantillon. – Remplir au 1/4 un bécher de 250 mL avec de la solution de lavage. Placer un disque de séparation au fond du bécher. – Témoin positif : déposer 5 mL de témoin positif reconstitué sur la face marquée d'une première membrane. – Prise des empreintes des colonies développées sur Pétrifilm <i>E. coli</i> : <ul style="list-style-type: none"> – soulever doucement le film supérieur du Pétrifilm <i>E. coli</i> incubé. La gélose se décolle avec le film, laissant un espace vide circulaire sur le film inférieur. Essuyer, si nécessaire, l'espace vide avec un papier afin de retirer toute trace de gélose. À l'aide de pinces, placer une membrane active dans la dépression, la face marquée vers le bas ; – tracer, à l'aide d'un crayon, trois traits chevauchant la membrane et la barrière de mousse blanche. En cas de résultats positifs, ces traits serviront de repères pour repositionner la membrane et situer les colonies de <i>E. coli</i> O157 : H7 ; – refermer le film supérieur sur la membrane en évitant de piéger des bulles d'air ; – laisser, au moins une minute, la membrane en contact avec la gélose. Soulever ensuite le film supérieur et détacher, à l'aide de pinces, la membrane de la gélose. – Lavage des membranes : <ul style="list-style-type: none"> – au fond du bécher, placer la membrane témoin sur le disque de séparation en plaçant la face marquée vers le haut. Placer un nouveau disque de séparation, puis alterner membranes et disques en plaçant toujours la face numérotée vers le haut ; – agiter doucement le bécher puis vider la solution de lavage en maintenant membranes et disques au fond du bécher. Recommencer les opérations de lavage jusqu'à disparition de toute trace de gélose sur les membranes. – Révélation des colonies suspectes : <ul style="list-style-type: none"> – remplir à nouveau le bécher à raison de 4 mL de solution de lavage et 4 mL de conjugué par membrane. Utiliser une pipette de précision pour l'addition du conjugué et rincer le cône. Incuber le bécher en agitant à 100 tours/min pendant 30 minutes à température ambiante ; – vider le bécher et laver les membranes en ajoutant 5 mL de solution de lavage par membrane. Vider le bécher. Renouveler l'opération deux fois ; – ajouter 2 mL de substrat par membrane. Incuber 15 minutes à température ambiante sur agitateur. Pour arrêter la réaction, ajouter de l'eau froide dans le bécher. Vider et recommencer. Retirer les membranes du bécher, puis les sécher sur du papier absorbant.
<p>Interprétation des résultats</p>	<p>Une réaction positive se traduit par la présence de spots gris-noir sur la membrane. Ces spots sont significatifs de la présence de <i>E. coli</i> O157 : H7. Ils peuvent aussi prendre la forme de petits cercles délimitant le pourtour de bulles de gaz associées aux colonies d'<i>E. coli</i> sur Pétrifilm.</p> <p>Les échantillons ne donnant pas de spots sur la membrane sont exempts de <i>E. coli</i> O157 : H7.</p>
<p>Confirmation</p>	<p>Repérer trois taches grises sur la membrane en marquant légèrement la membrane au crayon. Placer la membrane sur une surface éclairée, face numérotée vers le bas. Placer le Pétrifilm associé sur la membrane de façon à faire coïncider les traits de repérage membrane/Pétrifilm. Par transparence, repérer les colonies du Pétrifilm ayant provoqué les spots gris-noir. Ouvrir le Pétrifilm et procéder au prélèvement des colonies concernées afin de les isoler sur milieu sélectif de Mac Conkey au sorbitol et au 5 bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-glucuronide. <i>E. coli</i> forme sur ce milieu des colonies blanches (sorbitol et glucuronidase négatifs). Réaliser le sérotypage à partir de ces colonies.</p>

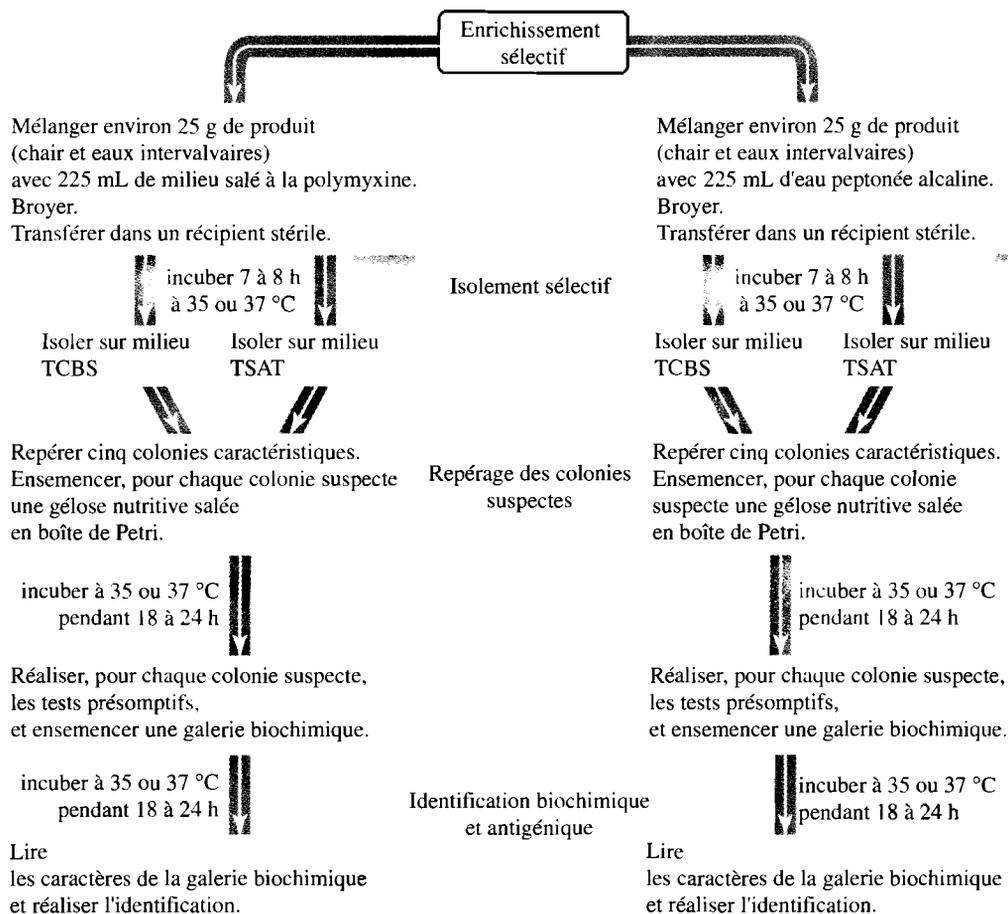
Recherche et identification des vibrions entéropathogènes dans les coquillages marins

(NFV.08024)

Préparation des échantillons

- Laver et brosser les coquillages sous un courant d'eau. Insister au niveau de la charnière ou de la zone d'ouverture.
 - Égoutter et passer brièvement la zone d'ouverture de chaque coquillage à la flamme. Ouvrir les coquillages près de la flamme, à l'aide d'instruments stérilisés par flambage à l'éthanol.
 - Recueillir les eaux intervalvaires dans un récipient stérile. Introduire la chair des coquillages ainsi que les eaux intervalvaires (environ 25 mL) dans une éprouvette stérile de 100 mL.
 - Transférer dans le sac plastique d'un Stomacher ou le bol d'un homogénéisateur rotatif contenant 225 mL de milieu d'enrichissement. Réaliser l'opération de broyage-homogénéisation : 1 min pour le Stomacher, 30 secondes à 15 000 tours/min pour l'homogénéisateur.
- On obtient une suspension au 1/10.

Protocole opérateur



Méthodologie de la recherche de vibrions entéropathogènes dans les coquillages marins

Recherche de *Campylobacter jejuni* dans les denrées alimentaires

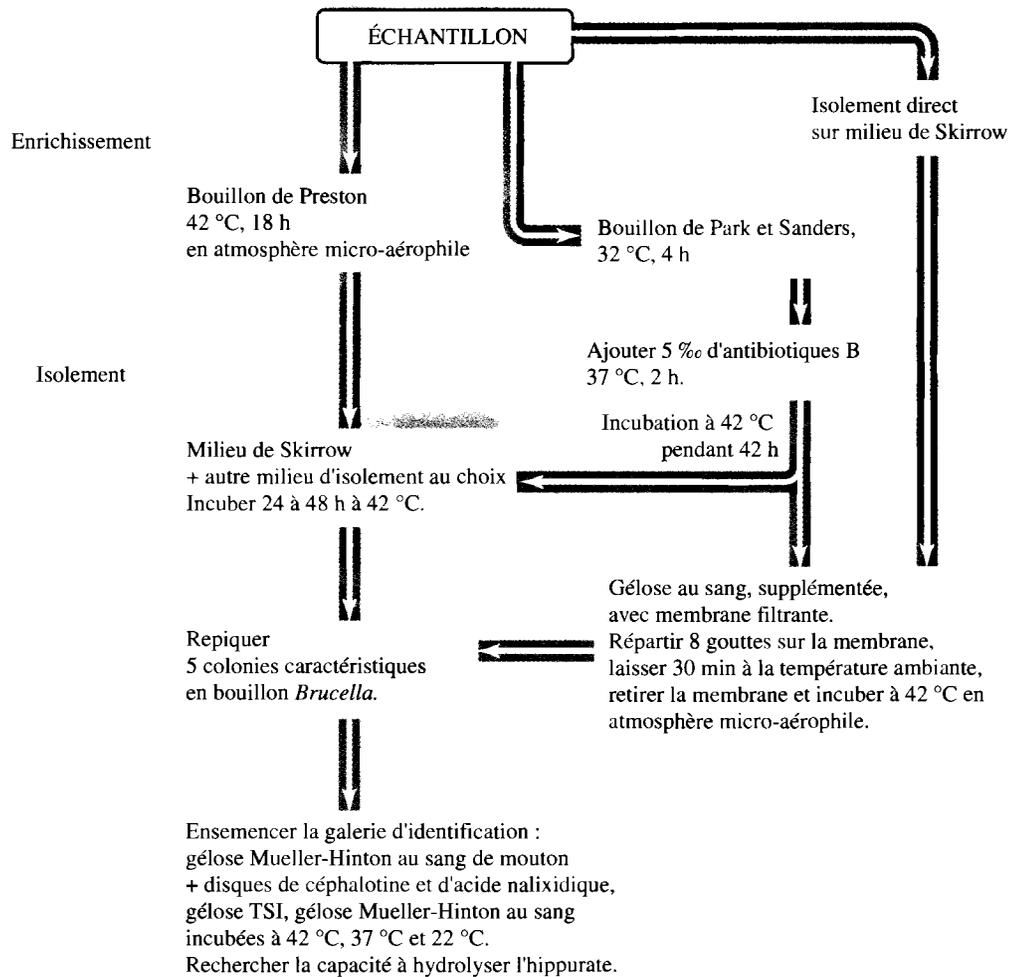
Mode opératoire	<p>• Enrichissement en milieux liquides</p> <p>– Réaliser deux suspensions mères diluées au 1/10 en mélangeant une masse m de l'aliment à analyser (si nécessaire pratiquer un broyage-homogénéisation) à :</p> <p>– 10 mL de milieu de Preston pour le premier enrichissement, incubé à 42 °C en atmosphère micro-aérophile ;</p> <p>– 10 mL de bouillon de Park et Sanders pour le deuxième enrichissement, incubé 4 heures à 32 °C, puis ajouter 5 ‰ de la solution d'antibiotiques B dont la formule est donnée ci-après.</p> <p>– Incuber à nouveau 2 heures à 37 °C, puis 4 heures à 42 °C, en atmosphère micro-aérophile.</p>	
Milieux	Milieu de Preston	<p>Milieu de base</p> <p>Extrait de viande 10,0 g</p> <p>Peptone 10,0 g</p> <p>Chlorure de sodium 5,0 g</p> <p>Agar-agar 1,0 g</p> <p>Eau 1 000 mL</p> <p>Solution d'antibiotiques</p> <p>Polymyxine B 100 000 UI</p> <p>Rifampicine 0,2 g</p> <p>Lactate de triméthoprimine 0,2 g</p> <p>Cycloheximide 2,0 g</p> <p>Éthanol à 95 % 50 mL</p> <p>Dissoudre les composants dans l'éthanol et compléter à 20 mL dans une fiole stérile avec de l'eau.</p> <p>Stériliser par filtration.</p> <p>Préparation du milieu de Preston, répartir :</p> <p>Milieu de base 940 mL</p> <p>Sang de cheval lysé stérile 50 mL</p> <p>Solution d'antibiotiques 10 mL</p>
	Milieu de Park et Sanders	<p>Milieu de base</p> <p>Tryptone 10 g</p> <p>Peptone pepsique de viande 10 g</p> <p>Glucose 1,0 g</p> <p>Extrait de levure 2,0 g</p> <p>Citrate de sodium 1,0 g</p> <p>Chlorure de sodium 5,0 g</p> <p>Bisulfite de sodium 0,1 g</p> <p>Pyruvate de sodium 0,25 g</p> <p>Eau 1 000 mL</p>

		<p>Solution d'antibiotiques A</p> <p>Vancomycine 0,1 g Lactate de triméthoprimine 0,1 g Bouillon <i>Brucella</i> 50 mL</p> <p>Préparation du milieu de Park et Sanders, répartir :</p> <p>Milieu de base 955 mL Sang de cheval stérile 50 mL Solution d'antibiotiques 5 mL</p> <p>Solution d'antibiotiques B pour milieu de Park et Sanders</p> <p>Céfopérazone 0,32 g Cycloheximide 1 g Bouillon <i>Brucella</i> 50 mL</p>		
<p>Isolement</p>	<p>• Isolement direct</p> <p>Lorsque les produits analysés sont susceptibles de contenir une quantité importante de <i>Campylobacter</i> thermotolérants, on procède, parallèlement aux enrichissements, à un isolement direct en ensemençant une anse de la suspension en milieu de Preston sur un milieu de Skirrow et un autre milieu sélectif. On incube en atmosphère micro-aérophile pendant 18 heures.</p> <p>• Isolement à partir des enrichissements en milieux liquides</p> <ul style="list-style-type: none"> – Étaler, sur deux boîtes de milieu de Skirrow : <ul style="list-style-type: none"> – une anse de la culture obtenue sur milieu de Preston ; – une anse de la culture obtenue sur milieu de Park et Sanders. – Répéter l'opération sur un autre milieu sélectif. – Parallèlement, répartir 8 gouttes de la culture obtenue sur milieu de Preston, à la surface d'une membrane filtrante préalablement déposée sur une gélose nutritive au sang, supplémentée par le mélange FBP (sulfate de fer, métabisulfite de sodium, pyruvate de sodium). 	<table border="1" data-bbox="340 1070 1436 1424"> <tr> <td data-bbox="340 1070 571 1424" style="text-align: center;">Gélose au sang supplémentée</td> <td data-bbox="571 1070 1436 1424"> <p>Milieu de base 950 mL Sang de cheval lysé stérile 50 mL Supplément FBP 1 mL</p> <p>Supplément FBP</p> <p>Sulfate de fer 2,5g Pyruvate de sodium 2,5g Métabisulfite de sodium 2,5 g Eau 10 mL</p> <p>Stériliser par filtration</p> </td> </tr> </table> <ul style="list-style-type: none"> – Après 30 minutes de contact, lorsque le liquide a traversé la membrane, retirer cette membrane avec une pince stérile. – Incuber l'ensemble des boîtes en atmosphère micro-aérophile à 42 °C. 	Gélose au sang supplémentée	<p>Milieu de base 950 mL Sang de cheval lysé stérile 50 mL Supplément FBP 1 mL</p> <p>Supplément FBP</p> <p>Sulfate de fer 2,5g Pyruvate de sodium 2,5g Métabisulfite de sodium 2,5 g Eau 10 mL</p> <p>Stériliser par filtration</p>
Gélose au sang supplémentée	<p>Milieu de base 950 mL Sang de cheval lysé stérile 50 mL Supplément FBP 1 mL</p> <p>Supplément FBP</p> <p>Sulfate de fer 2,5g Pyruvate de sodium 2,5g Métabisulfite de sodium 2,5 g Eau 10 mL</p> <p>Stériliser par filtration</p>			
<p>Sélection des colonies et purification</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Après 24 heures, ou plus fréquemment 48 heures d'incubation (parfois 3 ou 4 jours), rechercher la présence de colonies caractéristiques. Sur gélose de Skirrow, les colonies sont petites, lisses, convexes, translucides, non pigmentées, non hémolytiques, ayant parfois tendance à s'étaler. Sur gélose au sang supplémentée, ces bactéries apparaissent sous la forme de colonies grisâtres, petites, translucides, parfois irrégulières. – Prélever au moins 5 colonies suspectes sur l'isolement direct ou après enrichissement. S'il y en a moins de 5, retenir toutes les colonies. – Mettre en suspension chaque colonie suspecte dans 1 mL de bouillon <i>Brucella</i>. Examiner chaque suspension à l'état frais et retenir celles présentant des bacilles incurvés dont le déplacement est observé en vrille. – Ensemencer, avec chaque suspension, une gélose Columbia au sang de mouton (5 %). – Incuber à 42 °C pendant 24 heures en atmosphère micro-aérophile. 			

Identification

À partir des cultures pures obtenues sur gélose Columbia au sang, identifier le genre *Campylobacter* par ses caractères microscopiques, la recherche de la catalase et de l'oxydase et identifier l'espèce par l'étude de ses caractères biochimiques et culturaux (Voir tableau 27 page 182).

• **Schéma récapitulatif**



Méthodologie de la recherche des *Campylobacter*

Recherche de *Listeria monocytogenes* dans les produits laitiers par la méthode traditionnelle normalisée

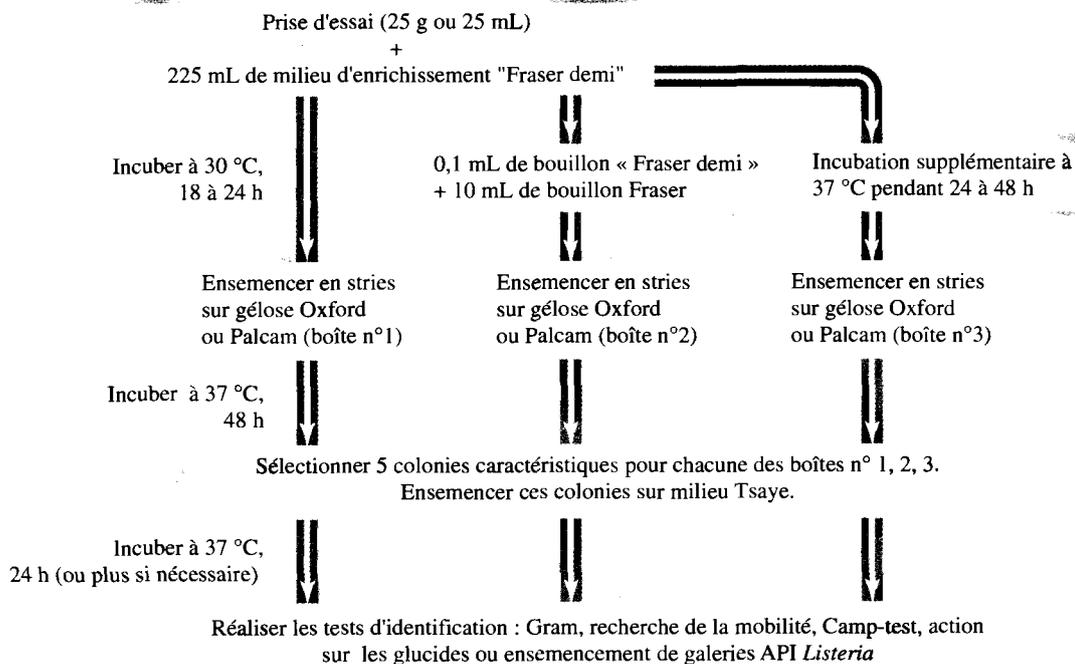
AFNOR V 08-055

<p>Préparation des échantillons</p>	<p>La taille minimale de l'échantillon est de 200 g ou 200 mL.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lait Agiter vigoureusement l'échantillon afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des microorganismes, en retournant 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse, ou la disperser si elle se forme. L'intervalle de temps entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas excéder 3 minutes. • Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre, lactose, caséine et caséinate Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en le secouant à plusieurs reprises. Si le récipient est trop rempli, transférer dans un récipient plus grand. • Beurre Faire fondre l'échantillon dans un bain d'eau maintenu à 45 °C. Agiter pendant la fusion et ôter le récipient du bain d'eau dès que l'échantillon est fondu. • Fromage L'échantillon de laboratoire peut consister en un morceau de la pâte et de la croûte. • Glaces de consommation Procéder comme pour le beurre, mais utiliser un bain d'eau maintenu à 37 °C au maximum. • Laits fermentés, yaourts, flans et desserts Mélanger le contenu du récipient fermé en l'agitant et en le retournant à plusieurs reprises, ou ouvrir le récipient et mélanger le contenu aseptiquement en utilisant une spatule ou une cuillère stérile. 													
<p>Mode opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Enrichissement primaire <table border="1" data-bbox="363 1557 1407 1964"> <thead> <tr> <th>Nature de l'échantillon</th> <th>Prise d'essai</th> <th>Traitements</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre, lactose, caséine, caséinate</td> <td>25mL</td> <td>Ajouter 225 mL de milieu d'enrichissement, mélanger.</td> </tr> <tr> <td>Fromage</td> <td>25g (pesés dans un récipient stérile)</td> <td>Introduire dans un flacon bouché contenant 225 mL de milieu d'enrichissement. Dissoudre en agitant.</td> </tr> <tr> <td>Beurre</td> <td>Faire fondre l'échantillon à 45°C. Prélever 25mL avec une pipette préalablement chauffée à 45°C.</td> <td>Introduire dans le pot d'un broyeur renfermant 225 mL de milieu d'enrichissement préchauffé à 37 °C. Homogénéiser pendant 1 minute.</td> </tr> </tbody> </table>		Nature de l'échantillon	Prise d'essai	Traitements	Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre, lactose, caséine, caséinate	25mL	Ajouter 225 mL de milieu d'enrichissement, mélanger.	Fromage	25g (pesés dans un récipient stérile)	Introduire dans un flacon bouché contenant 225 mL de milieu d'enrichissement. Dissoudre en agitant.	Beurre	Faire fondre l'échantillon à 45°C. Prélever 25mL avec une pipette préalablement chauffée à 45°C.	Introduire dans le pot d'un broyeur renfermant 225 mL de milieu d'enrichissement préchauffé à 37 °C. Homogénéiser pendant 1 minute.
Nature de l'échantillon	Prise d'essai	Traitements												
Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre, lactose, caséine, caséinate	25mL	Ajouter 225 mL de milieu d'enrichissement, mélanger.												
Fromage	25g (pesés dans un récipient stérile)	Introduire dans un flacon bouché contenant 225 mL de milieu d'enrichissement. Dissoudre en agitant.												
Beurre	Faire fondre l'échantillon à 45°C. Prélever 25mL avec une pipette préalablement chauffée à 45°C.	Introduire dans le pot d'un broyeur renfermant 225 mL de milieu d'enrichissement préchauffé à 37 °C. Homogénéiser pendant 1 minute.												

