

Evaluation de la méthode ISO 6579 de détection de *Salmonella* spp.

(Sur la base de l'intervention de Mme BOHNERT – AFSSA -
lors de l'Assemblée générale 2001 de CECALAIT)

La méthode décrite dans le projet de norme ISO 6579 (2000) de recherche de *Salmonella* spp. dans les aliments a été évaluée, dans le cadre d'un programme européen destiné à établir, au moyen d'études collaboratives, les performances de fidélité des méthodes ISO de détection et/ou dénombrement de microorganismes pathogènes dans les aliments. En outre, dans le but d'arriver à la validation de cette méthode auprès des autorités américaines, elle a été comparée aux deux méthodes utilisées par l'AOAC International, pour, respectivement, les aliments fortement contaminés et faiblement contaminés, à savoir, AOACI OMA 995.20 et AOACI OMA 2000.06.

Ces méthodes ont été trouvées globalement satisfaisantes, avec des performances de fidélité équivalentes quel que soit l'aliment testé, la détection de *S. Typhi* et *Paratyphi* pouvant toutefois se révéler délicate. A l'issue de ces travaux, il a été recommandé de reconnaître la méthode ISO aux Etats-Unis et d'inclure en annexe de la future norme ISO les valeurs de fidélité obtenues au cours de cette étude.

En 1996, la Commission Européenne lançait un projet, destiné à évaluer la fidélité de six méthodes microbiologiques horizontales ISO, portant sur la détection et / ou le dénombrement de microorganismes pathogènes dans les aliments. Des données de fidélité, établies par une étude collaborative, conformément à la norme ISO 5725, sont en effet, un préalable indispensable avant l'adoption d'une méthode normalisée en tant que norme Européenne par le CEN (Comité Européen de Normalisation). Elles ont d'ores et déjà été obtenues pour *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* (recherche et dénombrement), *Staphylococcus* à coagulase positive et *Clostridium perfringens* (cf Lettres de CECALAIT n° 26, 30, 35 et 36). L'ultime étape avant l'achèvement du projet était l'évaluation de la méthode de recherche de *Salmonella* spp.

Or celle-ci est décrite dans la norme ISO 6579, dont la dernière édition datait de 1993 et qui fait l'objet d'une procédure de révision depuis 1997. Il semblait logique d'attendre que cette procédure ait avancé significativement, afin d'évaluer de préférence, la méthode destinée à être appliquée dans les années à venir. C'est pourquoi la méthode de détection de *Salmonella* spp. a été évaluée en dernier, en suivant le protocole expérimental décrit dans le projet EN ISO 6579, paru en 2000. Les programmes de validation précédents avaient impliqué une vingtaine de laboratoires internationaux, au sein de l'Union Européenne. Cette fois-ci, le projet a encore pris plus d'ampleur, avec la participation d'experts américains de l'AOAC International. Ce, dans le but de constituer auprès de cet organisme un dossier de validation de la méthode ISO 6579 afin qu'elle soit reconnue aux Etats-Unis et puisse, en conséquence, être autorisée dans les contrôles à l'exportation vers les Etats-Unis, à la place de la méthode AOAC. La procédure s'en est évidemment trouvée alourdie puisqu'elle impliquait la comparaison des deux méthodes.

Comme précédemment, les coordinateur et partenaires du programme restent :

- coordinateur de l'ensemble du projet : AFSSA (Mme LAHELLEC)
- partenaires : le RIVM aux Pays-Bas et le MAFF-CSL au Royaume Uni

A tour de rôle, chacun de ces trois laboratoires a été responsable d'un volet du projet. L'étude sur *Salmonella* spp. a ainsi été conduite par l'AFSSA (unité de Ploufragan) en Europe ; un laboratoire américain (BioControl Systems) supervisant l'étude aux Etats-Unis.

Parmi les sous-contractants de ce programme, CECALAIT a assuré la préparation, la mise au point, la définition des paramètres de conservation et l'expédition des échantillons de fromage.

1) *SALMONELLA* : GENERALITES ET REGLEMENTATION

↳ GENERALITES

Il s'agit de germes incriminés dans de très nombreuses toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), plus de 40 000 cas annuels aux Etats-Unis, dont la fréquence semble de plus en plus augmenter de façon notable, principalement aux Etats-Unis, mais aussi dans les autres pays développés.