Nature de l'échantillon	Prise d'essai	Traitements
Glaces	Faire fondre l'échantillon. Prélever 25mL à la pipette.	Introduire dans un flacon renfermant 225mL de milieu d'enrichissement. Mélanger.
Laits fermentés, yaourts, crèmes anglaises et desserts	25g	Introduire dans un flacon bouché contenant des billes de verre et 225 mL de milieu d'enrichissement. Mélanger en agitant.

Modalités de l'enrichissement primaire

• Schéma récapitulatif



Identifier en se reportant aux tableaux de caractères

Méthodologie de la recherche des *Listeria*

Recherche de *Listeria monocytogenes* dans un produit laitier par hybridation de sondes froides

<p>Préparation de l'échantillon et enrichissement</p>	<p>Mélanger stérilement 25 g de lait avec 225 mL de bouillon d'enrichissement pour <i>Listeria</i>, tamponné au phosphate (ME). Incuber 24 heures à 35 °C.</p> <table border="1" data-bbox="355 672 1442 963"> <tr> <td data-bbox="355 672 663 963"> <p>Composition du milieu d'enrichissement</p> </td> <td data-bbox="672 672 1442 963"> <p>Milieu trypticase-soja 30,0 g Extrait de levure 6,0 g KH₂PO₄ 1,35 g Na₂HPO₄ 9,6 g Eau distillée qsp 1 L Acriflavine 15 mg Acide nalidixique 40,0 mg Cycloheximide 50,0 mg</p> </td> </tr> </table> <p>Mélanger les 5 premiers ingrédients et autoclaver 15 minutes à 121 °C. Ajouter, au moment de l'utilisation, les 3 composants supplémentaires au milieu autoclavé.</p>	<p>Composition du milieu d'enrichissement</p>	<p>Milieu trypticase-soja 30,0 g Extrait de levure 6,0 g KH₂PO₄ 1,35 g Na₂HPO₄ 9,6 g Eau distillée qsp 1 L Acriflavine 15 mg Acide nalidixique 40,0 mg Cycloheximide 50,0 mg</p>
<p>Composition du milieu d'enrichissement</p>	<p>Milieu trypticase-soja 30,0 g Extrait de levure 6,0 g KH₂PO₄ 1,35 g Na₂HPO₄ 9,6 g Eau distillée qsp 1 L Acriflavine 15 mg Acide nalidixique 40,0 mg Cycloheximide 50,0 mg</p>		
<p>Isolement sur milieu sélectif</p>	<p>Étaler la culture obtenue sur milieu d'enrichissement à la surface d'un milieu Oxford, à l'aide d'un écouvillon imbibé. Incuber à 35 °C pendant 24 heures.</p>		
<p>Préparation d'une suspension dense</p>	<p>Avec un écouvillon stérile, recueillir la culture obtenue sur le milieu Oxford. Mettre cette culture en suspension dans 0,75 mL de tampon phosphate en agitant énergiquement l'écouvillon dans le tampon pendant quelques secondes.</p>		
<p>Préparation des réactifs et du matériel nécessaires à la manipulation</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Préparer les réactifs de prétraitement et de lyse ainsi que la solution de substrat chromogène, comme il est indiqué par le fabricant. Ces réactifs restent stables 60 jours stockés à – 20 °C. – Préparer des séries de tubes à hémolyse pour chaque test et chaque contrôle. Prévoir 8 tubes étiquetés : <ul style="list-style-type: none"> – 1 tube test étiqueté T ; – 5 tubes de lavage L ; – 1 tube enzyme-conjugué EC étiqueté EC ; – 1 tube substrats chromogène SC étiqueté SC. – Répartir : <ul style="list-style-type: none"> – la solution de lavage à raison de 4 mL dans chaque tube L ; – la solution enzyme-conjugué préparée à raison de 0,75 mL dans le tube EC ; – la solution substrat chromogène préparée à raison de 0,75 mL dans le tube SC. 		
<p>Réalisation de l'hybridation et évaluation de l'activité enzymatique liée</p>	<p>Travailler en parallèle sur les échantillons à tester et les contrôles positif et négatif.</p>		
<p>Prétraitement et traitement des échantillons et des contrôles</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Prétraitement <ul style="list-style-type: none"> – Distribuer 0,5 mL de la suspension dense dans le tube T. – Ajouter 0,1 mL de réactif de prétraitement (lysozyme). – Agiter quelques secondes. – Incuber 15 minutes à 37 °C. 		

	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement – Ajouter 0,1 mL de réactif de lyse (NaOH) dans chaque tube T. – Agiter quelques minutes. – Incuber 15 minutes à 37 °C.
<p>Hybridation</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation de la sonde de capture pendant la seconde incubation de 15 minutes – Rincer 2 à 3 minutes chaque dipstick dans la solution de lavage : tube L1. – Égoutter l'extrémité du dipstick sur du papier absorbant (ne pas toucher l'extrémité du dipstick avec les doigts, le tenir par l'embout plat). • Détection des séquences d'ARN ribosomal spécifiques et capture des molécules hybrides – Sortir le tube T du bain thermostaté. – Ajouter 0,1 mL de sonde <i>Listeria monocytogenes</i> dans chaque tube T. – Placer le dipstick dans le tube T. – Mélanger en soulevant et abaissant le dipstick 5 fois. – Incuber le tube T avec le dipstick 60 minutes à 65 °C.
<p>Caractérisation et quantification des molécules hybrides fixées sur le dipstick</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Lavage – Laver le dipstick dans un tube L déjà placé en bain thermostaté à 65 °C une minute en agitant. – Laver à nouveau, de la même façon, le dipstick dans un tube L à température ambiante. – Égoutter le dipstick sur papier absorbant. • Fixation de l'enzyme conjuguée sur les molécules hybrides – Transférer le dipstick dans le tube E C. – Incuber 20 minutes à température ambiante. • Évaluation de l'activité enzymatique fixée – Laver le dipstick successivement dans deux tubes L, à température ambiante, en agitant doucement 1 minute à chaque lavage. – Égoutter le dipstick sur papier absorbant. – Transférer le dipstick dans le tube SC. – Incuber 20 minutes exactement, à température ambiante. – Retirer et jeter le dipstick. – Dans le tube SC, ajouter 0,25 mL de réactif d'arrêt (H_2SO_4 : 2 mol.L⁻¹). – Transvaser le contenu du tube SC dans une microcuve de spectrophotomètre et lire l'absorbance à $\lambda = 450$ nm contre un « blanc » (0,75 mL de substrat chromogène et 0,25 mL de réactif d'arrêt).
<p>Interprétation des résultats</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Valeurs des contrôles – Contrôle positif : la valeur d'absorbance doit être supérieure ou égale à 1,00. – Contrôle négatif : la valeur d'absorbance doit être inférieure ou égale à 0,15. • Valeurs des tests – Une valeur d'absorbance inférieure ou égale à 0,10 indique l'absence de <i>Listeria monocytogenes</i>. – Une valeur d'absorbance supérieure à 0,10 indique la présence de <i>Listeria monocytogenes</i>.

Recherche de *Staphylococcus aureus* dans une gélatine alimentaire

Norme NF V 59-105

Préparation de la solution d'essai	<ul style="list-style-type: none"> - Peser aseptiquement 20 g de l'échantillon. - Transférer la prise d'essai dans un flacon stérile de 500mL à large ouverture, contenant 180 mL de tampon phosphate de composition suivante : <table border="1" data-bbox="577 690 1224 800" style="margin: 10px auto;"> <tbody> <tr> <td>Na₂HPO₄, 12H₂O</td> <td>9,0 g</td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>1,5 g</td> </tr> <tr> <td>Eau</td> <td>1 000 mL</td> </tr> </tbody> </table> - Agiter pour disperser. - Laisser la gélatine absorber du diluant pendant environ 1 heure à la température ambiante. Ce temps est prolongé, si nécessaire, jusqu'à trois heures maximum. - Placer le flacon dans un bain d'eau réglé à 45 °C, afin de dissoudre la gélatine. - Homogénéiser par agitation douce. Le séjour au bain d'eau ne doit pas dépasser 1 heure. - On obtient ainsi une solution d'essai au 1/10. 	Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	9,0 g	KH ₂ PO ₄	1,5 g	Eau	1 000 mL
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	9,0 g						
KH ₂ PO ₄	1,5 g						
Eau	1 000 mL						
Enrichissement	<p>Transférer 1 mL de la solution d'essai dans un tube contenant 19 mL du milieu d'enrichissement.</p>						
Isolement sélectif	<ul style="list-style-type: none"> - Ensemencer en stries une anse du contenu de milieu d'enrichissement à la surface d'un milieu de Baird-Parker. - Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures. 						
Repérage des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Prélever cinq colonies typiques et (ou) non caractéristiques et les transférer chacune dans un tube de bouillon cœur-cervele. - Incuber à 37 °C pendant 20 à 24 heures. 						
Identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Ensemencer 0,3 mL de plasma de lapin avec 0,1 mL de chaque culture en bouillon cœur-cervele. - Examiner la coagulation du plasma après 4 à 6 heures d'incubation à 37 °C. La réaction est considérée comme positive lorsqu'on observe un coagulum occupant les 3/4 du volume initial de plasma. - À titre de contrôle, ensemencer 0,1 mL de bouillon cœur-cervele stérile dans 0,3 mL de plasma de lapin. On ne doit pas observer de coagulation (sinon les tests effectués ne pourront être validés). <p>Une alternative consiste à rechercher directement, à partir des colonies suspectes prélevées sur le milieu de Baird-Parker, la présence d'une coagulase liée (récepteurs au fibrinogène) par une réaction d'agglutination sur lame.</p>						
Expression des résultats	<p>Ils sont rendus sous la forme : présence ou absence de <i>Staphylococcus aureus</i> dans 0,1 g de gélatine.</p>						

Recherche de l'entérotoxine staphylococcique dans les produits laitiers par méthode immunoenzymatique

Méthode Tecra (kit Tecra Set, Société 3M)

Principe de la méthode	Il s'agit d'une réaction EIA (<i>Enzymatic Immuno Assay</i>) de type sandwich (voir 2.2)
Préparation des échantillons	<p>Les échantillons font l'objet de traitements préalables ayant pour but l'extraction aqueuse de l'entérotoxine. Ces traitements doivent être préférentiellement réalisés le jour de l'analyse. Le stockage des extraits obtenus ne doit pas excéder une nuit à + 4 °C.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Poudre de lait <ul style="list-style-type: none"> – Reconstituer 10 g de poudre de lait avec 50 mL de tampon Tris (0,25M, pH : 8). Agiter. – Ajouter 50 mL de complément à 5 mL de lait reconstitué. Agiter. Utiliser 200 mL pour le test. • Lait <ul style="list-style-type: none"> – Prélever 5 mL. Ajuster le pH à 7-8. Ajouter 50 mL de complément. Agiter. Utiliser 200 mL de solution pour le test. Vérifier le pH (7-8). – Ajouter 50 mL de complément et agiter. Utiliser 200 mL de solution pour le test. • Fromages <ul style="list-style-type: none"> – Mélanger 10 g d'échantillon et 20 mL d'eau distillée désionisée. Agiter 3 min environ. – Ajuster le pH à 4 avec HCl concentré. Centrifuger l'échantillon 10 min à 1 000-3 000 g. – Filtrer le surnageant à l'aide d'une seringue filtre coton. Recueillir 5 mL d'éluat et ajuster le pH à 7-8 avec de la soude. Ajouter 50 mL de complément. Utiliser 200 mL de solution pour le test. • Culture pure de <i>Staphylococcus aureus</i> <ul style="list-style-type: none"> – Incuber la souche une nuit à 35-37 °C en bouillon cœur-cerveau. Centrifuger la culture à faible vitesse. – Recueillir 5 mL de surnageant et ajouter 50 mL de complément. Utiliser 200 mL d'échantillon pour le test.
Préparation des réactifs	<ul style="list-style-type: none"> • Solution de lavage <ul style="list-style-type: none"> – Diluer la totalité du liquide de lavage concentré dans deux litres d'eau distillée ou désionisée. La solution de lavage est aussi utilisée pour reconstituer le témoin positif. • Reconstitution du témoin positif <p style="text-align: center;">ATTENTION !</p> <p style="text-align: center;">Le témoin positif contient une entérotoxine staphylococcique. Manipuler avec précaution.</p> <p>Le témoin positif doit être reconstitué extemporanément le jour du test en préparant une dilution au 1/100 en solution de lavage (50 mL de témoin + 5 mL de solution de lavage). Utiliser des tubes en polypropylène pour la dilution, car la toxine peut se fixer sur le verre ou le polystyrène et réduire ainsi la concentration du témoin positif. Le témoin doit être reconstitué à chaque essai ou série. Les solutions non utilisées seront éliminées dans l'eau de Javel.</p>

	<ul style="list-style-type: none"> • Témoin échantillon positif (facultatif) Un aliquote de témoin positif (100 mL) peut être ajouté à un échantillon alimentaire exempt de toxine. Il s'agira alors d'un témoin artificiellement contaminé. • Témoin échantillon négatif Un échantillon alimentaire présentant les mêmes caractéristiques que l'échantillon testé, mais ne contenant pas de toxine, doit être préparé et analysé comme l'échantillon lui-même. Si celui-ci n'est pas disponible, un témoin négatif est prêt à l'emploi dans le kit. • Reconstitution du conjugué Le kit contient deux flacons de conjugué déshydraté et deux flacons de diluant pour conjugué. Reconstituer un flacon de conjugué avec un flacon de diluant. Laisser le conjugué se réhydrater à température ambiante. Agiter doucement et refermer le flacon. Noter la date de reconstitution sur l'étiquette. La durée de vie du conjugué reconstitué est de 28 jours. Le second flacon ne sera préparé qu'à épuisement du premier. • Reconstitution du substrat Ajouter l'ensemble du diluant pour substrat dans le flacon contenant le substrat. Laisser dissoudre à température ambiante, puis agiter doucement.
<p style="text-align: center;">Mode opératoire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation des puits <ul style="list-style-type: none"> – Ouvrir la poche et séparer les puits nécessaires aux échantillons, ainsi que ceux destinés aux témoins positif et négatif. Replacer les puits non utilisés dans leur poche d'origine et la resceller. – Fixer les puits en les enfonçant fermement sur le support prévu. Retirer le film protecteur de chaque puits. – À l'aide d'une pissette, remplir les puits avec la solution de lavage et attendre 10 minutes à température ambiante (20-25 °C). Vider les puits en retournant la plaque au-dessus d'un récipient. Retirer les traces de liquide en tapant fermement les puits, face vers le bas, sur un papier absorbant. • Répartition des échantillons et des témoins <ul style="list-style-type: none"> – Transférer 200 mL de chaque échantillon et 200 mL de chaque témoin dans des puits différents. – Repérer la position des échantillons et des deux témoins en les notant sur la feuille de travail. – Fermer le support à l'aide d'un film plastique et incuber à 35-37 °C pendant deux heures. Le film sert à éviter l'évaporation de l'échantillon pendant l'incubation. • Première série de lavages Après incubation, vérifier que les puits sont bien fixés sur le support et laver quatre fois les puits à l'aide de la solution de lavage en procédant comme indiqué ci-dessous : <ul style="list-style-type: none"> – retourner la plaque au-dessus d'un récipient contenant de l'hypochlorite de sodium, afin de vider les puits ; – retirer les traces de liquides en tapant fermement les puits face vers le bas, sur un papier absorbant ; – remplir chaque puits avec la solution de lavage ; – recommencer l'ensemble des opérations trois fois. • Addition du conjugué <ul style="list-style-type: none"> – Après avoir lavé et vidé les puits, ajouter 200 mL de conjugué reconstitué dans chaque puits. – Placer un film protecteur sur les puits et incuber à température ambiante pendant une heure. • Deuxième série de lavages Après incubation, laver cinq fois les puits avec la solution de lavage comme indiqué dans la première série.

• **Évaluation de l'activité enzymatique fixée**

- Après avoir lavé et vidé les puits, ajouter 200 mL de substrat reconstitué dans chaque puits. Incuber à température ambiante (20-25 °C) pendant 30 minutes jusqu'à ce que le témoin atteigne une absorbance (DO) d'au moins 1 ou que la couleur développée soit au moins aussi sombre que celle présentée sur le comparateur de couleur n°4. La couleur a tendance à s'accumuler sur le pourtour des puits, c'est pourquoi il est nécessaire de taper légèrement le fond des puits sur la paillasse afin d'homogénéiser la coloration.
- Si, après plus de 45 minutes, le témoin positif n'a pas suffisamment viré, le test ne peut être validé.
- Après virage du témoin positif, ajouter 20 mL (ou une goutte de la solution d'arrêt) dans chacun des puits.

Interprétation des résultats

- Elle peut être conduite visuellement ou à l'aide d'un lecteur de plaques.
- Placer le support contenant les puits sur un fond blanc. Comparer la coloration développée dans chaque puits avec celles du comparateur de couleurs :
 - le témoin positif doit être d'un vert-bleu soutenu. Si l'intensité de la coloration est plus faible que celle du comparateur, le test ne peut être validé ;
 - le témoin négatif développe une couleur significativement plus sombre que la référence « négative » du comparateur, la raison probable en est un lavage incomplet. L'essai doit être alors répété.
 - Un échantillon est considéré comme positif lorsque le témoin négatif est conforme et que l'échantillon développe une couleur d'intensité égale ou supérieure au comparateur de couleurs n°1.
 - Un échantillon est considéré comme négatif lorsque le témoin négatif est conforme et que l'échantillon développe une couleur d'intensité proche de la référence « négative » du comparateur de couleurs.