Dans l'environnement, de nombreuses espèces de salmonelles sont naturellement présentes chez les poulets, dindes, canards, rongeurs, chats. On les trouve aussi dans l'eau, le sol, mais également sur les surfaces industrielles ou de cuisines. Les aliments les plus fréquemment incriminés dans les infections sont des viandes hachées, de la charcuterie, de la volaille, des rôtis de boeuf préparés à l'avance et des oeufs (ovoproduits, crème pâtissière, mayonnaise, crème glacée), du poisson et des coquillages. Les statistiques de l'IVS concernant les TIAC de ces dernières années en France montrent que le lait et les produits laitiers sont plus rarement en cause. Cependant, l'actualité récente, de même que l'historique global des TIAC, en France et à travers le monde, montrent qu'ils sont également concernés. De façon générale, le nombre de salmonelloses s'accroît pendant les mois d'été, simplement parce que ces germes se développent facilement et rapidement dans les aliments non réfrigérés (ex. pique-niques).

Les *Salmonella* sont des bâtonnets Gram négatif, mobiles (à l'exception d'un sérovar : Gallinarum-Pullorum plus spécialement pathogène des oiseaux), aéro-anaérobies facultatifs, non-sporulés. Leur température optimale de croissance est de 35/37°C ; elles

peuvent cependant se multiplier à des températures allant de 5°C jusqu'aux alentours de 45/47°C pour certaines, bien que leur croissance soit nettement retardée par les températures inférieures à 10°C. La congélation ne garantit pas leur disparition complète. Elles sont en revanche détruites par la pasteurisation.

Au point de vue pH, elles supportent généralement une gamme de pH allant de 4,5 à 9,0 avec un optimum de 6,5 à 7,5 mais la persistance de certaines souches dans des environnements fortement acides a déjà été signalée. Elles sont, en outre, capables de survivre très longtemps dans des aliments déshydratés. Enfin, on a signalé l'existence d'au moins une souche résistante à plusieurs antibiotiques de nature différente.

Les salmonelles sont toutes potentiellement pathogènes pour l'espèce humaine ou tous les animaux. *Salmonella* Typhi et Paratyphi, même ingérés à faible dose, sont responsables des fièvres typhoïde ou paratyphoïde dans l'espèce humaine (taux de mortalité : 10%). Les autres formes, moins graves, de salmonelloses nécessitent généralement l'ingestion d'un nombre élevé de microorganismes. Puis la multiplication des germes dans le tube digestif produit des symptômes en 6 à 48h. Il s'agit de douleurs abdominales souvent violentes, de vomissements fréquents, douloureux et violents, accompagnés de diarrhées, nausées, céphalées, fièvre, frissons, abattement... qui durent de 1 à 7 jours. La guérison est généralement sans complication, mais la FDA recense environ 2 cas de mortalité pour 1000 contaminations. Les sujets les plus sévèrement atteints sont en général, les personnes âgées, les très jeunes enfants, les personnes immunodéprimées.

↳ REGLEMENTATION

Les réglementations française et communautaire imposent l'absence de *Salmonella* pour la quasi totalité des aliments. C'est notamment le cas pour les laits, lait en poudre, fromages, beurres, produits liquides à base de lait, lors de leur mise sur le marché. Dans le détail, la directive 92/46* communautaire spécifie « absence dans 25g pour le lait cru destiné à la consommation humaine directe, dans 1g pour les autres produits ** ». Initialement reprises dans la réglementation française (AM du 30/4/1994), **ces spécifications ont été modifiées** par une note de service de la DGAI (n°2686 du 24/10/1996 ***) qui fixe « **absence dans 25g** » pour l'ensemble des produits laitiers.

* citée dans DG 24, «aperçu des critères microbiologiques pour les denrées alimentaires dans la législation communautaire en vigueur, 20/09/2001

** in directive 94/71 du 13/12/1994 modifiant la directive 92/46

*** citée dans la Note de service n°2001-8090 du 27/06/2001

2) METHODES DE DETECTION

↳ EN 12824 DE 1998

C'est **actuellement** la méthode horizontale de référence en France et dans l'Union Européenne pour la recherche des *Salmonella* spp. Elle se base sur la norme ISO 6579 :1993, notamment en imposant :

- l'utilisation des milieux sélectifs liquides suivants : bouillon de Rappaport-Vassiliadis vert malachite chlorure de magnésium et bouillon au sélénite-cystine, pour la phase d'enrichissement,
- l'utilisation de la gélose au rouge de phénol et au vert brillant (milieu d'Edel et Kampelmacher) et d'une autre gélose au choix, pour la phase d'isolement.

Elle s'en distingue cependant en introduisant quelques modalités spécifiques de pré-enrichissement pour certains produits alimentaires et en laissant la possibilité de 24h supplémentaires d'incubation dans le milieu de Rappaport-Vassiliadis.

↳ PROJET ISO 6579, JUIN 2000

C'est la méthode décrite dans ce projet qui a été évaluée dans le cadre de cette étude. Elle diffère très nettement des méthodes décrites dans la version 1993 de la norme et dans la norme EN 12824. Les différences portent notamment sur :

- les deux milieux sélectifs liquides pour l'enrichissement : pour le premier, bouillon de Rappaport-Vassiliadis, c'est la formulation contenant de la peptone de soja qui est désormais retenue (RVS) ; le deuxième milieu, bouillon au sélénite-cystine, jugé trop toxique pour l'environnement, est remplacé par le bouillon Mueller-Kaufmann au tétrathionate-novobiocine (MKTn)
- les deux milieux sélectifs solides pour l'isolement : comme avant, l'un est obligatoire, l'autre est laissé au libre choix du laboratoire. Mais, la gélose au rouge de phénol et au vert brillant autrefois obligatoire est maintenant remplacée par la gélose xylose lysine désoxycholate (XLD). Quant au deuxième milieu, laissé au choix, il doit permettre la recherche des *Salmonella* lactose positive, ainsi que celle de *S. Typhi* et *S. Paratyphi*, deux points qui n'étaient pas expressément spécifiés autrefois.

En revanche, les étapes de confirmation biochimique et sérologique restent identiques dans leur principe, mais seraient allégées au point de vue pratique.

La procédure décrite dans le projet de norme ISO 6579 se décompose schématiquement en quatre phases successives.

- phase de pré-enrichissement à partir de la prise d'essai ensemencée dans de l'eau peptonnée tamponnée, puis incubée 16 à 20 h à 37°C.
- phase d'enrichissement en milieux sélectifs liquides : avec la culture obtenue après pré-enrichissement, ensemencement de :
 - de 10 ml d'un bouillon RVS, avec 0,1 ml, puis incubation 24h ± 3h à 41,5 ± 1°C
 - &
 - de 10 ml d'un bouillon MKTn, avec 1 ml, puis incubation 24h ± 3h à 37°C ± 1°C

NB 1 : la température de 41,5°C doit permettre d'inhiber les flores annexes trop abondantes, tout en ne dépassant pas la limite de 43°C, susceptible d'inhiber la plupart des salmonelles

NB : le milieu MKTTn est réputé permettre la croissance de *S. Typhi* et *S. Paratyphi*.

- phase d'isolement en milieux sélectifs solides : à partir de chacune des cultures d'enrichissement, ensemencement de :

- milieu XLD
 - &
 - « d'un autre milieu sélectif solide approprié, laissé au choix du laboratoire, complémentaire du milieu XLD, permettant la recherche de *Salmonella* lactose positive, ainsi que celle de *S. Typhi* et *S. Paratyphi* » (in projet de norme ISO 6579)^o
- puis incubation 24h ± 3h à 37°C ± 1°C

- phase de confirmation : à partir d'une colonie caractéristique provenant de chacun des milieux d'isolement, :

- tests biochimiques sur :
 - ♦ gélose au citrate de fer et aux trois sucres (TSI),
 - ♦ gélose à l'urée,
 - ♦ milieu pour la décarboxylation de la L-lysine,
 - ♦ milieu pour la recherche de la β-galactosidase,
 - ♦ milieu pour la réaction de Voges-Proskauer,
 - ♦ milieu pour la recherche de l'indole

&

- tests sérologiques

Si la première colonie testée est négative après les tests biochimiques, l'ensemble des tests de confirmation est pratiqué sur 4 autres colonies caractéristiques provenant de chacun des milieux d'isolement.

Des tableaux d'aide à l'interprétation des résultats biochimiques et sérologiques permettent ensuite de décider quelles colonies peuvent être considérées comme étant des *Salmonella*.

Dans ce projet de norme, à nouveau examiné en réunion du Comité permanent *ad hoc* (SC9) de l'ISO en juin 2001 à Berne, certains points ont été et restent discutés.

La suppression de l'enrichissement dans le bouillon au sélénite-cystine est ainsi fortement contestée. L'étendue des tests de confirmation est également sujette à discussion : est-il envisageable de s'arrêter après les tests biochimiques en se dispensant totalement ou partiellement du sérotypage ? De même, la proposition de ne confirmer que le seul antigène O, reste également discutée, car ne convenant pas forcément à tous les pays. Enfin, l'utilisation obligatoire de la gélose XLD ainsi que le remplacement du bouillon sélénite-cystine par le bouillon MKTTn sont des sujets de controverse, notamment de la part de la FIL.