• **Problèmes et solutions**

Problèmes	Causes probables	Solutions
La couleur développée par le témoin positif est incomplète, trop lente ou de DO inférieure à 1 après 54 minutes.	<p>Le substrat reconstitué n'a pas été utilisé à température ambiante.</p> <p>Les réactifs du kit sont défectueux.</p> <p>La concentration du témoin positif est non conforme.</p>	<p>Attendre que les réactifs soient à 20-25 °C avant utilisation.</p> <p>Vérifier la date de reconstitution. Si le kit est neuf, contacter le distributeur.</p> <p>Utiliser des tubes en polypropylène pour les dilutions.</p>
Le témoin négatif présente une coloration trop intense ou une DO supérieure à 0,2.	<p>Le lavage des puits a été insuffisant.</p> <p>Il y a interférence avec les composants du produit.</p>	<p>Vérifier que les traces de liquide sont bien éliminées des puits.</p> <p>Reconsidérer le protocole de l'extraction.</p>
Le substrat reconstitué est d'un bleu-vert soutenu.	Il y a contamination par le conjugué.	Préparer un nouveau kit.

Problèmes rencontrés et solutions proposées dans la recherche de l'entérotoxine staphylococcique

CHAPITRE VI

HYGIÈNE DES LOCAUX, DU MATÉRIEL ET DU PERSONNEL

Avec la parution du décret n° 71-636 du 21 juillet 1971, les professionnels exerçant une activité de production et de commercialisation des denrées animales devaient appliquer une réglementation précise concernant les règles d'hygiène (hygiène du personnel, des manipulations, des locaux).

Le contrôle microbiologique du produit fini selon les critères réglementaires fixés par l'arrêté du 21 décembre 1979 permettait de vérifier l'hygiène globale de fabrication.

Pendant de nombreuses années, ce mode de gestion des risques alimentaires lié à des textes réglementaires a fait des professionnels des responsables passifs et a freiné l'évolution des techniques.

En 1993, la directive 93/43/CEE a mis en place un système plus ouvert et évolutif, aussi bien pour l'innovation technologique que pour la maîtrise des risques liés à l'alimentation, faisant dorénavant des professionnels des responsables actifs. Ainsi, le professionnel, pour une entreprise donnée, un site de production donné et un type de production donné doit fixer des règles d'hygiène en fonction des risques et des objectifs à atteindre et s'assurer de leur efficacité en mettant en place des autocontrôles fondés sur les principes de la méthode HACCP (*Voir chapitre I*).

L'essentiel étant la maîtrise des « points critiques » déterminants pour la sécurité alimentaire tout au long de la chaîne de transformation, il est nécessaire de contrôler l'apport de microorganismes pouvant être attribué :

- à l'air ambiant ;
- aux surfaces des locaux et du matériel ;
- au personnel.

1. Classement des locaux en zones de sensibilité

Les locaux des usines agroalimentaires sont classés en zones de sensibilité, selon les opérations effectuées sur le produit. Le classement en zone inerte, sensible ou ultra-sensible correspond à l'évaluation des risques de biocontaminations. La maîtrise de la biocontamination à chaque étape d'élaboration du produit impose des niveaux d'hygiène pour l'air, les surfaces et le personnel.

1.1. Zone inerte (zone à risque faible ou moyen : niveau 1)

En général, le produit n'est pas en contact avec l'air (sauf pour les zones de cuisson). L'air distribué dans ce type de zone sera, si nécessaire, à température et hygrométrie contrôlées.

Les cas sont les suivants :

- zones de réception/stockage de matières premières (produits emballés ou en bacs) à basse température ;
- zones de réception/stockage des matières premières sèches (épices...) avec classement hygrométrique ;
- zones de cuisson ;
- zones d'emballage/encartonnage des produits préconditionnés.

1.2. Zone sensible (zone à risque élevé : niveaux 2 et 3)

En général, les opérations sur le produit sont réalisées à l'air libre dans des salles propres. Il s'agit, en zone sensible, de classe d'empoussièrement, 350 000 et 3 500 000 (norme révisée Fédéral Standard 209 E, publiée en 1992).

- Niveau de risque 2
 - Contrôle de l'empoussièrement
 - 3 500 000 particules de 0,5 mm/m³ → moins de 350 germes/m³ ;
 - Nettoyage et désinfection
 - ≤ 2 microorganismes/cm² ;
- Niveau de risque 3
 - Contrôle de l'empoussièrement
 - 350 000 particules de 0,5 mm/m³ → moins de 35 germes/m³ ;
 - Nettoyage et désinfection
 - ≤ 0,2 microorganisme/cm².

Les cas sont les suivants :

- tranchage, découpe, transformation de produits (viande par exemple) ;
- préconditionnement (pouvant également être classé en zone ultra-sensible selon le type de produit considéré).

1.3. Zone ultra-sensible (zone à risque très élevé : niveau 4)

Zone dans laquelle le produit est rendu très sensible aux biocontaminations suite aux opérations qui lui sont appliquées ou aux manipulations humaines. Dans ce type de zone microbiologiquement maîtrisée, les règles sont strictes et coûteuses :

- épuration de l'air ;
- contrôle de l'empoussièrement de classe 3 500 (F.D 209 E) soit :
 - 3 500 particules de 0,5 µm/m³, → moins de 0,35 germe/m³ ;
- nettoyage et désinfection → moins de 0,2 microorganisme/cm² ;
- contrôle des contaminations par les entrants et sortants ;
- contrôle de l'accès du personnel ;
- tenues vestimentaires appropriées ;
- importance de la formation du personnel.

Les hottes à flux laminaire sont une solution moins onéreuse mais ne sont utilisables que dans le cas où les opérations de transformation peuvent se faire sur un plan de travail. Le local sera alors classé en zone sensible.

Les cas sont les suivants :

- zones de broyage (steaks hachés...) ;
- zones de sortie de refroidissement avant préconditionnement (le produit doit être refroidi à une température ≤ 10 °C en moins de 2 heures) ;
- zones d'assemblage/préconditionnement (plats cuisinés...).

2. Aérobiocontamination

2.1. Contamination de l'air

L'air est un important vecteur de contaminations en milieu industriel pour les aliments non protégés par un emballage.

2.1.1. Flore microbienne de l'air

L'air est un véhicule qui transporte des microorganismes sur des particules de tailles différentes, provenant de milieux naturels (sols, eaux...), des plantes, des animaux et de l'homme.

2.1.1.1. Flore saprophyte

Cette flore de base est constituée par les germes de l'environnement, composés de quelques bactéries et de spores de champignons microscopiques. Elle est retrouvée constamment dans les prélèvements sur un milieu de culture standard. Les bactéries retrouvées régulièrement dans les prélèvements d'air sont des bactéries à Gram positif, généralement les plus résistantes dans le milieu extérieur : *Micrococcus* ou bacilles sporulés comme les *Bacillus*.

La flore mycélienne est très diversifiée et plus abondante en été et en automne (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Botrytis*). Des levures appartenant aux genres *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kloeckera* peuvent également être rencontrées.

2.1.1.2. Flore accidentelle d'origine humaine, animale ou hydro-tellurique

Cette flore vient surcontaminer la flore de base.

Les microorganismes d'origine humaine ou animale peuvent se diviser en deux groupes :

- ceux dont la durée de vie sera limitée dans le milieu extérieur et qui seront rarement retrouvés dans les prélèvements (virus et bactéries fragiles) ;
- ceux capables de survivre pendant un temps plus ou moins prolongé dans le milieu extérieur et qui seront les indicateurs d'une contamination d'origine fécale (*E. coli*, *Enterococcus*...), rhinopharyngée ou cutanée (*Staphylococcus*, *Neisseria*, *Corynebacterium*).

Les microorganismes d'origine hydro-tellurique (bactéries telles que *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, champignons microscopiques et leurs spores) ont une vie indépendante de la présence humaine. Ils prolifèrent avec parfois de faibles quantités de substances nutritives (*Pseudomonas*).

La détection de cette flore accidentelle nécessite souvent l'utilisation de milieux spécifiques.

2.1.2. Supports microbiens

Les microorganismes de l'air sont portés par les poussières atmosphériques et les particules d'origine humaine ou animale.

2.1.2.1. Poussières atmosphériques et aérosols

Les microorganismes, ayant une taille variant de 0,5 à 10 µm, peuvent être véhiculés par la quasi-totalité des poussières. À tout moment, ils suivent le sort des poussières : il est donc très important d'éliminer ces dernières avant toute désinfection.

Des aérosols microbiens, provenant par exemple d'un circuit de climatisation, peuvent contaminer l'air de manière continue ou discontinue.

2.1.2.2. Particules d'origine humaine ou animale

Ces particules peuvent être les suivantes :

- squames : chaque individu dissémine $3 \cdot 10^7$ particules de peau par jour. Ces fragments de cellules épithéliales cutanées, d'une taille moyenne de 15 µm, sont porteuses de bactéries ou de champignons microscopiques ;
- gouttelettes d'expectoration :
 - macrogouttelettes de Flügge : ces particules émises lors de la parole ont un diamètre de 1 ou 2 µm. Elles sédimentent rapidement avec un temps de l'ordre de 1 seconde pour une hauteur de 2 mètres ;
 - microgouttelettes émises par les voies respiratoires de l'homme au cours de la toux ou de l'éternuement : elles ont un diamètre de l'ordre de 2 à 3 µm. Elles sont projetées à très grande vitesse dans l'air et peuvent sédimenter soit en quelques secondes, soit en plusieurs dizaines de secondes.

Les résidus secs, issus des gouttelettes d'expectoration évaporées, constituent des droplets nucléi ou noyaux de condensation de très petite taille. Ils restent longtemps en suspension dans l'air, permettant ainsi une dissémination à longue distance des bactéries portées par ces particules et sont très contaminants.

En fonction de son activité, un opérateur dissémine de 10^5 à 10^7 particules par minute, ce qui montre l'importance de la présence humaine dans la contamination de l'air.

2.1.3. Classes d'empoussièremment

La quantité de contaminants particuliers est facilement contrôlable par spectrophotométrie laser. La société Biotest commercialise un compteur de particules en suspension APC Plus. La mesure véritable du nombre de microorganismes vivants dans l'air est difficile et longue (2 à 5 jours). Il est donc plus aisé de définir des classes d'empoussièremment que des classes de biocontamination. Il existe cependant un projet de norme (ISO 14-628) relatif aux classes de propreté par les biocontaminations. L'évaluation de l'empoussièremment tient compte à la fois de la taille des particules et de leur concentration.

Les classes d'empoussièremment sont définies par :

- la norme américaine Federal Standard 209 D 1 988 (Fig. 1) « Spécificité des salles propres et postes dépoussiérés » ;
- la norme française AFNOR NF X 44-101 1 981 « Définition des classes d'empoussièremment ».

Ces deux normes peuvent être comparées en étudiant les tableaux 1 et 2.

Classe	Nombre de particules par mètre cube	
	$\geq 0,5 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$
4 000	$\leq 4 000$	≤ 25
400 000	$\leq 400 000$	$\leq 2 500$
4 000 000	$\leq 4 000 000$	$\leq 25 000$

Tableau 1 – Norme AFNOR X 44-101

Classe	Nombre de particules par pied cube				
	$\geq 0,1 \mu\text{m}$	$\geq 0,2 \mu\text{m}$	$\geq 0,3 \mu\text{m}$	$\geq 0,5 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$
1	35	7,5	3	1	NA
10	350	75	30	10	NA
100	NA	750	300	100	NA
1 000	NA	NA	NA	$\leq 1 000$	≤ 7
10 000	NA	NA	NA	$\leq 10 000$	≤ 70
100 000	NA	NA	NA	$\leq 100 000$	≤ 700

NA = Non applicable

Tableau 2 – Norme Federal Standard 209 D

Ces normes sont presque équivalentes. Elles diffèrent par l'unité de volume de prélèvement d'air (un pied cube correspond à $30,47 \text{ cm}^3$, soit $0,028 \text{ m}^3$). La norme américaine est un peu plus restrictive que la norme AFNOR puisque, par exemple pour la classe 100, si l'on exprime le nombre de particules de $0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$, on constate qu'on obtient 3 571 particules et non 4 000.

Les classes d'empoussièrément constituent des limites de nombre de particules à ne pas dépasser pour des diamètres de référence de particule mesurés, et sont conventionnellement désignées par le nombre maximal de particules de dimension supérieure ou égale à $0,5 \mu\text{m}$ qu'elles peuvent tolérer.

Dans l'air, plus de 99 % des particules ont une taille inférieure à $1 \mu\text{m}$; cela explique que le classement des salles soit établi sur la base du nombre de particules de taille égale à $0,5 \mu\text{m}$, et statistiquement il est admis que, pour 1 000 à 10 000 particules de $0,5 \mu\text{m}$ de diamètre dénombrées par mètre cube, l'air contient 1 microorganisme/ m^3 . Cette correspondance a permis de donner les limites de la biocontamination pour le classement des locaux en zone de sensibilité.

EXEMPLE

(niveau de risque 3) : 350 000 particules de $0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ et moins de 35 microorganismes/ m^3 .

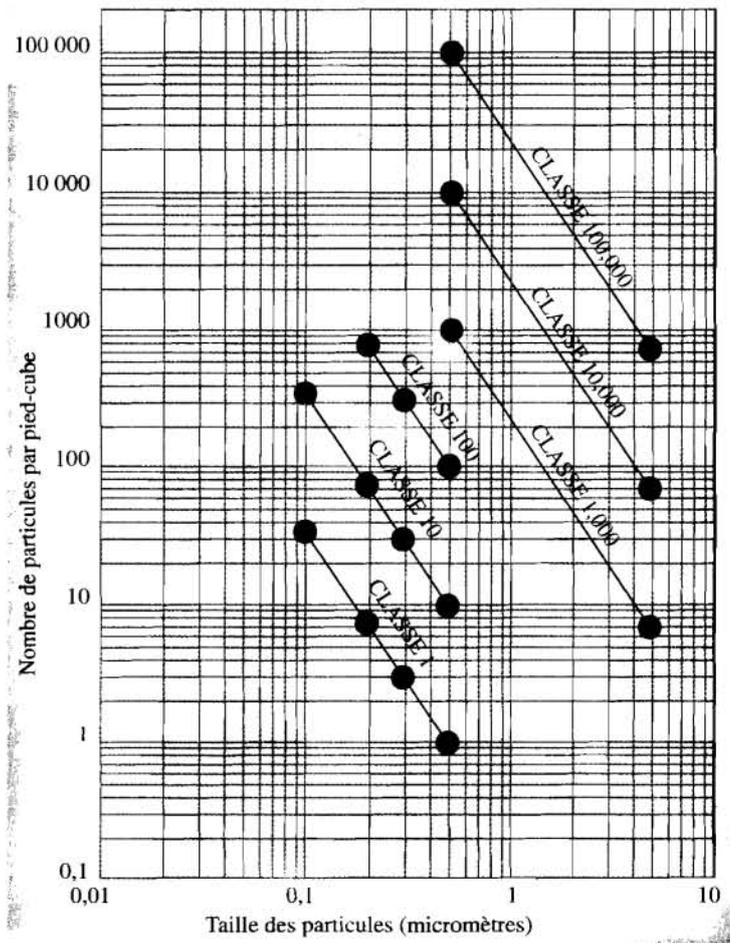


Fig. 1 – Représentation graphique des classes de la Federal Standard 209 D

Le terme de salle propre est devenu usuel pour nommer « une pièce dans laquelle la concentration de particules dans l'ambiance est maîtrisée à l'intérieur de limites spécifiées ».

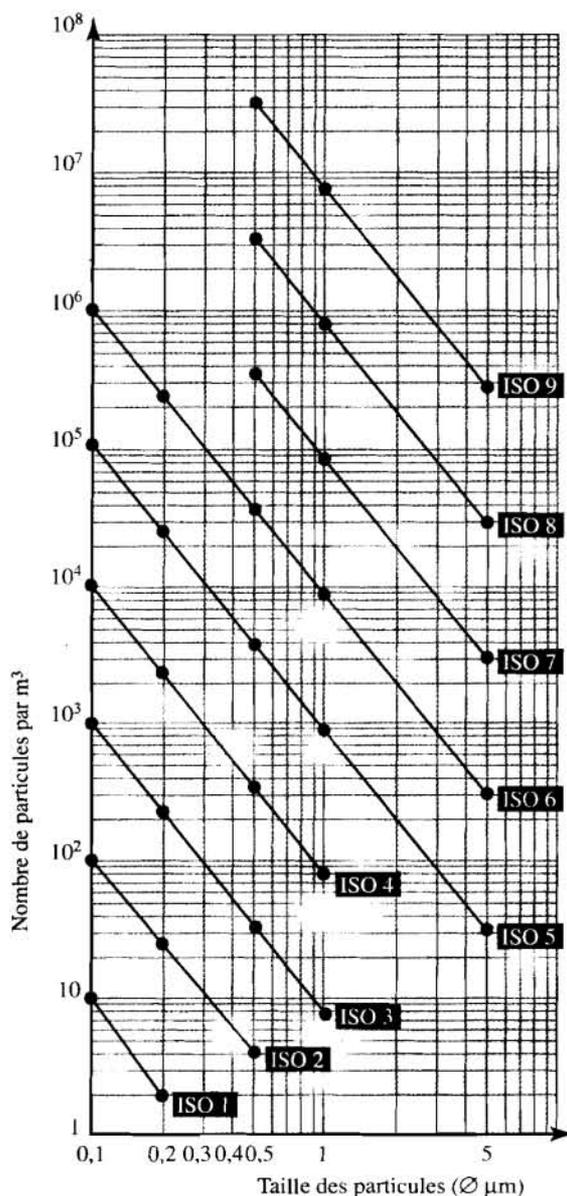


Fig. 2 – Représentation graphique des classes de la norme ISO 14644-1

Selon les exigences de cette norme, la qualité de l'air pour la validation d'une salle propre sera contrôlée dans trois états :

- en période de réception : la salle est construite, prête à être utilisée mais sans appareil de production ni personnel ;
- au repos : la salle est équipée avec les appareils de production mais le personnel est absent ;
- en activité : le personnel travaille, les appareils de production fonctionnent.

En effet, la classe d'une salle dépend considérablement de l'émission particulaire des machines et du personnel. Aux étapes les plus sensibles, les opérateurs portent des vêtements enveloppants, d'un textile approprié, afin de réduire la dissémination des microorganismes.

Le « temps de recouvrance particulaire » est un paramètre indiquant le temps nécessaire, après une perturbation (période d'activité), pour revenir à la classe d'empoussièrement initiale.

Ainsi, l'inoccupation d'un local pendant 1 heure réduit la contamination aéroportée de 50 à 80 %, mais il est évident que les biocontaminants sont alors déposés sur les surfaces.

Dans les industries agroalimentaires, l'exigence de la qualité d'air correspondra dans certains cas à la classe 100 (zone ultra-sensible), mais en général elle est comprise entre la classe 1 000 et la classe 100 000. Dans la pratique, il n'existe pas un seul modèle de salle microbiologiquement maîtrisée, mais de nombreux systèmes plus ou moins complexes, adaptés à la nature de l'activité exercée.

Ainsi, une salle de tranchage du jambon de classe 10 000 en ambiance comportera au niveau de chaque machine de tranchage une zone à flux laminaire de classe 100.

Les salles blanches seront maintenues en surpression, de façon à éviter les contaminations venant de l'extérieur.

Le moyen le plus utilisé pour assurer la qualité de l'air d'un local est un renouvellement de l'air épuré par filtration. Le taux de brassage de l'air et la qualité de la filtration doivent être adaptés à l'activité pratiquée dans le local, et au niveau de qualité d'ambiance exigé.

Plus les performances recherchées sont élevées, plus l'efficacité de la filtration doit être grande et plus le taux de brassage doit être important.

Les filtres absolus utilisés pour les classes 100 éliminent plus de 98 % des particules de 1 µm et 99,9 % des particules de 5 µm ou plus.

D'autres normes existent (britannique, allemande, japonaise...), mais un groupe de travail ISO 209 a élaboré une norme internationale reprise par le comité européen et l'AFNOR en France.

Cette norme parue fin 1999 porte la référence ISO 14644-1 et définit neuf classes de propreté particulaire de l'air.

Deux classes nouvelles apparaissent : classes ISO 1 et ISO 9 (Fig. 2).