D'autres difficultés, concernant la composition des milieux, sont apparues par ailleurs, notamment en examinant les données de cette étude. Ainsi, la composition du milieu MKTTn n'est pas clairement définie pour l'heure, puisqu'actuellement les fournisseurs en proposent 4 formulations différentes. De même, pour le milieu RVS, initialement décrit dans un article paru en 1987 (cf bibliographie), préparé à partir de trois solutions différentes, de grandes précautions s'imposent, surtout pour la préparation de la

solution de chlorure de magnésium, pour arriver à respecter les concentrations spécifiées ; c'est ainsi que la formulation indiquée ne semble pas être respectée par tous les fabricants.

↳ METHODE AOAC

Pour les aliments fortement contaminés, il s'agit de la méthode AOACI OMA 995.20, proposée en 1995 (*first action*) pour la détection de *Salmonella* dans les aliments crus, fortement contaminés et les aliments à base de volaille. Elle a été définitivement acceptée en 1999 (*final action*). La révision de son protocole, pour la prise en compte des aliments peu contaminés, a abouti à la méthode AOACI OMA 2000.06 (soumise pour publication) et c'est donc cette méthode qui a été suivie, pour ce type d'aliments.

Son protocole expérimental se décompose également schématiquement en quatre phases successives.

- phase de pré-enrichissement à partir de la prise d'essai ensemencée, pour cette étude, en bouillon lactose, puis incubée 24h ± 2h à 35°C ± 2°C.
- phase d'enrichissement en milieux sélectifs liquides : avec la culture obtenue après pré-enrichissement, ensemencement de :

- milieu de Rappaport-Vassiliadis (RV), avec 0,1 ml, puis incubation 24h ± 2h à 42°C ± 0,2°C

&

- bouillon tétrathionate, avec 1 ml.

Dans ce cas, les conditions d'incubation diffèrent selon la charge microbienne présumée des aliments examinés :

- ♦ Pour ceux faiblement contaminés par une flore annexe, incubation 24h ± 2h à 35°C ± 2°C,
- ♦ pour ceux fortement contaminés (c'est le cas des échantillons de poulet dans cette étude), incubation 24h ± 2h à 43°C ± 0,2°C ,

- phase d'isolement en milieux sélectifs solides : à partir de chacune des cultures d'enrichissement, ensemencement de :

- milieu XLD et gélose Hektoen entérique (HE), tous deux incubés 24h ± 2h à 35°C ± 2°C

&

- milieu bismuth sulfite (BS), incubé 24h ± 2h, examiné, puis incubé pour 24h supplémentaires à la même température

- phase de confirmation : à partir de deux colonies caractéristiques sur chacun des milieux d'isolement, tests en deux étapes :

- sur gélose TSI et gélose au fer et à la lysine (LIA) dans un premier temps, incubées 24h ± 2h à 35°C ± 2°C
 - à partir de colonies présumées positives sur chacune des géloses ci-dessus, confirmation par le test à l'urée, d'autres tests biochimiques, puis tests sérologiques
- NB : même quand les tests décrits sont identiques à ceux de l'ISO, les milieux utilisés peuvent être différents.

Comme dans la méthode ISO, l'interprétation des résultats se fait à l'aide de tableaux.

3) ETUDE COLLABORATIVE

Comme pour chacune des méthodes microbiologiques évaluées au cours de ce programme européen, les échantillons utilisés se divisent en :

- matériaux de référence, à savoir des capsules de gélatine, préparées par le RIVM, contenant de la poudre de lait, contaminée par *Salmonella* Typhimurium.
- trois types d'aliments, représentatifs de la diversité du domaine d'application de la méthode, à savoir :
 - ♦ un produit laitier : fromage frais, préparé par CECALAIT,
 - ♦ un produit carné : poulet effilé, ionisé, puis recontaminé avant d'être rehydraté légèrement, préparé par le MAFF-CSL,
 - ♦ un produit sec : poudre d'oeuf, préparée par le RIVM, .

Ils ont tous été contaminés artificiellement, à trois niveaux d'inoculum (zéro, bas, haut), à la fois par des souches appropriées de *Salmonella*, non stressées, d'origine alimentaire, ainsi que par une flore autochtone simulée, constituée de bactéries lactiques et d'une flore Gram négative, pour le fromage, Gram positive pour la viande. La poudre d'oeuf a été contaminée à l'aide de capsules, tant pour la souche de *Salmonella*, que pour la microflore, Gram positive, simulée.