2.2. Contrôle de la qualité microbiologique des ambiances

2.2.1. Objectifs de l'étude

Les objectifs sont :

- soit de détecter une source de contamination capable de disséminer des microorganismes dans l'air ;
- soit d'estimer la charge microbienne de l'air, c'est-à-dire une estimation à la fois quantitative et qualitative, à un temps donné ou à différents temps et dans différents lieux stratégiques du local ;
- soit de réaliser des tests d'efficacité de produits bactéricides et fongicides dans l'air.

Les valeurs observées pourront être comparées à des valeurs usuelles ou à des valeurs officielles, si elles existent.

2.2.2. Étude quantitative de l'aérobiocontamination

La mesure quantitative de la contamination aéroportée peut servir à vérifier d'une semaine ou d'un mois à l'autre la fiabilité d'un système de traitement d'air : filtres non colmatés, gaines de climatisation en bon état, soufflage suffisant, etc. Des variations de 1 à 10 entre deux dénombrements successifs mettraient en évidence une détérioration du système : obstruction d'une gaine, pollution d'un bac humidificateur...

En ce qui concerne les locaux devant être gardés très propres, des contrôles plus fréquents sont indispensables.

L'air d'un local est considéré comme très propre à moins de 5 pnc/m³, et propre à moins de 100 pnc/m³ (pnc : particules donnant naissance à des colonies).

La biocontamination « normale » habituelle d'un endroit occupé est de 100 à 1 000 pnc/m³ ; au-dessus de 1 000 pnc/m³ l'air est fortement souillé.

Les notions de propreté et de saleté sont très relatives à l'usage des locaux. Ainsi, par exemple, on note une grande différence entre un hall de stockage de denrées brutes et une chaîne de fabrication de plats cuisinés.

De nombreuses méthodes d'étude existent, présentant chacune des avantages et des inconvénients.

2.2.2.1. Méthode statique : la sédimentation

C'est une méthode très simple et très souvent utilisée. Des boîtes de Petri ouvertes, renfermant un milieu de culture standard ou sélectif sont exposées à l'air puis, après une trentaine de minutes, voire plus, elles sont incubées, en général 48 heures à 30/35 °C pour les microflore bactériennes et 5 jours à 28/30 °C pour la flore fongique.

Les pnc correspondant aux particules ayant sédimenté pendant l'exposition des boîtes sont dénombrées. Les colonies microbiennes qui se sont développées peuvent éventuellement être identifiées.

En fait, cette méthode ne permet pas d'étudier précisément la contamination de l'air. Une proportion infime des biocontaminants aéroportés se dépose à la surface du milieu de culture, car seules les particules les plus grosses sédimentent.

Les résultats obtenus sont non quantitatifs puisque la méthode ne permet pas de mesurer un quelconque volume d'air, et aléatoires puisqu'ils dépendent des turbulences de l'air dans la zone examinée (un air très pollué mais en courant ascendant donnera 0 pnc).

En revanche, cette méthode est très intéressante dans le domaine agroalimentaire, pour une étude de l'évolution au cours du temps de la contamination d'une surface en un point critique.

2.2.2.2. Méthodes dynamiques

Il faut une vitesse suffisamment grande pour que l'air puisse déposer sur une surface les particules qu'il transporte ; ces méthodes permettent donc un contrôle plus exact de l'aérobiocontamination.

Les biocollecteurs sont des appareils qui piègent les microorganismes en milieu liquide (Impingers) ou en milieu solide (Impactors).

L'air est aspiré, sous un volume connu et selon un débit connu, et les particules biologiques sont projetées à grande vitesse sur un support, nutritif ou non.

Connaissant le volume d'air prélevé, on rapporte le nombre de pnc au mètre cube d'air (pnc.m⁻³).

- **Impingers ou flacons barboteurs**

Les particules de l'air portant les microorganismes passent dans un tube plongeur et sont recueillies dans un volume mesuré d'eau physiologique stérile. Ce milieu liquide est ensuite analysé par un dénombrement classique en milieu solide.

Les plus fines particules collectées ont un diamètre de $0,3 \mu\text{m}$, et les vitesses d'impact varient de 3 à 11 m/s en fonction du débit d'air aspiré et du diamètre du tube d'aspiration.

Ces appareils ont l'inconvénient de dissocier les amas microbiens, donc de donner un résultat par excès, et parfois de stresser, à cette grande vitesse d'impact, les microorganismes collectés.

- **Impactors ou impacteurs**

Ce sont des appareils composés de deux modules : un moteur aspirateur et un ou plusieurs orifices accélérateurs de l'air aspiré. Ils piègent les particules sur un milieu solide.

On peut utiliser, comme récepteurs, des milieux gélosés ou des membranes filtrantes en gélatine.

Le cheminement des particules de l'air dans l'appareil de prélèvement permet de distinguer les impacteurs à cribles, les impacteurs à fentes et les impacteurs à centrifugation.

- **Les impacteurs à cribles**

L'air aspiré passe au travers de plaques perforées ayant des trous parfaitement calibrés d'un diamètre de plus en plus petit et, à chaque niveau, les microorganismes sont collectés sur des boîtes de Petri.

- **L'impacteur particulaire d'Andersen** : cet impacteur en cascade comprend 6 étages de prélèvement. Les diamètres des cribles successifs sont, de haut en bas, de 6, 4, 3, 2, 1 et $0,65 \mu\text{m}$.

L'air est aspiré à un débit d'environ 28 litres par minute (voisin de celui de la respiration d'un homme en activité), et sa vitesse augmente en traversant les 6 cribles aux orifices de plus en plus fins (1 m/s jusqu'à 23 m/s).

En fonction de la vitesse de l'air, les particules les plus lourdes viendront s'impacter en face de l'orifice sur la surface du milieu gélosé placé immédiatement en aval ; les plus légères seront entraînées dans le flux d'air et contourneront la boîte de Petri.

Cet appareil reflète les différents étages de l'arbre respiratoire et permet une appréciation des risques de pénétration, non seulement des particules biologiques, mais également de certains types de contaminants (suie, ciment, amiante), en faisant varier la nature de la surface de collision pour effectuer ensuite des pesées.

- **Le biocollecteur Joubert** : cet appareil simplifié à 3 étages avec des cribles d'un diamètre de 5, 2 et $1 \mu\text{m}$ dérive de l'appareil d'Andersen. Il est uniquement utilisé pour le recueil des biocontaminants (Fig. 3).

Le débit est beaucoup plus élevé (500 L/min), et permet de mesurer, avec des temps de prélèvement de 2 à 10 minutes, des taux de biocontamination de l'ordre de l'unité au m^3 .

- **Le Surface Air System (SAS)** est un autre appareil, réalisant aspiration de l'air et projection de cet air sur un milieu gélosé.

- **Les impacteurs à fentes**

- **L'appareil de Casella – Bourdillon** : l'air aspiré arrive verticalement, passe au travers de quatre fentes horizontales et frappe la surface d'un milieu gélosé contenu dans une boîte de Petri. La boîte est posée au-dessous des fentes sur une platine tournante à vitesse réglable, permettant une répartition uniforme des particules aériennes. L'appareil a des débits variables, allant de 30 à 700 L/min et peut collecter des particules jusqu'à $0,5 \mu\text{m}$ de diamètre. Connaissant le débit et la vitesse de rotation, on peut calculer le nombre de pnc par unité de volume et unité de temps.

- **Les impacteurs à centrifugation**

- **Le Reuter Centrifugal Sampler (RCS)** utilise la force centrifuge d'une hélice, présente dans la tête de l'appareil, pour projeter les particules contenues dans l'air sur une bande plastique portant des alvéoles juxtaposées garnies de milieu gélosé. Le débit de l'appareil RCS *High Flow* est de 100 L/min, et des volumes de prélèvement compris entre 0 et 1m^3 peuvent être sélectionnés par l'utilisateur. Les particules collectées sont de petite taille (de $2 \mu\text{m}$ à $5 \mu\text{m}$). Il s'agit d'un appareil souvent utilisé, car peu encombrant, très maniable, fonctionnant de façon autonome avec des batteries rechargeables, et facile à déplacer d'un endroit à un autre.

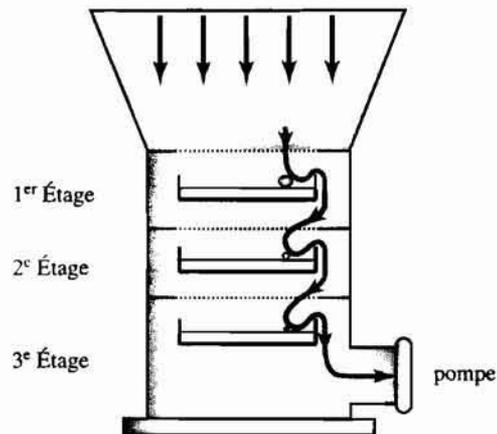


Fig. 3 – Schéma du principe du biocollecteur Joubert

• Appareil de Sartorius

Un volume donné d'air est aspiré au travers d'une ou plusieurs membranes filtrantes en gélatine qui retiennent les microorganismes. La gélatine est ensuite dissoute dans un liquide (appareil de Sartorius) à partir duquel on effectuera un dénombrement classique. Les résultats obtenus en pnc/m³ sont en général inférieurs à ceux des appareils précédents, à cause de la mortalité par dessiccation des microorganismes retenus sur et dans le réseau de gélatine.

2.2.3. Étude qualitative de la contamination aéroportée

L'étude quantitative doit être complétée par une étude qualitative pour identifier les « souches usines », qui s'implantent dans l'ambiance des ateliers de production. Elle est réalisée en remplaçant les milieux nutritifs non sélectifs, utilisés dans les appareils précédents, par des milieux sélectifs (Chapman ou Baird-Parker pour les *Staphylococcus*, bile-esculine-azide pour les *Enterococcus*, Mac Conkey ou VRBL pour les coliformes, VRBG pour les entérobactéries, milieu au malt pour les champignons) et en identifiant les colonies microbiennes qui se sont développées. C'est un travail long et fastidieux, qui ne se justifie que dans le cas d'une contamination massive et homogène dont il faut déterminer la source.

2.2.4. Études comparatives

Des études comparatives entre les différents appareils montrent que les résultats ne sont pas superposables d'un appareil à l'autre. De grandes variations sont constatées, aussi bien quantitatives que qualitatives.

En effet, chaque appareil possède son mode spécifique de prélèvement et ne collecte pas les mêmes tailles de particules. Les débits d'aspiration d'air sont variables, ainsi que les durées de prélèvement et les vitesses d'impact sur le support. Le choix d'un appareil se fera en fonction d'objectifs qui auront été déterminés au préalable.

2.2.5. Utilisation d'un biocollecteur pour le contrôle de l'aérobiocontamination

Se reporter à la manipulation 37 : Utilisation d'un biocollecteur pour le contrôle de l'aérobiocontamination.

2.2.5.1. Étude quantitative et qualitative de l'aérobiocontamination d'un local à un temps donné

Il s'agit d'effectuer des prélèvements d'air avec un biocollecteur et de déterminer le nombre de particules donnant naissance à des colonies/m³, en utilisant des milieux sélectifs afin de définir la nature des contaminants.

Il faut également évaluer la contamination des surfaces par voie aérienne au même moment par la technique des boîtes de Petri ouvertes, très adaptée à l'étude d'un circuit dans une usine.

Les résultats obtenus lors des deux évaluations montreront qu'il n'y a souvent aucune corrélation possible entre le nombre de pnc/m³ d'air et le nombre de pnc susceptibles de sédimenter sur une boîte de Petri dont la surface est relativement faible, d'environ 60 cm². Il est donc nécessaire d'effectuer les deux types de prélèvements.

2.2.5.2. Établissement du profil microbien au cours du temps : cinétique de biocontamination due à une émission cutanée

Un homme émet plus de 10⁵ à 6.10⁶ particules/min. En considérant un rapport très théorique de 1 % de biocontaminants, il s'agit d'une bioémission de 10² à 6.10³ pnc/min.

L'évolution du nombre des microorganismes dans un local sera suivie en effectuant des prélèvements successifs toutes les 30 minutes ou toutes les heures.

Un premier prélèvement sera réalisé lorsque le local est vide, un deuxième après l'entrée et l'installation des personnes, d'autres pendant une période de calme, d'autres pendant une période d'activité, et un dernier si possible 1 heure après le départ des personnels. Un calcul théorique de la contamination finale (en nombre de pnc/m³) du local occupé pendant un certain temps, par x personnes en activité, pourra être comparé aux résultats pratiques obtenus avec le biocollecteur. C'est le mouvement qui est très important dans l'aérocontamination. Les courants d'air déplacent les contaminants de leurs supports, l'agitation humaine augmente l'émission de particules de 10 fois au moins par rapport à une position de repos. L'émission cutanée permanente est diminuée par le port de tissus de protection efficaces (blouses, combinaisons, cagoules...).

2.2.5.3. Établissement de la cartographie de la contamination aérienne d'un local à différents temps

Il s'agit d'effectuer des prélèvements d'air pendant plusieurs jours, à différents moments, sur différents points stratégiques du local et d'effectuer les moyennes des résultats pour essayer de définir les zones à risques, c'est-à-dire l'endroit où le produit fabriqué peut être contaminé.

3. Hygiène des surfaces et des matériels

3.1. Nettoyage et désinfection

Les surfaces, les récipients et les matériels en contact avec les produits alimentaires doivent être constamment maintenus à un bon niveau de propreté.

Trois types d'opérations contribuent au maintien d'une bonne hygiène des surfaces :

- le nettoyage qui a pour but d'éliminer les souillures visibles : il s'agit, en général, de substances organiques provenant des matières premières ou du produit en cours de fabrication. C'est la propreté physique ;
- la désinfection qui peut être réalisée simultanément au nettoyage, mais qui est plus efficace lorsqu'elle intervient après un nettoyage et un rinçage soigneux des surfaces. La norme AFNOR NFT 72-101 définit le terme désinfection : « Opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes présents au moment de l'opération. » C'est la propreté microbiologique ;
- le rinçage est destiné à éliminer toute trace de produit utilisé précédemment, sans évidemment apporter une nouvelle souillure ou de nouveaux microorganismes. C'est la propreté chimique. Un rinçage mal effectué peut être à l'origine de la présence dans l'aliment de résidus indésirables de détergents et de désinfectants.

Selon les zones à risque, il convient de définir une procédure de nettoyage et de désinfection :

- zone à risque faible : un simple nettoyage peut être mis en œuvre ;
- zone à risque moyen : une procédure en trois points est appliquée, c'est-à-dire un prélavage, un nettoyage-désinfection et un rinçage final ;
- zone à risque élevé : une procédure en cinq points est utilisée, c'est-à-dire un prélavage, un nettoyage, un rinçage, une désinfection et un rinçage final ;
- zone à risque très élevé : il s'agit des salles microbiologiquement maîtrisées nécessitant également une procédure en cinq points.

3.2. Contrôle de la propreté microbiologique

Des prélèvements effectués sur la surface à traiter permettent de révéler le ou les types de microorganismes présents et d'évaluer le degré de contamination. Les modalités de la procédure de nettoyage et de désinfection sont alors déduites des résultats obtenus.

La propreté microbiologique est ensuite contrôlée en procédant à des prélèvements, qui sont effectués en général entre une et deux heures après l'opération de nettoyage et de désinfection.

Ces tests permettent de contrôler l'efficacité, et donc de valider la procédure mise en œuvre.

Le suivi de la qualité microbiologique de la procédure peut être réalisé, semaine après semaine, dans chaque atelier et, dès que la qualité descend en dessous d'un seuil acceptable, il faut déclencher des opérations correctives permettant de revenir à un bon niveau de qualité.

Il est nécessaire de définir, par atelier et par matériel, les points à contrôler car il n'est pas possible de réaliser un très grand nombre de prélèvements pour s'assurer qu'un appareil ou un local est propre. Ces points doivent être représentatifs de l'état de propreté général.

3.2.1. Techniques de prélèvement de surface

Il existe principalement deux types de méthodes pour détacher les microorganismes présents sur une surface :

- l'écouvillonnage ;
- l'adhérence sur un milieu gélosé.

3.2.1.1. Technique d'écouvillonnage

Cette technique présente l'avantage de permettre des prélèvements dans des endroits peu accessibles aussi bien que sur les surfaces planes ou bombées.

Elle est intéressante pour rechercher les « nids microbiens » pouvant se former dans des coins ou des cavités.

L'écouvillonnage est à conseiller pour une recherche qualitative des espèces contaminantes.

Pour réaliser une étude quantitative grossière, il faut délimiter précisément la surface à traiter avec l'aide éventuelle d'un gabarit standard d'écouvillonnage.

Pour que les écouvillonnages donnent des résultats reproductibles, ils doivent être réalisés par le même manipulateur, selon un protocole standardisé.

Il existe une méthode qui permet un contrôle en temps réel de l'efficacité des procédures de nettoyage-désinfection et une action corrective immédiate (re-nettoyage-désinfection) ; si les résultats ne sont pas satisfaisants, c'est l'écouvillonnage suivi d'une ATPmétrie (Voir chapitre III).

Cette technique est rapide (résultat en moins de 1 minute), simple et facile à mettre en œuvre.

Les méthodes traditionnelles indiquent uniquement la présence ou l'absence de microorganismes.

Le kit hygiène (Kit Hygiène Monitoring QM Lumac) permet la mesure :

- de l'ATP contenu dans les microorganismes viables ;
- de l'ATP non microbien provenant de résidus de fabrication ou matières organiques ;
- de l'ATP extra-cellulaire ou libre issu de débris cellulaires ou de cellules microbiennes lésées.

Ainsi, cette technique présente l'avantage de détecter des résidus qui serviront de support de développement aux microorganismes.

3.2.1.2. Technique d'impression sur gélose

Ce procédé reste le plus pratique, le plus rapide et le plus employé. Il nécessite l'emploi de boîtes « contact » contenant un milieu gélosé qui forme un ménisque en surface : boîtes Rodac (*Replica Organism Direct Contact*).

Le couvercle repose sur un épaulement et ne touche donc pas la surface de la gélose (Fig. 5).

Les boîtes Rodac ont un diamètre de 60 mm, une surface d'environ 30 cm² et leur fond est quadrillé de façon à faciliter le comptage des colonies. Pour un contrôle de surface après une désinfection, il est recommandé d'utiliser un milieu gélosé neutralisant l'activité des désinfectants. Quantitativement, il faut savoir que l'adhérence des microorganismes d'une surface à la surface d'une gélose est fonction de :

- la planéité de la surface ;
- l'hydratation suffisante de la surface gélosée.

L'existence d'un film gras empêche le contact avec le milieu gélosé et on peut conclure faussement à une faible contamination.



Fig. 5 – Schéma d'une boîte Rodac

3.2.1.3. Contrôle d'une surface par la technique d'écouvillonnage

Se reporter à la manipulation 38 : Contrôle d'une surface par la technique d'écouvillonnage.

3.2.1.4. Contrôle d'une surface par la technique d'impression sur gélose

Se reporter à la manipulation 39 : Contrôle d'une surface par la technique d'impression sur gélose.

3.2.2. Traceurs microbiens

D'une manière générale, tous les microorganismes intéressants en hygiène alimentaire sont choisis comme traceurs microbiens. La numération de la flore mésophile aérobie traduit la contamination globale.

Les coliformes sont recherchés si une contamination fécale est redoutée. Les *Pseudomonas* doivent être détectés lors de la surveillance des équipements en contact avec les eaux de boisson et de fabrication. Les levures et les moisissures sont dénombrées dans certains secteurs industriels où elles posent problème en affectant la conservation et le goût des boissons et aliments (fabrication de jus de fruits, panification, pâtisserie...). Les milieux utilisés sont souvent les mêmes que pour une recherche et un dénombrement par méthode classique :

- gélose trypticase soja pour la flore totale mésophile aérobie ;
- gélose VRBG pour les entérobactéries ;
- gélose VRBL pour les coliformes ;
- gélose au rose bengale et chloramphénicol pour les levures et moisissures ;
- milieu de King modifié pour l'isolement sélectif de *Pseudomonas*.

3.2.3. Évaluation des résultats

• Barèmes spécifiques

La contamination résiduelle est estimée puis appréciée en fonction de la zone à risque considérée et des barèmes spécifiques à l'activité industrielle mis en place par le service qualité de l'entreprise. Par exemple, pour une zone à risque élevé, le nombre de colonies à la surface d'une boîte Rodac (environ 30 cm²) permet de considérer que :

- 1 à 10 colonies : très bon résultat ;
- 11 à 25 colonies : bon résultat ;
- 26 à 100 colonies : résultat limite ;
- des colonies confluentes sont un mauvais résultat.

• Utilisation de schémas

Dans le cas des lames gélosées Hycon de chez Biotest, le nombre d'UFC/100 cm² (unités formant colonies) est déterminé en comparant la densité des colonies obtenues à la surface des lames avec l'aspect des schémas de lames étalon ayant été immergées dans des suspensions microbiennes de concentrations connues (Fig. 6). L'interprétation des autres lames gélosées commercialisées fait également référence à des schémas.

• Valeur des résultats obtenus

Dans la pratique, il n'existe pas de moyens corrects pour mesurer la contamination microbienne d'une surface. En effet, seule une certaine proportion de la microflore présente est prélevée.

À partir d'un écouvillonnage ou d'une boîte contact sur une surface plane, l'efficacité du décrochement serait environ de 40 %.

Il faut considérer également qu'une colonie présente sur boîte contact ne provient pas d'une bactérie mais plutôt d'une microcolonie, car il n'y a pas eu de dispersion des microorganismes dans un liquide de dilution (d'où un résultat exprimé en UFC).

C'est pourquoi, ces méthodes ont simplement un intérêt de comparaison :

- comparaison entre deux surfaces différentes ;
- comparaison entre deux prélèvements effectués à différents moments sur une même surface.

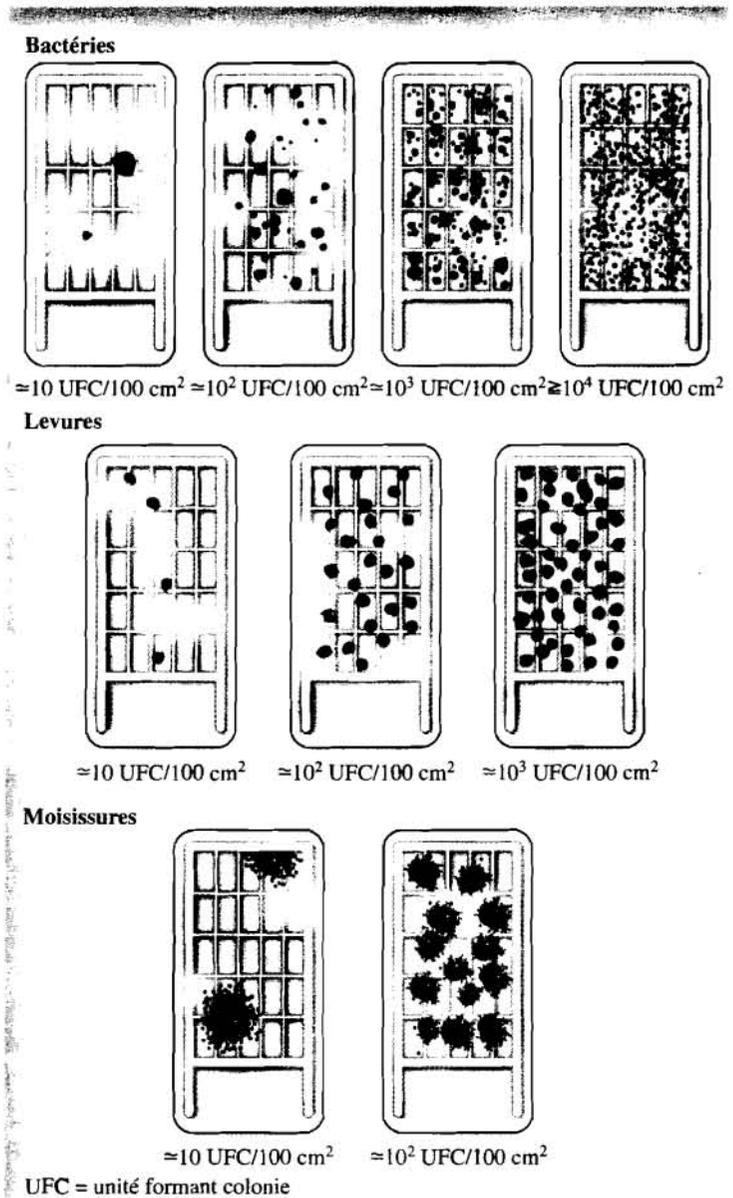


Fig. 6 – Schémas des lames étalon (selon Hycon de Biotest)

4. Contrôle de l'hygiène du personnel

Certaines industries sont très automatisées, mais d'autres font intervenir du personnel dans de nombreuses opérations au cours de la fabrication d'un aliment (manipulation, contrôle...).

La pratique de l'hygiène n'est souvent pas assez rigoureuse puisque 80 % de la contamination des produits serait d'origine humaine.

Un individu émet de très nombreuses particules dans son environnement proche, pouvant provoquer une contamination directe du produit, et des contaminations secondaires par dissémination des microorganismes dans l'atmosphère.

Il convient de prendre en compte les points suivants lors de l'étude des dangers potentiels liés à l'hygiène du personnel :

- l'état de santé ;
- la propreté (en particulier l'hygiène des mains) ;
- la tenue vestimentaire.

Mais l'analyse d'autres éléments tels que le comportement au poste occupé, la formation assurée et la circulation du personnel, représente une part essentielle dans le système HACCP pour assurer la sécurité microbiologique d'un produit alimentaire.

4.1. État de santé du personnel

L'arrêté du 10 mars 1977, paru au *Journal officiel* le 31 mars 1977, précise qu'une personne ne peut être affectée ou maintenue dans un emploi nécessitant la manipulation de denrées animales ou d'origine animale, si elle est reconnue atteinte d'une maladie transmissible ou porteuse de germes ou de parasites, à la suite des examens de dépistage suivants :

- une coproculture comportant la recherche des *Salmonella*, des *Shigella*, et un examen parasitologique des selles, notamment pour la recherche des formes végétatives et kystiques d'amibes dysentériques ;
- une recherche de staphylocoques présumés pathogènes dans le rhinopharynx et les fosses nasales ;
- une recherche de streptocoques hémolytiques A dans le pharynx.

Cette personne est donc écartée des locaux de fabrication des aliments jusqu'à ce qu'un nouveau prélèvement soit reconnu négatif.

Le dépistage des porteurs sains n'est pas sans poser de problèmes car il doit être :

- d'un coût supportable ;
- accepté par le personnel concerné ;
- pertinent, ce qui n'apparaît pas être le cas lors de la recherche systématique de *Staphylococcus aureus*. En effet, en général, les souches hébergées au niveau des voies respiratoires par les 10 à 20 % de porteurs sains, ne sont pas productrices d'une entérotoxine et donc pas responsables d'une toxi-infection alimentaire. En revanche, ce sont des souches responsables de suppurations cutanées telles que panaris, furoncles..., qui sont le plus souvent productrices d'entérotoxines ;
- efficace, ce qui ne semble pas être le cas des coprocultures systématiques, car le portage peut être intermittent et de faible densité. De plus, la question du traitement ou du non-traitement des porteurs sains dépistés se pose, car l'antibiothérapie ne diminue pas la durée du portage et peut susciter des résistances plasmidiques.

Les coprocultures peuvent présenter un intérêt pour une enquête rétrospective lorsqu'une toxi-infection alimentaire est apparue.

En sortant des toilettes, un lavage systématique et soigneux des mains est suffisant pour faire disparaître les risques de toxi-infection alimentaire.

4.2. Propreté

4.2.1. Propreté de la chevelure (barbe et moustache)

Même bien entretenues, la chevelure, la barbe ou la moustache hébergent des microorganismes, principalement des bactéries.

Aussi, dans les zones sensibles ou ultra-sensibles, les cheveux doivent être correctement recouverts par une coiffe.

4.2.2. Hygiène des mains

C'est souvent par des mains « sales », c'est-à-dire colonisées par une flore transitoire potentiellement pathogène, que se fait le transfert aux aliments. Les mains sont le support de nombreux microorganismes qui se trouvent en général en plus grand nombre au bout des doigts, en particulier sous les ongles, ainsi qu'entre les doigts. Le port de bagues et de bracelets est à proscrire, car ils sont source de nids microbiens.

Le lavage des mains doit être fait selon une méthode et une fréquence établies. Il doit être réalisé systématiquement avant tout geste sur du matériel propre et après tout geste contaminant, en particulier après le passage aux toilettes, afin de prévenir les risques d'intoxications alimentaires. Le lavage simple permet d'éliminer les souillures, les squames cutanées et de réduire la flore transitoire de 30 à 40 %. Le lavage antiseptique ou hygiénique diminue la flore cutanée de 80 %. Il agit sur la flore en superficie et un peu sur les germes dans les couches profondes de la peau.

Des lave-mains, avec commande des robinets à pied ou à genou, et dont la forme évite les éclaboussures, doivent être installés en nombre suffisant, à la sortie des W.C., à proximité des postes de travail, à l'entrée des ateliers.

Ces appareils sont munis d'un distributeur de produit liquide de désinfection, actionné au coude, devant être correctement approvisionné.

L'essuyage se fait grâce à un essuie-mains en papier à usage unique et non par un sèche-mains qui ventile les germes cutanés dans l'environnement.

S'il y a port de gants, ils doivent être utilisés à bon escient.

4.3. Tenue de travail

Les vêtements souillés de matière organique par contact avec des aliments en cours de fabrication deviennent d'excellents supports pour le développement de microorganismes et peuvent être à l'origine de contaminations secondaires ; ils doivent être changés à une fréquence déterminée, lavés et désinfectés entre deux utilisations.

Il doit exister des sas vestiaires pour revêtir une tenue adaptée, c'est-à-dire d'un niveau de protection plus ou moins important en fonction des types de zone et du niveau de risque de contamination du produit :

- zone inerte : tenue normale ;
- zone sensible : blouse, coiffe et gants ;
- zone ultra-sensible : blouse, coiffe, surchaussures, gants et masque.

Le contrôle microbiologique des vêtements peut se faire en réalisant une empreinte sur un milieu gélosé (boîte contact, lames gélosées).

4.3.1. Mise en évidence de microorganismes présents sur les cheveux, sur les poils de barbe ou de moustache, à la surface de la peau ou sur les mains

Se reporter à la manipulation 40 : Mise en évidence de microorganismes présents sur les cheveux, sur les poils de barbe ou de moustache, à la surface de la peau ou sur les mains.

4.3.2. Contrôle de l'hygiène des mains

Se reporter à la manipulation 41 : Contrôle de l'hygiène des mains.

Utilisation d'un biocollecteur pour le contrôle de l'aérobiocontamination

Objectifs	Calibrage du biocollecteur pour déterminer une démarche de prélèvement. Vérification de la répétabilité des résultats.
Principe	<p>Il est nécessaire de choisir un appareil et de l'utiliser ensuite pour réaliser toutes les mesures, quels que soient ses qualités et ses défauts. En effet, les mesures ne sont que des mesures comparatives et il est impossible de récupérer 100 % de la contamination aéroportée au moment du prélèvement. Sur chaque site, les modalités du prélèvement sont à déterminer afin d'obtenir un résultat fiable, avec un temps de prélèvement relativement court. Il faut éviter la déshydratation du milieu de culture et une altération des microorganismes qui entraîneraient une sous-estimation des résultats.</p> <p>• Milieu et matériel Le RCS Plus de Biotest présente comme avantages d'être compact, léger et autonome avec une batterie incorporée, mais nécessite des milieux de culture prêts à l'emploi sur des bandelettes flexibles et n'est efficace que pour la collecte des particules de 2 à 5 µm. Le milieu de culture indicateur de germes de l'air GK-A de Biotest permet la détermination du nombre total de germes, que ce soient les bactéries aérobies ou les moisissures. Il existe des milieux sélectifs pour d'autres microflores.</p> <p>REMARQUE D'autres appareils également très maniables, comme le Bio-Impactor 100.08 (Air Stratégie), sont adaptés à l'utilisation de milieux en boîte de Petri, ce qui représente une économie en consommables importante. Ils permettent également de pouvoir choisir le milieu de culture, en particulier les milieux sélectifs, et de couler soi-même la gélose en épaisseur suffisante pour éviter une déshydratation importante lors de prélèvements de longue durée. Le Bio-Impactor 100.08 est capable en outre de collecter des particules aussi fines que celles de 0,8 mm, permettant le contrôle d'un air filtré (flux laminaire par exemple).</p>
Mode opératoire	<p>• Utilisation du RCS</p> <ul style="list-style-type: none"> – Préparer le collecteur et insérer la bande de gélose (<i>Voir figure</i>). – Prélever l'échantillon. – Incuber la bande de gélose GK-A, 48 heures à 30-35 °C. – Dénombrer les colonies. – Le comptage des colonies de microorganismes est effectué directement à l'œil nu au travers de l'étui. Le dénombrement est facilité si l'on place la bande de gélose au-dessus d'une source lumineuse.

Le nombre de germes peut être calculé par unité de volume selon les formules suivantes :

$$1 \text{ pnc/m}^3 \text{ d'air} = \frac{\text{colonies sur bande de gélose} \cdot 1000}{\text{volume prélevé}}$$

$$1 \text{ pnc/L d'air} = \frac{\text{colonies sur bande de gélose}}{\text{volume prélevé}}$$

• **Calibrage de l'appareil**

- Sélectionner différents temps de prélèvement et donc des volumes de prélèvement d'air (débit 50 L/min) : 25 L/30 secondes, 50 L/1 minute, 100 L/2 minutes, 200 L/4 minutes et 400 L/8 minutes, par exemple.
- Répéter 3 fois l'opération pour chaque temps sélectionné.
- Après incubation et dénombrement des pnc/m³ d'air, choisir le temps de prélèvement, c'est-à-dire le volume d'air prélevé qui paraît donner le résultat le plus fiable.

• **Répétabilité des résultats**

Le choix du temps ou du volume de prélèvement étant fixé pour un lieu donné, il est nécessaire de vérifier que les résultats sont identiques (ou du moins homogènes) pour une série d'environ 8 prélèvements réalisés au même moment.

Composition du milieu GK-A

Peptone de caséine	15,0 g
Peptone de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	16,0 g
Eau	qsp 1 000 mL
pH : 7,3 ± 0,2	

Contrôle d'une surface par la technique d'écouvillonnage

<p>Prélèvement et réalisation du liquide d'essorage</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Au moment du prélèvement, plonger l'extrémité de l'écouvillon dans une solution stérile pour l'humidifier (eau distillée, eau peptonée tamponnée, tryptone-sel). Dans le cas d'une surface nettoyée et désinfectée, il est recommandé d'utiliser une solution d'eau distillée stérile à 0,1 % de lécithine et 0,5 % de polysorbate 80 (Tween 80) pour neutraliser les résidus de désinfectants phénoliques et d'ammoniums quaternaires car les bactéries viables, dont la croissance a été stoppée par la désinfection, pourront ainsi reprendre leur développement. Ce mélange peut être remplacé par le milieu Lethen, commercialisé chez DIFCO et BBL. - Éliminer l'excès de milieu en pressant légèrement le coton sur les parois du tube. - Rouler doucement l'écouvillon sur la surface à contrôler. - Remettre l'écouvillon dans le tube contenant un certain volume (2 mL, 5 mL ou 10 mL) du milieu précédent. - Agiter l'écouvillon dans la solution, ou fermer le tube contenant l'écouvillon et le passer au vortex au moins 15 secondes afin de disperser les microorganismes.
<p>Analyse du liquide d'essorage et de ses éventuelles dilutions</p>	<p>Cette analyse peut être réalisée selon différentes méthodes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dénombrement après culture en milieu solide <ul style="list-style-type: none"> - Ensemencer des inoculum de 0,1 mL à 1 mL de la suspension ainsi réalisée (ou de ses dilutions) à la surface de milieux nutritifs, sélectifs ou non, choisis en fonction des différentes flores étudiées. - Incuber à 25-30 °C jusqu'à 5 jours. <p>Pour tester 1 mL du liquide d'essorage, il est possible de :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Répartir ce volume à la surface d'un milieu contenu dans trois grandes boîtes de Petri (à raison de 0,3 mL, 0,3 mL et 0,4 mL). - Déposer ce volume au centre d'un Pétrifilm. - Réaliser une filtration. <p>AES Laboratoire commercialise des kits écouvillons permettant un ensemencement directement <i>in situ</i>, évitant ainsi les problèmes liés au transport.</p> <p>Ce liquide peut, enfin, être analysé en immergeant un échantillonneur constitué d'une languette plastique supportant un filtre (pores de 0,45 µm) soudé à un tampon absorbant imprégné d'un milieu nutritif approprié (échantillonneur de surface Millipore).</p> <ul style="list-style-type: none"> • ATP métrie <p>Le principe de la méthode est traité au chapitre III (<i>Voir 3.3.2</i>).</p> <p>Il est nécessaire d'utiliser des écouvillons stériles exempts d'ATP. Un écouvillon témoin (sans prélèvement de surface) est traité comme l'écouvillon essai et permet l'interprétation des résultats.</p>

Si les résultats des échantillons en RLU sont 3 fois supérieurs au résultat du témoin, les surfaces sont considérées comme sales et non conformes.
Cependant, selon la nature et l'utilisation des surfaces, l'entreprise doit établir ses propres critères.

Cette même méthode est appliquée par le système Bioprobe (AES), constitué d'un luminomètre de haute sensibilité qui permet le contrôle de surface directement sur site ou après écouvillonnage.

Contrôle d'une surface par la technique d'impression sur gélose

<p>Prélèvement</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ouvrir la boîte, appliquer la surface du milieu gélosé avec précaution sur la surface à étudier. - Maintenir une pression constante et régulière sur le ménisque en contact avec la surface à étudier (dans les essais d'Hartemann, poids de 200 g pendant 20 secondes). - Refermer la boîte et incuber (couvercle en dessous). <p>Il existe, pour la standardisation du prélèvement et quelle que soit l'inclinaison de la surface à tester, un applicateur (applicateur Count Tact de bioMérieux) permettant d'exercer une force d'appui de 500 g pendant une durée de 10 secondes.</p> <p>D'après la norme AFNOR G-07 172, la composition du milieu utilisé permet une croissance optimale des microorganismes de l'environnement et contient quatre agents neutralisants capables d'inactiver des désinfectants résiduels présents sur la surface analysée :</p> <ul style="list-style-type: none"> - lécithine - Tween neutralise les ammoniums quaternaires ; - lécithine - Tween - histidine neutralise les aldéhydes et les phénols ; - thiosulfate de sodium neutralise les dérivés halogénés.
<p>Lecture et interprétation</p>	<p>Il s'agit de dénombrer les colonies ; ce dénombrement est facilité par le quadrillage de la boîte. Pour l'interprétation <i>Voir 2.2.3.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Lames gélosées Les lames gélosées, fines couches de milieu de culture sur un support en plastique, ont fait leur apparition il y a quelques années et sont proposées à l'heure actuelle par de nombreuses firmes. Elles sont en général utilisées directement, par contact entre le milieu gélosé et la surface à contrôler (Hycon chez Biotest, Hygicult chez Transia, Hycheck chez Osi Bio...) ou plus rarement indirectement après écouvillonnage (Swab Test chez Millipore). • Petrifilm Il est utilisé par impression directe après réhydratation par 1 mL de milieu lécithine-Tween. La surface ainsi réhydratée est de 20 cm². Le temps de contact avec la surface à contrôler est de 15 secondes. L'incubation se fait pendant 24 à 72 h, à 30-32 °C.

Mise en évidence de microorganismes présents sur les cheveux, sur les poils de barbe ou de moustache, à la surface de la peau ou sur les mains

<p>Mise en évidence de la microflore portée par les cheveux et les poils</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Prélever un cheveu ou un poil et l'étaler sur une gélose nutritive coulée en boîte de Petri. - Incuber pendant 48 heures à 37 °C. <p>Le développement microbien se fait à partir du cheveu ou du poil mis en culture. Il est possible également de secouer des cheveux longs au-dessus d'une boîte de Petri contenant des milieux sélectifs ou non (gélose nutritive, Chapman, bile-esculine-azide...).</p>
<p>Mise en évidence de la microflore de la peau</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Humidifier un écouvillon stérile dans une solution d'eau physiologique stérile. - À l'aide de l'écouvillon, prélever en frottant sur 6 cm² de peau (côté du nez, pli du coude...). - Étaler sur une gélose au sang et incuber pendant 48 heures à 37 °C. - Réaliser la même expérience après avoir vigoureusement désinfecté l'emplacement du prélèvement avec un tampon d'alcool à 95 °.
<p>Contrôle microbien des mains</p>	<p>Il suffit de faire une empreinte des doigts sur un milieu gélosé coulé en boîte de Petri, sélectif ou non (gélose nutritive, gélose Chapman).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Incuber pendant 48 heures à 37 °C. <p>Il est également possible de tirer stérilement, avec des pinces, un fragment de 5 cm de ruban adhésif (la face interne est stérile), et de l'appliquer sur la base du pouce ; bien appuyer.</p> <p>La face ayant eu contact avec la peau sera déposée sur des milieux sélectifs ou non (gélose nutritive, Chapman, bile-esculine-azide, RBL...)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enlever stérilement le ruban adhésif de la boîte et observer après 48 heures à 37 °C.

Contrôle de l'hygiène des mains

<p>Après un lavage simple</p>	<p>Le lavage est réalisé avec une seule dose de savon (ce n'est pas parce que le produit mousse qu'il est plus efficace), et au minimum pendant 30 secondes.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Rincer et essuyer soigneusement les mains par tamponnement de deux feuilles de papier à usage unique. - Appliquer les doigts sur une gélose nutritive. - Incuber pendant 48 heures à 37 °C.
<p>Après un lavage antiseptique</p>	<p>Le lavage est réalisé selon le même protocole que précédemment, mais avec un savon antiseptique et pendant une durée de 1 minute.</p>
<p>Après un lavage préchirurgical</p>	<p>À l'aide d'une brosse désinfectée et de savon antiseptique, effectuer un brossage préchirurgical en procédant comme suit.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Curer les ongles sous l'eau courante, brosser toutes les portions des mains. - Maintenir toujours les mains plus hautes que les bras pour éviter que l'eau de lavage contaminée ne redescende. - Assécher soigneusement les mains à l'aide d'une serviette stérilisée. - Poser les doigts sur une gélose nutritive. - Incuber pendant 48 heures à 37 °C.

ANNEXE 1

Critères microbiologiques fixés par la réglementation française

Tableau 1 : Viandes de boucherie

Tableau 2 : Produits transformés

Tableau 3 : Viandes de volailles

Tableau 4 : Foie gras, abats et autres préparation de volailles

Tableau 5 : Viandes hachées et préparations de viandes

Tableau 6 : Produits de la mer et d'eau douce

Tableau 7 : Ovoproduits – Pâtisseries à la crème

Tableau 8 : Semi-conserves

Tableau 9 : Matières grasses d'origine animale

Tableau 10 : Laits et produits à base de lait

Tableau 11 : Produits végétaux

Tableau 12 : Préparations de végétaux

Tableau 13 : Aliments divers

Tableau 14 : Eaux utilisées dans les industries alimentaires

Document 1 : Critères sanitaires des coquillages vivants

Document 2 : Aliments en conserves

Désignation	Microorganismes aérobies 30 °C/g	Coliformes fécaux/g	<i>Staphylococcus aureus</i> /g	Anaérobies sulfitoréducteurs 46 °C/g	<i>Salmonella</i> 25 g
Carcasses ou coupes de demi-gros, réfrigérées ou congelées ⁽¹⁾	5.10 ² ⁽³⁾	–	–	2	Absence
Pièces conditionnées sous vide ou non, réfrigérées ou congelées ⁽¹⁾	5.10 ⁴ ⁽³⁾	10 ²	–	2	Absence
Portions unitaires conditionnées réfrigérées ou congelées et portions unitaires du commerce de détail réfrigérées ou congelées ⁽²⁾	–	3.10 ²	10 ²	10	Absence

(1) Le prélèvement est effectué en profondeur, après cautérisation de la surface.

(2) Le prélèvement concerne profondeur plus surface sans cautérisation.

(3) Seules les tolérances de caractère analytique sont acceptées (plan à deux classes).

Tableau 1 – Viandes de boucherie (arrêté du 21 décembre 1979 art. paru au JO du 19 janvier 1980)
(d'après Lamy Dehove – © Lamy SA – mai 1999)

Désignation	Microorganismes organismes aérobies 30 °C/g	Coliformes 30 °C/g	Coliformes fécaux/g	<i>Staphylococcus aureus</i> /g	Anaérobies sulfito- réducteurs 46 °C/g	<i>Salmonella</i> 25 g
Plats cuisinés à l'avance, escargots préparés, pièces de viandes cuites tranchées ou non	3.10 ⁵ ⁽¹⁾	10 ³	10	10 ²	30	Absence
Produits de charcuterie crus, hachés, soumis à dessiccation et à consommer en l'état	–	–	10 ²	5.10 ²	50	Absence
Produits de salaison crus salés et/ou séchés, tranchés ou non	– ⁽²⁾	–	10 ³	5.10 ²	50	Absence
Produits de charcuterie cuits, tranchés ou non, quenelles	3.10 ⁵ ⁽¹⁾⁽²⁾	10 ³	10	10 ²	30	Absence
Jambon cuit entier	10 ⁴	10	Absence	Absence	Absence	Absence
Potages déshydratés	3.10 ⁵	10 ³	10	10 ²	30	Absence

(1) Pour les pâtes farcies du type ravioli, cannelloni, lasagne, les quenelles et les plats cuisinés auxquels est incorporé du fromage, ce critère doit être interprété.

(2) Pour les produits de charcuterie conditionnés sous pellicule plastique et sous vide, le critère relatif aux micro-organismes aérobies 30 °C (3.10⁵) par g ne s'applique qu'au stade de la fabrication (usine).

Les critères microbiologiques des viandes hachées sont désormais fixées par la directive CE n° 94/65 du 14 décembre 1994 transposée par l'arrêté du 29 février 1996 auquel il convient de se référer. La notion de plat cuisiné a largement évolué depuis 1974, en raison, notamment, de la modification des habitudes alimentaires et des procédés technologiques. Les critères prévus ci-dessus pour les plats cuisinés ne peuvent donc être appliqués systématiquement à tous les produits que l'on qualifie aujourd'hui comme tels.

Il convient donc de rappeler la définition des plats cuisinés à l'avance. Dans cette définition, les termes « cuites ou précuites » s'appliquent aux préparations culinaires et non aux denrées servant à leur élaboration. Ainsi les denrées constituées d'un mélange d'in-

grédients crus, blanchis, cuits ou précuits ne doivent pas être assimilées aux plats cuisinés à l'avance. C'est le cas, par exemple, des préparations comme les sandwiches, les assiettes froides, certaines salades, les pizzas ou les quiches lorraines. Les préparations n'ayant fait l'objet que d'un traitement thermique léger afin d'améliorer leur présentation (dorage ou gratinage superficiel ou préfritage) ne peuvent non plus être considérées comme des plats cuisinés à l'avance.

Il ressort de ces faits que l'analyse microbiologique de ce type de préparation ne repose pas sur des critères réglementaires et que les entreprises doivent donc définir des critères internes dans le cadre de la définition de leur autocontrôles fondés sur la méthode du type HACCP.

Tableau 2 – Produits transformés (Arrêté 21 décembre 1979, article 3 modifié par arrêté 29 février 1996)
(d'après Lamy Dehove – © Lamy SA – mai 1999)

Désignation	Micro-organismes aérobies 30 °C/g ^(a)	Coliformes 30 °C/g ^(a)	Coliformes fécaux/g ^(a)	<i>Staphylococcus aureus</i> /g ^(a)	Anaérobies sulfito-réducteurs 46 °C/g ^(a)	<i>Salmonella</i> 25 g ^(b)
Volailles entières réfrigérées, congelées ou surgelées	–	–	–	–	–	Absence
Rôtis, escalopes et paupiettes crus, panés ou non	5.10 ⁵	–	10 ³	5.10 ²	30	Absence/g
Rôtis cuits, entiers ou tranchés et paupiettes cuites ou précuites	3.10 ⁵	–	10	10 ²	10	Absence
Viande crue séparée mécaniquement	10 ⁶	–	5.10 ³	10 ³	10 ²	Absence/g
Viande cuite séparée mécaniquement	3.10 ⁵	–	10	10 ²	30	Absence
Viande crue séparée mécaniquement et irradiée ⁽¹⁾	10 ⁴	–	50	10	1	Absence

(a) Plan à 3 classes.

(b) Plan à 2 classes.

(1) Arrêté du 2 mars 1985 (JO du 23 mars) : l'article 2 de cet arrêté stipule en outre : « seules les viandes crues séparées mécaniquement répondant aux critères microbiologiques les rendant propres à la consommation, à l'exception de ceux visant les salmonelles, pourront être traitées par rayonnements ionisants conformément aux dispositions réglementaires en vigueur ».

Tableau 3 – Viandes de volailles (Arrêté 21 décembre 1979, article 3 modifié par arrêté 29 février 1996)

(d'après Lamy Dehove – © Lamy SA – mai 1999)

Désignation	Microorganismes aérobies 30 °C/g	Coliformes fécaux/g	<i>Staphylococcus aureus</i> /g	Anaérobies sulfito-réducteurs/g	<i>Salmonella</i>
Foie gras cru de canard ou d'oie, nu, ou conditionné sous vide ou non	5.10 ⁴	5.10 ²	10 ²	10	Absence/25 g
Pièces de découpe crues de viandes de volailles conditionnées ou non ⁽¹⁾	5.10 ⁵	10 ³	10 ²	30	Absence/g
Abats crus de volailles autres que le foie gras conditionnés ou non	5.10 ⁶	10 ³	5.10 ²	30	Absence/g
Pièces de découpe de volailles fumées, salées, conditionnées sous vide ou non, à consommer en l'état ⁽²⁾	10 ⁶	10	10 ²	10	Absence/25 g

(1) Ces critères concernent la viande de surface (peau si la pièce de découpe en comporte) et en profondeur (muscles).

(2) Ces critères concernent la viande de surface (peau si la pièce de découpe en comporte) et en profondeur (muscles). De plus, pour ces produits, aw inférieure à 0,90.

Tableau 4 – Foie gras, abats et autres préparation de volailles

(d'après Lamy Dehove – © Lamy SA – mai 1999)

Pour que des viandes hachées ou des préparations de viandes puissent être reconnues propres à la consommation humaine, conformément à l'article 3 du décret n° 71-636 du 21 juillet 1971, elles doivent répondre aux critères microbiologiques suivants :

1. Viande hachée et préparations de viandes hachées

	M (a)	m (b)
Germes aérobies mésophiles n (c) = 5 ; c (d) = 2	5 x 10 ⁵ /g	5 x 10 ⁵ /g
<i>Escherichia coli</i> n = 5 ; c = 2	5 x 10 ³ /g	50/g
<i>Staphylococcus aureus</i> n = 5 ; c = 2	10 ³ /g	10 ² /g
<i>Salmonella</i> n = 5 ; c = 0	Absence dans 10 g	

(a) M = Seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, M étant égal à 10 m lors d'un dénombrement effectué en milieu solide et à 30 m lors d'un dénombrement effectué en milieu liquide.

(b) m = Seuil limite en dessous duquel tous les résultats sont considérés satisfaisants.

(c) n = Nombre d'unités composant l'échantillon.

(d) c = Nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre m et M.

Tableau 5 – Viandes hachées et des préparations de viandes – JO du 29 août 1996

2. Autres préparations de viandes

	M (a)	m (b)
<i>Escherichia coli</i> n (c) = 5 ; c (d) = 2	5 x 10 ³ /g	5 x 10 ³ /g
<i>Staphylococcus aureus</i> n = 5 ; c = 2	5 x 10 ³ /g	5 x 10 ² /g
<i>Salmonella</i> n = 5 ; c = 0	Absence dans 1 g	

(a) M = Seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, M étant égal à 10 m lors d'un dénombrement effectué en milieu solide et à 30 m lors d'un dénombrement effectué en milieu liquide.
(b) m = seuil limite en dessous duquel tous les résultats sont considérés satisfaisants.
(c) n = Nombre d'unités composant l'échantillon.
(d) c = Nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre m et M.

Tableau 5 – Viandes hachées et des préparations de viandes – JO du 29 août 1996

Désignation	Micro-organismes aérobie 30 °C/g	Coliformes 30 °C/g	Coliformes fécaux/g	<i>Staphylococcus aureus</i> /g	Anaérobies sulfito-réducteurs 46 °C/g	<i>Salmonella</i> 25 g
Crustacés entiers cuits réfrigérés autres que crevettes	10 ⁵	1	–	–	2	Absence
Tous crustacés, y compris crevettes entières cuites ou crues, congelés ou surgelés	10 ³	1	–	–	2	Absence
Crevettes cuites décortiquées, réfrigérées et décortiquées congelées ou surgelées	10 ⁵	10	–	10 ²	10	Absence
Escargots décoquillés surgelés ou congelés	–	–	–	–	10 ³	Absence
Cuisses de grenouilles fraîches, congelées ou surgelées ⁽¹⁾	5.10 ⁵	–	10 ²	10 ²	–	Absence
Poissons tranchés, panés ou non, filets de poisson frais, réfrigérés	5.10 ⁴	–	10	10 ²	2	Absence
Poissons tranchés, panés ou non, filets de poisson congelés ou surgelés	5.10 ⁴	–	10	10 ²	2	Absence
Préparations à base de chair de poisson, hachées, crues	5.10 ⁵	–	10 ²	10 ²	10	Absence
Coquilles Saint-Jacques et moules précuites	10 ⁶	–	10	10 ²	30	Absence

(1) Ces critères s'appliquent aussi aux cuisses de grenouilles congelées ou surgelées traitées par rayonnements ionisants.

Tableau 6 – Produits de la mer et d'eau douce

(Arrêté 21 décembre 1979, article 5 modifié par arrêté du 2 juin 1988, article 13 mars 1989 et arrêté 2 juillet 1996)

(d'après Lamy Dehove – © Lamy SA – mai 1999)

Le nombre le plus probable (N.P.P) de bactéries fécales présentes dans 100 g de chair de coquillage et de liquide intervalvaire ne doit pas excéder 300 coliformes fécaux ou 230 *Escherichia coli*, estimé sur la base d'un test à 5 tubes et 3 dilutions, ou de tout autre procédé bactériologique dont l'équivalence en niveau de précision est démontrée.

Les coquillages ne contiennent pas de salmonelles dans 25 g de chair.

En l'absence de technique de routine pour la recherche de virus et de la fixation de normes virologiques, le contrôle sanitaire se fonde sur des dénombrements de bactéries fécales.

Document 1 – Critères sanitaires des coquillages vivants destinés à la consommation humaine immédiate

Désignation	Microorganismes aérobie 30 °C/g	Coliformes 30 °C/g	Coliformes fécaux/g	<i>Staphylococcus aureus</i> /g	Anaérobies sulfito-réducteurs 46 °C/g	<i>Salmonella</i> 25 g
Ovoproduits pasteurisés	10 ⁵	–	10	Absence (Entérobactéries)	–	Absence
Blancs d'œufs non pasteurisés	–	–	–	–	–	Absence
Pâtisseries et crèmes pâtisseries	3.10 ⁵	10 ³	1	10 ²	10	Absence

Observations : Les critères fixés au niveau national se rapprochent de ceux fixés par les dispositions communautaires. L'arrêté du 11 mars 1998 fait bien référence à la directive CEE n° 89/437 du 20 juin 1989.

Cependant les critères nationaux sont plus sévères pour les aérobie (10 000 au lieu de 100 000) et les entérobactéries (10 au lieu de 100).

	Microorganismes aérobie à 30 °C par gramme ou par mL	Entérobactéries par gramme ou par mL	<i>Staphylococcus aureus</i> par gramme ou par mL	<i>Salmonella</i> dans 25 grammes ou 25 mL
Ovoproduits traités thermiquement	10 ⁴	10	Absence	Absence

Tableaux 7 – Ovoproduits - Pâtisseries à la crème (Arr. 21 décembre 1979, art. 6 modifié par Arr. 11 mars 1998)

(d'après Lamy Dehove – © Lamy SA – mai 2000)

Désignation	Microorganismes aérobies 30 °C/g	Coliformes /g	<i>Staphylococcus aureus</i> /g	Anaérobies sulfito-réducteurs 46 °C/g	<i>Salmonella</i> 25 g
Pasteurisées ⁽¹⁾	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Non pasteurisées ⁽¹⁾ – rollmops, harengs saurs, anchois au sel ou à l'huile ⁽²⁾ – saumon fumé, haddock et autres poissons légèrement salés et fumés ⁽³⁾	10 ⁵ 10 ⁶ ⁽³⁾	Absence Absence	Absence 1	Absence ⁽²⁾ Absence	Absence Absence

(1) Revivification de la suspension mère pendant 2 h à la température du laboratoire pour les semi-conserves et pendant 30 min à 45 min pour les semi-conserves non pasteurisées.

(2) Cas particulier des anchois en saumure : anaérobies sulf. réducteurs 46 °C : moins de 10/g.

(3) Dénombrement en milieu à l'eau de mer ou à défaut à l'eau de salinité 3,5 % et à une température d'incubation de 20 °C pendant 5 jours.

Les critères microbiologiques suivants peuvent être actuellement admis pour les présentations du saumon fumé et les poissons légèrement salés et fumés :
– *Staphylococcus aureus* (par gramme) : 5 ⁽¹⁾ ;
– Anaérobies sulfitoréducteurs 46 °C (par gramme) : 1 ⁽¹⁾ ;
– micro-organismes aérobies 30 °C (par gramme) : 10⁶ ⁽¹⁾ ;
– coliformes fécaux (par gramme) : 1 ;
– *Salmonella* dans 25 grammes : absence.

(1) Seules les tolérances d'origine analytique sont acceptées (BID 1990, n° 6, p. 63, n° 90-154).

La tolérance accordée aux anchois en saumure, moins de 10 g pour les anaérobies sulfitoréducteurs 46 °C au lieu de absence de germes, peut-être étendue à l'ensemble des semi-conserves définies préparées à base d'anchois salés (BID 1986, n° 10, p. 8, n° 86-379).

Tableau 8 – Semi-conserves (Arrêté 21 décembre 1979, article 9)
(d'après Lamy Debove – © Lamy SA – mai 1999)

Désignation	Micro-organismes aérobies 30 °C/g ^(c)	Coliformes 30 °C/g ^(c)	Coliformes fécaux/g ^(c)	<i>Staphylococcus aureus</i> /g ^(c)	Anaérobies sulfito- réducteurs 46 °C/g ^(a)	<i>Salmonella</i> 25 g ^(d)
Non fondues (toutes espèces) ⁽¹⁾	10 ⁴	102 ^(c)	10	10 ² ^(c)	10 ^(c)	Absence
Fondues alimentaires ⁽¹⁾	5-10 ²	Absence ^(d)	–	Absence ^(d)	Absence ^(d)	Absence
Huiles de beurre, matières grasses de lait anhydre ⁽¹⁾	5-10 ²	Absence ^(d)	–	Absence ^(d)	–	–
Beurre cru ^{(2) (a)} (Phosphatase positive)	–	–	–	10 ² ^(c)	–	Absence
Beurres ^{(2) (b)} (Phosphatase positive)	10 ³ ^(e)	10 (provisoire)	–	10 ^(f)	–	Absence ^(f)
Corps gras à base de matière grasse butyrique ^{(2) (b)} (Phosphatase négative)	–	10	–	10 ^(f)	–	Absence ^(f)
Beurre concentré ⁽²⁾ (Phosphatase négative)	5-10 ²	Absence ^(d)	–	Absence ^(d)	–	–

(a) Beurre obtenu à partir de crèmes n'ayant pas subi de traitement thermique.

(b) Produits obtenus à partir de composants ayant subi un traitement thermique au moins équivalent à la pasteurisation.

(c) Plan à 3 classes.

(d) Plan à 2 classes.

(e) Autres que les espèces lactiques.

(f) Dans l'éventualité où des résultats seraient considérés comme non satisfaisants pour l'un des critères suivants : phosphatase, coliformes ou micro-organismes aérobies autres que les lactiques, il convient de procéder au contrôle de ces critères sur des échantillons complémentaires.

(1) Arrêté du 21 décembre 1979 (JO du 19 janvier 1980).

(2) Arrêté du 15 avril 1986 (JO du 30 avril 1986).

Tableau 9 – Matières grasses d'origine animale, y compris butyriques
(d'après Lamy Debove – © Lamy SA – mai 1999)

Arrêté du 20 décembre 2000 modifiant l'arrêté du 21 décembre 1979 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale

Annexe

Les produits visés au présent article doivent être exempts de microorganismes ou toxines à des niveaux dangereux pour la santé publique. En outre, les critères microbiologiques et biochimiques applicables aux laits de consommation ou aux produits laitiers non revêtus d'une estampille de salubrité communautaire, d'une part, et, d'autre part, aux laits de consommation ou aux produits laitiers revêtus d'une marque de salubrité communautaire jusqu'à leur date limite de consommation (DLC) sont les suivants :

Désignation	Microorganismes aérobie à 30 °C (par gramme)	Coliformes à 30 °C (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)	<i>Escherichia coli</i> (par g.) (1) <i>Escherichia coli</i> (par g.) (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (par gramme)	<i>Salmonella</i> dans 25 grammes	Phosphatase	Acidité exprimée en acide lactique (%e) dans la partie non grasse
Lait pasteurisé conditionné jusqu'à J + 4	30 000	10	Absence dans 1 mL		10	Absence dans 250 mL	Négative	
Lait pasteurisé conditionné à la date de péremption (2)		10 ²	Absence dans 1 mL		10	Absence dans 250 mL	Négative	Entre 1,4 et 1,8
Produits liquides à base de laits non traités thermiquement		10	1			Absence		
Produits liquides à base de laits traités thermiquement et fermentés, laits fermentés (notamment yaourts, kéfir)	10 ³	10	1			Absence		
Laits gélifiés et laits emprésurés aromatisés		10	1			Absence		
Beurre cru					10 ²	Absence	Positive	
Beurre pasteurisé, corps gras à base de matière grasse butyrique, beurre concentré		10			10	Absence	Négative	
Crème crue				10 ⁴ (3)	10 ²	Absence	Positive	
Crème pasteurisée	30 000 (4)	10		10 ³ (3)	10	Absence	Négative	> 4 (5) ≤ 2,5 (4)
Fromages non affinés aux laits traités thermiquement		10	1		10	Absence		
Caséines et caséinates (6)	30 000 et flore thermophile 5 x 10 ³	Absence dans 0,1 g						
Glaces et crèmes glacées	3 x 10 ⁵	10 ²	1		10	Absence		

(1) Dénombrement selon la norme expérimentale de l'AFNOR V 08-053 « Microbiologie alimentaire-Dénombrement des *Escherichia coli* β-glucuronidase positive par comptage des colonies à 44 °C – Méthode de routine ».

(2) Doit être stable à l'ébullition.

(3) Le dépassement de ces normes doit entraîner dans tous les cas une révision de la mise en œuvre des méthodes de surveillance et de contrôle des points critiques appliquées dans l'établissement de transformation. Le directeur des services vétérinaires est informé des procédures correctives introduites dans le système de surveillance de la production pour empêcher la répétition de tels dépassements.

(4) Ne s'applique pas aux crèmes mûrées.

(5) S'applique uniquement aux crèmes mûrées.

(6) Journal officiel des Communautés européennes du 11 octobre 1990, règlement (CEE) n° 2921/90.

Tableau 10 – Critères microbiologiques concernant les laits et produits à base de lait (suite et fin)

Désignation	Micro-organismes aérobies 30 °C/g ^(a)	Coliformes 30 °C/g ^(a)	Coliformes fécaux/g ^(a)	<i>Staphylococcus aureus</i> /g ^(a)	Anaérobies sulfito-réducteurs 46 °C/g ^(a)	<i>Salmonella</i> 25 g ^(b)
Légumes						
– surgelés (1) (levures : 1 000, moisissures : 500)	5.10 ⁵	10 ³	15	10	10 (1 <i>Clostridium perfringens</i>)	Absence
– surgelés ayant subi une manipulation ⁽¹⁾ (levures : 2 000, moisissures : 1 500)	15.10 ⁵	3.10 ³	15	10 ²	10 (1 <i>Clostridium perfringens</i>)	Absence
Légumes déshydratés ou lyophilisés⁽²⁾	10 ⁵	–	3	–	10	Absence
Flocons de pommes de terre déshydratées pour purées⁽³⁾	3.10 ⁴ (levures et moisissures : 10 ²)	–	3	10	10	Absence
Algues destinées à la consommation humaine⁽⁴⁾	10 ⁵	–	10	10 ²	10 ² (1 <i>Clostridium perfringens</i>)	Absence
Plantes médicinales⁽⁵⁾	10 ⁶ (b) (levures et moisissures : 10 ⁵)	–	–	–	–	–

(a) Plan à 3 classes (cf. Option Qualité, n° 67).

(b) Plan à 2 classes (cf. Option Qualité, n° 67).

(1) Décision n° F4-78 du GPEM/DA approuvée le 14 novembre 1978 (BOCC du 21 décembre 1978).

(2) Spécification technique n° F5-86 du GPEM/DA approuvée le 28 janvier 1986 (BOCCRF du 25 juillet 1986).

(3) Spécification technique n° F6-88 du GPEM/DA approuvée le 30 juin 1988 (BOCCRF du 3 mars 1989).

(4) Avis du CSHPF, séance du 30 septembre 1986 (BID décembre 1987).

(5) Arrêté du 10 mars 1988 (JO du 24 avril 1988) – additif n° 7 à la *Pharmacopée française*. Ces critères s'appliquent aussi en tant que recommandations aux plantes aromatiques et aux plantes à infusion qui sont des aliments.

Tableau 11 – Produits végétaux
(d'après Lamy Dehove – © Lamy SA – mai 1999)

	n	c	m	M
Produits végétaux crus, frais, ayant fait l'objet d'un épluchage, coupage ou de toute autre opération touchant à leur intégrité, prêts à la consommation humaine				
<i>Salmonella</i> dans 25 grammes	5	0	Absence	Absence
Graines germées				
<i>Bacillus cereus</i> par gramme	5	2	10 ³	10 ⁴
<i>Salmonella</i> dans 25 grammes	5	0	Absence	Absence
Produits végétaux crus ensaucés				
<i>Staphylococcus aureus</i> par gramme	5	2	10 ²	10 ³
<i>Salmonella</i> dans 25 grammes	5	0	Absence	Absence
Préparations de végétaux crus comportant de la semoule et/ou des produits végétaux cuits				
<i>Staphylococcus aureus</i> par gramme	5	2	10 ²	10 ³
<i>Clostridium perfringens</i> par gramme	5	2	10 ²	10 ³
<i>Bacillus cereus</i> par gramme	5	2	10 ³	10 ⁴
<i>Salmonella</i> dans 25 grammes	5	0	Absence	Absence
Pour tous les produits mentionnés				
<i>Escherichia coli</i> par gramme ou par mL	5	2	10 ²	10 ³

Tableau 12 – Préparations de végétaux (Arrêté du 28 mai 1997)

Désignation	Micro-organismes aérobies 30 °C/g ^(a)	Coliformes 30 °C/g ^(a)	Coliformes fécaux/g ^(a)	<i>Staphylococcus aureus</i> /g ^(a)	Anaérobies sulfito-réducteurs 46 °C/g ^(a)	<i>Salmonella</i> 25 g ^(b)
Gélatine pour usage alimentaire ⁽³⁾						
– catégorie 1	10 ⁴ ^(b)	–	1 ^(b) (<i>Escherichiae</i>)	–	1 ^(b)	–
– catégorie 2	10 ⁴ ^(b)	–	10 ^(b) (<i>Escherichiae</i>)	–	1 ^(b)	–
– catégorie 3	10 ⁴ ^(b)	–	10 ² ^(b) (<i>Escherichiae</i>)	–	10 ^(b)	–
– catégorie 4	10 ⁴ ^(b)	–	10 ² ^(b) (<i>Escherichiae</i>)	–	10 ^(b)	–
Gluten de blé partiellement hydrolysé ⁽⁴⁾	10 ⁴ ^(b) (levures et moisissures : 10 ⁻²) ^(b)	–	Absence (<i>E. coli</i>)	–	–	Absence
Lactosérum hydrolysé ⁽⁵⁾	–	30 ^(b)	–	–	–	Absence
Préparations enzymatiques ⁽⁶⁾	–	30 ^(a)	–	Absence	30 ^(a)	Absence
Sang des animaux de boucherie à usage alimentaire ⁽⁷⁾						
– à la saignée	10 ⁵ ^(a)	–	10 ² ^(a)	–	–	Absence
– sang ou produits de sang ayant subi des manipulations	10 ⁶ ^(a)	–	10 ³ ^(a) (<i>E. coli</i>)	10 ² ^(a)	30 ^(a) (spores)	Absence
Sorbets, glaces à..., glaces au sirop ⁽²⁾	3.10 ⁵ ^(a)	102 ^(a)	1 ^(a)	10 ^(a)	–	Absence
Margarine ⁽⁸⁾	–	25 ^(b)	–	–	–	–

Tableau 13 – Aliments divers

(a) Plan à 3 classes.

(b) Plan à 2 classes.

(1) Arrêté du 21 décembre 1979 (JO du 19 janvier 1980).

(2) Arrêté du 13 septembre 1967 (JO du 17 octobre 1967).

(3) Arrêté du 8 mai 1964 (JO du 28 mai 1964).

(4) Arrêté du 19 juillet 1985 (JO du 6 août 1985).

(5) Arrêté du 16 janvier 1980 (JO du 16 février 1980), absence de *Pseudomonas aeruginosa* dans 1 g.

(6) Arrêté du 5 septembre 1989 (JO du 1er octobre 1989) aucune activité antibiotique.

(7) Arrêté du 10 février 1984 (JO du 25 mars 1984) M = 5 m ; tolérance analytique pour la valeur M = 1,5 m.

(8) Décision n° E 3-79 du GP/EM/DA approuvée le 17 octobre 1979 (BOCC - BOSP 1er décembre 1979).

Conserves à base de denrées animales ou d'origine animale (arrêté du 21 décembre 1979 paru au JO du 19 janvier 1980 et directive CEE n°77/99 du 21 décembre 1976 modifiée par les directives CEE n° 88/658 du 14 décembre 1988 parues au JOCE du 31 décembre 1988 et du 10 février 1992).

Les conserves à base de denrées animales ou d'origine animale, quelle que soit la nature de leur emballage, doivent satisfaire à des épreuves permettant de vérifier leur stabilité.

Ne doivent pas être soumis à ce contrôle les boîtes métalliques ou les bocaux en verre à couvercles déformables présentant des défauts majeurs, tels que bombement, flocage ou fuitage. Il en va de même pour les conserves présentées en emballages en matière plastique ou complexes métalloplastiques qui présenteraient une modification apparente de l'emballage.

Les épreuves comportent les opérations suivantes :

- étuvage d'individus à 37 °C (± 1 °C) durant sept jours ou à 35 °C (± 1 °C) durant dix jours ;
- étuvage d'individus à 55 °C (± 2 °C) durant sept jours.

À l'issue de ces épreuves, aucun bombement ou fuitage ne doit être constaté ;

- une appréciation de la variation du pH entre les unités étuvées et des unités non étuvées témoins, laissées à la température du laboratoire pendant les durées précitées, cette température devant être cependant inférieure à 25 °C. La variation de pH ne doit pas dépasser 0,5 unité ;

– une appréciation de la variation de la flore microbienne entre unités étuvées et non étuvées.

Soit n le nombre de micro-organismes dénombrés sur 20 champs microscopiques observés sur une boîte incubée, et n' le nombre de micro-organismes dénombrés sur une boîte non incubée ; le rapport n/n' doit être inférieur à 100.

Nota : Ce rapport apparemment élevé n'a pas pour but de tolérer une multiplication même modérée des micro-organismes. Il n'est établi à cette valeur qu'en raison de l'inconstance de la reproductibilité de l'examen bactérioscopique.

En cas de doute, et notamment lors du contrôle de certains produits de la pêche, un examen bactériologique conduit avec toute la rigueur technique requise est effectué.

En cas de litige, il peut être fait application des normes AFNOR V 08-401 et V 08-402 relatives au contrôle de la stabilité des conserves.

Conserves à base de denrées végétales ou d'origine végétale (arrêté du 28 mai 1997 paru au JO du 19 juin 1997).

Pour répondre au contrôle de la stabilité, la conserve doit satisfaire à une épreuve d'incubation à 32 °C pendant 21 jours et 55 °C pendant 7 jours, vérifiée selon les modalités définies par l'arrêté du 26 septembre 1985 pour les conserves d'un pH ≥ 4,5 (soit norme AFNOR NF V 08-401) ou à toute autre épreuve d'incubation d'efficacité au moins équivalente ; elle doit satisfaire à une épreuve d'incubation à 32 °C pendant 21 jours si le pH est ≤ 4,5.

Désignation	Coliformes	Coliformes thermo tolérants	Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices	Streptocoques fécaux
eaux destinées à la consommation humaine	absence dans 100 mL (95 % des échantillons)	absence dans 100 mL	moins d'une spore dans 20 mL	absence dans 100 mL

L'eau ne doit pas contenir d'organismes pathogènes, en particulier.

Désignation	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i> (5 L)	Bactériophages fécaux (50 mL)
eaux destinées à la consommation humaine	absence dans 100 mL	absence dans 5 L d'eau prélevée	absence dans 50 mL

Tableau 14 – Eaux utilisées dans les industries alimentaires

L'analyse doit être effectuée dans les 12 heures qui suivent le prélèvement.

ANNEXE 2

Références des méthodes normalisées ou officielles existant pour les analyses proposées

Étapes préparatoires	Type d'analyse	Méthodes horizontales		Méthodes sectorielles						
		de référence	de routine	Aliments des animaux	Beurre	Conserves	Coquillages Produits de la pêche	Épices et aromates	Gélatines alimentaires	Glaces et crèmes glacées
Échantillonnage Préparation de l'échantillon pour essai		V08-001 Juin 84 NF ISO 7218 Mai 96 (V08-002)			MO 25 Nov.86 NS 8163	NF V08-403 Avr 80	MO 28 Avr. 88 circ. 8003		MO 30 Aout 68	
Préparation des dilutions		NF V08-010 Mars 96			MO 25 Nov. 86 NS 8163					
Catégorie de microorganismes										
Aérobies mésophiles	D	NF ISO 4833 Jul. 91 (V08-011)	V08-051 Dec. 92	NF V08-201 Juil. 78	MO Nov. 86 FIL 153 91				NF V59-101 Oct. 82	MO 30 Aout 68
Anaérobies sulfitoréducteurs à 46°C	D	MO Arrêté 21 Dec.79								
Anaérobies sulfito- réducteurs (spores)	D								NF V59-106 Oct. 82	
<i>Bacillus cereus</i>	D	NF ISO7932 Jan. 94 (V08-023)	V08-058 Nov. 95							
<i>Bacillus thermophiles</i>	R					NF V08-404 Avr. 86 V08-407 Oct. 89				
<i>Bacillus thermophiles</i> (spores thermorésistantes)	D									
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	D									
<i>Campylobacter</i> thermotolérants	R	NF ISO 10272 Jan. 96 (V08-026)								
<i>Clostridium perfringens</i>	D	NF V08-019 Dec. 85	V08-056 Avr. 94						NF V59-107 Mars 84	
<i>Clostridium thermophiles</i>	R					NF V08-405 Dec. 86 V08-407 Oct. 89				
<i>Clostridium thermophiles</i> (spores)	D									
Coliformes	D	NF ISO 4832 Jul. 91 (V08-015) NF ISO 4831 (V08-016) Juil. 91	V08-050 Dec. 92		MO 25 Nov. 86 NS 8163				NF V59-102 Oct. 82	MO 30 Aout 68
Coliformes thermotolérants	D	NF V08-017 Juin 80	V08-060 XP Mars 96		MO 28 Avril 88 circ. 8003	V45-110 Juin 81		NF V59-103 Oct. 82		
<i>Enterobacteriaceae</i>	D	ISO 7402 Dec. 93 (V08-021)	V08-054 Oct. 93							
	R	NF ISO 8523 Fev. 92 (V08-025)								
<i>Escherichia coli</i>	D	NF V08-017 Juin. 80	V08-053 Dec. 93							
<i>Escherichia coli</i> présumé	D	NF ISO 7251 Sept. 94 (V08-020)								MO 30 Aout 68
Levures	D	NF ISO 7954 Aout 88 (V08-022)	V08-059 Nov. 95				NF V03-454 Dec. 81			
<i>Listeria monocytogenes</i>	R	Note.Service. 10 Fev. 88	V08-055 1993							
Moisissures	D	NF ISO 7954 Aou 88 (V08-022)	V08-059 Nov 95	NF V18 301 Mars83				NF V03-454 Dec. 81		
<i>Salmonella</i>	R	NF ISO 6579 Dec. 93 (V08-013)	V08-052 Sept93		MO 25 Nov. 86 NS 8163		MO 28 Avril 88 circ. 8003		NF V59-104 Oct. 82	MO 30 Aout 68
<i>Staphylococcus aureus</i>	RD	NF V08-014 Jan. 84 MO Arrêté 21 Dec 79	V08-057 Nov. 94		MO 25 Nov. 86 NS 8163				NF V59-105 Oct. 82	MO 30 Aout 68
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	R	NF ISO 8914 Mai 91(V08-024)					V45-111 Jul. 85 MO 28 Avril 88 circ. 8003			
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	ISO 10273 Mai 95 (V08-027)								

Étapes préparatoires	Méthodes sectorielles										
	Type d'analyse	Lait cru et pasteurisé conditionné	Lait de conserve sec et concentré	Lait et produits laitiers	Margarine	Ovoproduits	Céréales	Produits déshydratés	Viandes et produits à base de viande	Volailles	Yaourts
Échantillonnage Préparation de l'échantillon pour essai		MO 3 Jan 85	Nf V04-015 Fev 84	FIL 122 B : 92 NF V04-150 Oct 85	NF V08 501 Sep. 84			NF V08-301 Juin 83	NF V 04-501 Juin 90 circ 25 Nov.77		
Préparation des dilutions		MO 3 Jan 85 FIL 122 B 92		FIL 122 B 92 ISO 8261				NF V08-301 Juin 83	NF V 04-501 Juin 90		
Catégorie de microorganismes											
Aérobies mésophiles	D	MO 3 Jan 85 NF V 04-016 Aou85 NF V 04-017 Aou 91	NF V 04-015 Fev 84	FIL 100B 91 FIL 131 85			NF ISO 7698 Aou 91 (V03-763)	NF V 08-301 Juin 83	NF V04-502 Dec. 92 NF V04-506 Dec 92 MO 25 Nov 77 circ. 171C	MO 25 Nov. 77 circ. 171C	
Anaérobies sulfito-réducteurs à 46 °C	D	MO 21 Dec 79								25 Nov 77 circ. 171C	
Anaérobies sulfito-réducteurs (spores)	D										
<i>Bacillus cereus</i>	D										
<i>Bacillus thermophiles</i>	R										
<i>Bacillus thermophiles</i> (spores thermorésistantes)	D										
Bactéries lactiques	D								NF V04-503 Sept. 88 NF V 04-505 Sept. 89		
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	D										
<i>Campylobacter</i> thermotolérants	R										
<i>Clostridium perfringens</i>	D										
<i>Clostridium thermophiles</i>	R										
<i>Clostridium thermophiles</i> (spores)	D										
Coliformes	D	MO 3 Jan 85	NF V 04-015 Fev 84	ISO 5541-1 FIL 73 A 85				NF V08-301 Juin 83	NF V04-502 Dec 92 NF V04-502 Dec 92 NF V04-502 Dec 92 MO 25 Nov 77 circ. 171C		
Coliformes thermotolérants	D	MO 3 Jan 85	MO 3 Jan 85								
<i>Enterobacteriaceae</i>	D										
<i>Escherichia coli</i>	D										
<i>Escherichia coli</i> présumé	D			FIL 170 1994							
Levures	D		NF V 04-015 Fev 84	FIL 94 B 1991			Nf ISO 7698 (V03-763) Aout 91		NF ISO 13681 (V04-507) Avr. 96		
<i>Listeria monocytogenes</i>	R			FIL 143 A 1995N.S 8026 FIL 41 1966							
Lipolytiques (organismes)	D										
Microorganismes du yaourt	D										M.O 25 Nov 77 FIL 117 A FIL 146
Moisissures	D		NF V04-015 Fev. 84	FIL 94 B 1991			Nf ISO 7698 (V03-763) Aout 91		NF ISO 13681 V04-507 Avril 96 * NF V04-504 Sep88		
<i>Pseudomonas</i>	D										
Psychrotrophes	D	FIL 132 A 1991	FIL 101 A 1991		FIL 101 A 1991						
<i>Salmonella</i>	R	MO 3 Jan 85 ISO 6785 1995 (FIL 93B)	NF V04-015 Fev 84	FIL 93 Bou ISO 6785 1995					MO 25 Nov 77 circ. 171C		
<i>Staphylococcus aureus</i>	D	MO 3 Jan85 FIL 145 1990	NF V04-015 Fev 84 FIL 138 (86)	FIL 83 1978 FIL 60 B				V 08-301 Juin 83		MO 25 Nov 77 circ. 171C	
Streptocoques β hémolytiques	D	Arrêté 6 Août 85									
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	R										
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R										

ANNEXE 3 – Exemples d'application des méthodologies de dénombrement et de recherche présentées au chapitre IV

Catégorie de microorganismes	Type d'analyse**	Méthodologie					
		Méthodes classiques par culture					Méthodes alternatives
		En milieu solide				En milieu liquide	
		En surface			Dans la masse		
Étalement d'une prise d'essai	Pétrifilm	Filtration sur membrane					
Aérobies mésophiles	D	XPT 90-401 (eaux de consommation)	Pétrifilm flore totale validé AFNOR NF V 03-100		M.O. (lait pasteurisé) ou NF ISO 4833 (V 08-011) NF V 08-019 (algues alimentaires)		* DEFT (lait) * ATP métrie (contrôle de stérilité jus de fruits)
Anaérobies sulfitoréducteurs (spores)	D						
<i>Bacillus thermophiles</i> (formes végétatives et spores)	R					*NF V 08-404 (conserves)	
<i>Bacillus thermophiles</i> (spores thermorésistantes)	D					*V 08-407 (conserves)	
Bactéries acétiques	D				(vin)		
Bactéries lactiques	R/D			*(vin)	FIL 117 A		Impédancemétrie (boissons)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	D				NF V 04-505 (viandes)		
<i>Campylobacter</i> thermotolérants	R	* NF ISO 10272					
Caséolytique (flore)	D				(lait)		
<i>Clostridium butyriques</i> (spores)	D				(laits pour fromage à pate cuite) NF V 08-019		
<i>Clostridium perfringens</i> (spores)	D						
<i>Clostridium thermophiles</i> (formes végétatives et spores)	R				NF V 08-405 (conserves)		
<i>Clostridium thermophiles</i> (spores thermorésistantes)	D				V 08-407 (conserves)		
Coliformes	D		*Pétrifilm coliformes (fromages) NF V-03-100	NF T 90-414 (eaux) filtration sur membrane	NF ISO 4832 (V 08-015) ou V 08-050	*NF ISO 4831 (V 08-016) (quenelles fraîches)	Impédancemétrie (produits laitiers - viandes-poissons-légumes)
Coliformes thermotolérants	D	*méthode spirale NF V 08-100 (chair à saucisse)		NF T 90-414 (eaux) filtration sur membrane	NF V 08-060 (eaux de consommation)	T 90-415	Impédancemétrie (produits laitiers - viandes)
<i>Enterobacteriaceae</i> :	R/D	*NF ISO 8523 (V 08-025) (semi-conserves)	Pétrifilm Enterobactériaceae				
<i>Escherichia coli</i>	D	* NF V 08-053 (camembert)	*Pétrifilm <i>E.coli</i> (fromages) NF V 03-100				
Levures et Moisissures	D	*NF V 03-454 (aromates)	Pétrifilm levures-moisissures		NF ISO 7954		Impédancemétrie (produits laitiers - boissons)
<i>Listeria monocytogenes</i>	R	*FIL 143 A NF V 08-055					
Lipolytique (flore)	D	*FIL IDF 41 (beurre lait ou fromage)					
<i>Pseudomonas</i>	D	*NF V 04-504 (viandes)					
Psychrotrophes	D					FIL 101 A(lait)	
<i>Salmonella</i>	R	*NF ISO 6579 (V 08-013)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	D	* FIL 138 et FIL 145 (lait sec)					
Streptocoques fécaux				NF T 90-416 filtration sur membrane(eau)			
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	R	NF ISO 8914V08 024 (coquillages)					

* manipulations décrites

** D : dénombrement

R : recherche

ANNEXE 4

Présentation des étapes des analyses décrites dans les manipulations des chapitres III, IV et VI

Catégorie de microorganismes	Type d'analyse	Référence de la méthode	Méthodologie	Nombre d'étapes de culture	Étape	Milieu	Température	Durée
Aérobies mésophiles	D	Méthode officielle 1985	Dénombrement en masse d'un milieu gélosé	1		Gélose au lait pour dénombrement	30 °C	72 h
Anaérobies sulfitoréducteurs (spores)	D		Dénombrement en profondeur d'un milieu gélosé	1		V.L. Sulfite, citrate de Fer	37 °C	24 à 72 h
<i>Bacillus thermophiles</i> (formes végétatives et spores)	R	NF V08-404 : 1986	Recherche en milieu liquide	2	Recherche en milieu liquide	Bouillon glucosé Milieu de Rosenow Milieu jus de tomate	55 °C	5 jours
<i>Bacillus thermophiles</i> (spores thermorésistantes)	D	V 08-407 : 1989	Dénombrement en milieu liquide NPP	1	Confirmation en milieu solide Sélection thermique 30 minutes à 98 °C et Dénombrement	Milieu glucosé Milieu de Rosenow Milieu jus de tomate Milieu de Rosenow	55 °C 55 °C	18 à 24 heures 8 jours
Bactéries lactiques anaérobies	D	vin	Filtration sur membrane	1		FT 80.	28 °C	5 à 7 jours en jarre
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	D	NF V 04-505 1989	Dénombrement en milieu gélosé	1		Gélose Streptomycine-Thallium-acétate-actidione	22 °C	48 h.
<i>Campylobacter</i> thermotolérants	R	NF ISO 1996 10272 V (08-026)	Recherche avec enrichissement	3	Enrichissement	M. Park. Sanders et Preston	42 °C	10 h micro
					Isolement	M.Skirrow	42 °C	aérophilie 48 h
					Purification-Identification		42 °C	24 h
<i>Clostridium perfringens</i>	D	NF V 08-019	Dénombrement en surface d'un milieu gélosé	1		Gélose tryptose-sulfite-cyclosérine	35-37 °C	20 h.
<i>Clostridium thermophiles</i> (formes végétatives et spores).	R	NF V 08-405 1986	Recherche en milieu liquide et milieu solide en profondeur	2	Enrichissement	Milieu de Rosenow Bouillon glucosé Gélose sulfité au citrate de sodium	55 °C	8 jours
<i>Clostridium thermophiles</i> (spores thermorésistantes)	D	V 08-407 1989	Dénombrement en milieu liquide NPP	1	Confirmation Sélection thermique 30 minutes à 98°C et Dénombrement	Gélose Columbia Milieu de Rosenow	55 °C 55 °C	8 jours 8 jours
<i>Clostridium butyriques</i> (spores)	D	Institut technique du gruyère	Dénombrement en milieu liquide NPP	1	Sélection thermique 15 minutes à 75 °C et Dénombrement.	Milieu de Bryant-Burkey modifié par Bergère	37 °C	7 jours
Coliformes	D	NF ISO 4831 (V08-016) 1991	Dénombrement en milieu liquide NPP	2	Enrichissement	Milieu : tryptone-lauryl-sulfate	30 °C	24 h
Coliformes thermotolérants	D	NF V08-100 1987	Dénombrement en milieu solide (système.spiral)	1	Confirmation	BLBVB Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre : VRBG	30°C 44 °C	24 h 24 h.
<i>Enterobacteriaceae</i> :	R	NF ISO 8523 (V 08-025) 1992	Recherche avec préenrichissement	4	Pré-enrichissement	Eau peptonée tamponnée	37 °C	16-20 heures
					Enrichissement	milieu à la bile et au vert brillant	37 °C	24 h.
					Isolement et identification présumée	Gélose VRBG : rouge neutre, bile, cristal violet	37 °C	24 h.
					Confirmation	Gélose nutritive pour recherche de l'oxydase. Gélose VRBL + indicateur β glucuronidase + TTC	37 °C 44 °C	24 h. 24 h.
<i>Escherichia coli</i>	D	NF V 03-100 méthode rapide validée AFNOR	Dénombrement en surface : Pétrifilm	1				

ANNEXE 4

Présentation des étapes des analyses décrites dans les manipulations des chapitres III, IV et VI

Catégorie de microorganismes	Type d'analyse*	Référence de la méthode	Méthodologie	Nombre d'étapes de culture	Étape	Milieu	Température	Durée
<i>Escherichia coli</i>	D	V 08-053 1993	Dénombrement en surface	1		Milieu gélosé au BCIG	44 °C	18 à 24 h.
Levures	D	NF V 03-454 1981	Dénombrement en surface	1		Gélose glucosée à l'oxytétracycline	20-25 °C	5 jours
<i>Listeria monocytogenes</i>	R	V 08-055 1993	Recherche avec enrichissement	5	Premier enrichissement	Milieu de Fraser au demi	30 °C	18-24 h
					Deuxième enrichissement	Milieu de Fraser	37 °C	24-48 h
					Isolement sélectif	Oxford ou Palcam	37 °C	48 h
					Purification-Identification	TSAYE	37 °C	24 h
Lipolytique (flore)	D	FIL-IDF 41 1966	Dénombrement en surface	1	Mésophile ou psychrotrophe	Base gélosée + 5% de matières grasses + bleu Victoria	30 °C 5 °C	3 à 6 j. 7 à 10 j.
Moisissures	D	NF V 03-454 1981	Dénombrement en surface	1		Gélose glucosée à l'oxytétracycline	20-25 °C	5 jours
<i>Pseudomonas</i>	D	V 04-504 1988	Dénombrement par culture en milieu gélosé.	2	Dénombrement	Gélose cétrimide fusidine, céphalosporine	22 °C	48 h.-72 h.
					Confirmation	Gélose nutritive et milieu de Kligler	22 °C	24 h.
Psychrotrophes	D	FIL 101 A 1991	Dénombrement en profondeur	1		Gélose glucosée au lait écrémé stérile	6,5 °C	10 j.
<i>Salmonella</i>	R	NF ISO 6579 (V 08-013)	Recherche avec préenrichissement et enrichissement	5	Pré-enrichissement	Eau peptonée tamponnée	35-37 °C	16 à 20 h
					Enrichissement	Rappaport ou sélénite	35-42 °C	24 h
					Isolement	Vert Brillant-Rouge de Phénol et Hektoen	37 °C	24 h
					Purification	GTS	37 °C	24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	D	FIL 138 1986	Dénombrement en surface	2	Identification	GTS	37 °C	24 h
					Dénombrement	Baird-Parker	37 °C	24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	NF V 59-105	Recherche avec enrichissement	4	Confirmation	Coagulase	37 °C	4 h
					Enrichissement	Bouillon hypersalé Lactosé	37 °C	24 h
					Isolement	Baird-Parker	37 °C	24 h
					Culture en BCC	BCC	37 °C	24 h
Streptocoques fécaux	D	NFT 90-416	Dénombrement en surface : filtration	2	Identification	Coagulase	37 °C	4 h
					Dénombrement	Gélose de Slanetz et Bartley	37 °C	48 h.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	R	NF ISO 8914 V 08-024 1991	Recherche avec enrichissement	4	Confirmation	Bouillon Litsky G.BEA	37 °C	24 h
					Enrichissement	Eau Pept.salée alc.	37 °C	7 h
					Isolement	TCBS-TSAT	37 °C	18-24 h
					Purification	Gélose nutritive salée	37 °C	
					Identification		37 °C	24 h

* D : dénombrement

R : recherche

LISTE DES SIGLES

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
AFAQ : Association française pour l'Assurance qualité
AFNOR : Association française de Normalisation

B

BNM : Bureau national de Métrologie
BPU : *Bactometer Processing Unit*

C

CAL : Comité agroalimentaire
CBRT : Concentration en bactéries revivifiables totale
CCD : Caméra numérique
CEN : Comité européen de Normalisation
CFA : *Colonisation factor antigen*
CMF : Cytométrie en flux
CNEVA : Centre national d'Études vétérinaires et alimentaires
COBRA : Comptage bactérien rapide
COFRAC : Comité français d'Accréditation
CSF : Cytométrie sur filtre

D

DD : Délai ou temps de détection
DEFT : *Direct epifluorescent filter technic*
DLC : Date limite de consommation
DMC : *Direct microscopic Count*
DO : absorbance
D_T : temps de réduction décimale

E

EAF : *EPEC adherence factor*
EAL : *European accreditation Laboratories*
EGF : *Epithelial growth factor*
EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique
EIEC : *Escherichia coli* entéro-invasif
EPEC : *Escherichia coli* entéro-pathogène
ETEC : *Escherichia coli* entérotoxique

F

FIL : Fédération internationale de Laiterie
F_T^Z : valeur stérilisatrice

H

HACCP : *Hazard Analysis critical control points* : analyse des risques pour la maîtrise des points critiques

I

IFREMER : Institut français de recherche pour l'Exploitation de la mer

L

LPS : Lipopolysaccharide

N

NE : Nombre estimé
NF : Norme française
NPP : Nombre le plus probable
NQA : Niveau de qualité acceptable
NQL : Niveau de qualité limite

P

PCA : *Plate count agar* ou Amplification en chaîne par polymérase
PCR : *Polymerase chain reaction*
PE : Précision d'estimation
PNC : Particules donnant naissance à des colonies

R

RLU : Unités relatives de lumière
RNE : Réseau national d'essais

S

SD : Seuil de détection
SDHA : Sous-direction de l'Hygiène alimentaire

T

TDT : Temps de destruction thermique
TIA : Toxi-infection alimentaire
TIAC : Toxi-infection alimentaire collective

U

UFC : Unité formant colonie
UHT : Ultra haute température

Z

Z : Facteur d'inactivation thermique

BIBLIOGRAPHIE

C.M. BOURGEOIS, J-F MESCLE et J.ZUCCA. *Tome 1 – Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Microbiologie alimentaire : Tech et Doc (1990).

J. FRENEY, F. RENAUD, W. HANSEN, C. BOLLET. *Manuel de bactériologie clinique*. Elsevier Collection Option Bio.

J. GUIRAUD, P. GALZY. *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Les éditions de l'usine nouvelle.

J.M.JAY. *Modern Food Microbiology*. Ed Van Nostrand Reinhold New-York (1992).

C. JOFFIN, J.-N JOFFIN. *Microbiologie alimentaire*. CRDP d'Aquitaine – Doin (5^e édition 1999).

LARPENT-GOURGAUD, CHAMPIAT. *Étude de la croissance bactérienne par bioluminescence*. Travaux pratiques et dirigés de microbiologie : Smer (1988).

J. LEDERER. *Tome 3 : Technologie et Hygiène alimentaire*. Encyclopédie moderne de l'Hygiène alimentaire : Maloine S.A. Editeur (3^e Edition 1985).

G. LEYRAL, E. VIERLING. *Microbiologie et toxicologie des aliments*. CRDP d'Aquitaine – Doin (3^e édition 2001).

D. LONCLE, M. AMAUDRIC, C. JACOTY. *Génie génétique*. Doin.

J-L MULTON. Coordonateur, avec la collaboration de J.-F. ARTHAUD et A. SOROSTE. *La qualité des produits alimentaires*. Politique, incitations, gestion et contrôle : Tech et Doc.

J-L MULTON. *Tome 1 : Le contrôle de qualité : principes généraux et aspects législatifs*.

BOURGEOIS-LEVEAU. *Tome 3 : Le contrôle microbiologique*.

Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires : Tech et doc.

Le point sur les salles microbiologiquement maîtrisées dans les industries agro-alimentaires.

L'usine agroalimentaire : Ed RIA et France agricole (1992).

Cours de microbiologie, hygiène et sécurité des aliments. Institut Pasteur de Lille.

Publications

Diarrhées aiguës infectieuses de l'adulte. J. Bellanger – Laboratoire Biocodex.

Le contrôle microbiologique des aliments. Benoit Colonna Ceccald – Biofutur Octobre 1996 – p. 23-26.

Le laboratoire dans l'atelier. Évelyne Cohen Maurel. Process 1083 Mai 1993.

Microbiologie et impédancemétrie. Agnès Hermant. Opéron Avril 1996.

Évaluation de la mesure d'impédance comme technique rapide d'appréciation de la qualité bactériologique du lait cru. C. Piton et A. Dasen. INRA Mars 1988.

Microbiologie alimentaire : Méthodes rapides. C. M. Bourgeois. RIA du 22 Février 1988 – p. 12-13.

Évaluer le risque microbiologique : une première prévention. Henri Beerens. RIA du 18 Novembre 1985 – p. 39-44.

Le moteur de la certification. François Morel. PROCESS N° 1088 Novembre 1993.

Un système bien rodé : la validation AFNOR des techniques rapides. A. Branger. ENILBIO Poligny 1994.

Bactéries sporulantes psychrotrophes et traitement technologique des aliments. A.S Guillard, J.Vendeuvre. Actualités technique et industrielles Juin 1993.

Le contrôle bactérien rapide des eaux par épifluorescence. Jean-Marie Delattre. Journal français d'Hydrologie 1986, 17, Fasc.1 p. 59 à 70.

Les réglementations européennes et leurs conséquences techniques et commerciales en IAA. Frédéric Stanier. Bulletin de la société française de Microbiologie, 12, MS, 1997.

Bactériologie et épidémiologie des souches typiques et atypiques et potentiellement pathogènes d'Escherichia coli. C. Richard. L'information du technicien biologiste, 1989 ; 45-52.

Conditions d'agrément des établissements de transformation du lait et de produits à base de lait. Note de service. n° 8121 du 13 Juillet 1994. Ministère de l'Agriculture et de la pêche.

Exigences à satisfaire par les laboratoires d'essais accrédités ou candidats à une accréditation et modalités d'application. Documents AFAQ.

Document RNE/COFRAC (Comité Français d'accréditation). Article 8 du règlement intérieur du RNE. Documents 1402-1002 programme 59.

Journal Officiel. *Hygiène alimentaire. Textes généraux, 1997. Laites et produits laitiers, 1997. Viandes et produits à base de viande. Produits de la mer et d'eau douce.*

Journal officiel des communautés européennes. Proposition de directives du conseil relative à l'hygiène des denrées alimentaires. JO n° C24 du 31 janvier 1992 – p.11.

Contrôle de la qualité des produits alimentaires. 6^e édition AFNOR 1996. Analyse microbiologique. Tome 1 : Méthodes horizontales. Tome 2 : Méthodes sectorielles.

Rapport de jury de concours – Agrégation biochimie-génie biologique. Concours externe 1993 et 1995 – Concours interne 1992 – Ministère de l'éducation nationale – CNDP

Maîtrise de la qualité microbiologique en agro-alimentaire. M.Catteau. L'information du technicien biologiste 1988 ; 9-11.

Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires

La démarche qualité mise en place dans les industries agroalimentaires vise à garantir la conformité de leur production à un ensemble de critères et répond en cela aux exigences de sécurité des consommateurs.

Le respect de ces critères, en particulier microbiologiques, nécessite des contrôles pratiqués tant sur les matières premières, les produits en cours de fabrication et les produits finis, que sur les locaux et le personnel.

Cet ouvrage a pour objectif :

- de préciser la place de ces contrôles dans la démarche qualité ;
- de présenter les organismes certificateurs ;
- d'exposer les différentes méthodologies de quantification et d'identification des microorganismes ;
- d'étudier les microorganismes pathogènes ou contaminants recherchés lors des contrôles effectués.

Quarante manipulations présentées sous forme de fiches techniques permettent de concrétiser ces deux derniers points.

Enfin, quatre annexes recensent les méthodes normalisées ou officielles, les critères microbiologiques relatifs aux principaux produits des filières et présentent l'analyse linéaire de ces produits. Ils justifient les méthodologies décrites dans les manipulations choisies.

L'ouvrage se veut à la fois un guide pratique dans une démarche réfléchie pour le choix d'une méthodologie d'analyse, et un outil permettant sa mise en œuvre.

Cinquième ouvrage d'une série consacrée aux sciences des aliments, ce livre s'adresse aux étudiants préparant les BTS Qualité dans les industries alimentaires et bioindustries, BTS Biochimiste, BTS Biotechnologies, BTSA Industries agroalimentaires, DUT de Biologie appliquée, ainsi qu'aux étudiants des formations complémentaires post BTS et post DUT abordant la qualité dans les IAA.

Il s'adresse également aux professeurs enseignant dans ces sections ainsi qu'en baccalauréat STL Biochimie Génie biologique.

Enfin, par sa structure, à la fois guide et outil pour la mise en œuvre des analyses microbiologiques, il peut être utile aux techniciens des laboratoires de contrôle.

ISSN 1629-7954
ISBN 2-7040-1119-2



9 782704 011193

ISBN 2-86617-395-5
Réf. CRDP 330 9B 145



9 782866 173951

INTERFORUM
Prix Benelux

€33.95