Quel que soit leur niveau de contamination, l'homogénéité et la stabilité des échantillons d'aliments ont été vérifiées avant le début de l'étude collaborative.

Les souches utilisées pour le poulet et la poudre d'oeufs sont respectivement *Salmonella* Typhimurium et *S. Panama*. Pour les échantillons de fromage, la souche utilisée a été *Salmonella enterica*, subsp. *enterica*, serovar Montevideo (aussi dénommée *S. montevideo*), une souche lactose positive, isolée aux Etats-Unis, à partir de soupe déshydratée. Les niveaux de contamination se sont finalement établis selon le tableau 1 suivant

tableau 1 : niveaux de contamination des échantillons de fromage
table 1 : contamination levels of the cheese samples

niveau level	souche de <i>Salmonella</i> (lactose +) lactose + <i>Salmonella</i> strain	flore autochtone autochthonous flora
bas low	5 – 10 / 25g	bactéries lactiques lactics 1000 / g
haut high	50 – 100 / 25g	+ flore gram négative gram negative flora 1000 / g

Un pré-essai entre les trois laboratoires partenaires pour bien cerner les difficultés de la méthode et fixer le mode opératoire a eu lieu à la fin de l'année 1999. Puis, après des essais d'entraînement à partir de capsules de référence, pour les laboratoires qui le souhaitaient pour se familiariser avec ces protocoles expérimentaux nouveaux ou peu usités en Europe, l'étude collaborative a eu lieu en mars et mai 2000 et a finalement rassemblé 17 laboratoires de 12 pays européens ainsi que 10 laboratoires américains.

Compte tenu du nombre de matrices et de niveaux à examiner en utilisant deux méthodes, les protocoles expérimentaux de chacune des méthodes ont cependant été allégés dans leur étape de confirmation. Ainsi, le nombre de colonies à confirmer a été réduit (moins de colonies et ne provenant, en outre que d'un seul des milieux d'isolement), de même que le nombre de tests biochimiques. Il s'ensuit que dans l'interprétation des résultats, ne pourront être comparées que les méthodes dans leur globalité : comparer les mérites de l'un ou l'autre milieu d'enrichissement ou d'isolement est impossible !

Les laboratoires européens pouvaient choisir les matrices qu'ils souhaitaient analyser, mais devaient obligatoirement utiliser la méthode ISO. Ils pouvaient, en outre, rajouter l'utilisation de la méthode AOAC.

Les analyses ont été effectuées en aveugle, avec 5 répétitions pour chaque niveau. Après exclusion des résultats des laboratoires ayant obtenu des résultats faux positifs ou dont les analyses des échantillons de référence n'avaient pas été satisfaisantes (ie détection de moins de 4 échantillons positifs sur 5), le nombre de participants aux résultats exploitables est résumé dans le tableau 2, ci-dessous .

tableau 2 : nombre de laboratoires dont les résultats ont été exploitables

table 2 : number of laboratories which results were considered

fromage cheese	poudre d'oeuf egg powder	poulet poultry
ISO& AOAC : 16	ISO& AOAC : 15	ISO& AOAC : 14
ISO : 21	ISO : 21	ISO : 20
AOAC : 16	AOAC : 15	AOAC : 14

4) RESULTATS DE L'ETUDE COLLABORATIVE

Les résultats des organismes préparant les échantillons ont montré que leur stabilité et leur homogénéité étaient satisfaisantes.

Puis, le dépouillement des rapports d'essais a permis de constater que leur transport et leur réception avaient été globalement satisfaisants. En ce qui concerne le protocole de la méthode ISO, il a, en outre, montré la diversité des milieux d'isolement, choisis en

tant que deuxième milieu sélectif solide (cf protocole expérimental ci-dessus). Le libre choix de ce milieu semble donc bien correspondre à la pratique des laboratoires. Dans le détail :

- 9 laboratoires ont utilisé une gélose BS (3 fournisseurs différents),
- 4 laboratoires ont utilisé une gélose BGA, au vert brillant (2 fournisseurs différents),
- 2 laboratoires ont utilisé la gélose Rambach,
- Les géloses MLCB et HE ont été utilisées chacune par 1 laboratoire.

Les tableaux 3 et 4 présentent les valeurs de « fidélité » obtenues, en utilisant la méthode du projet de norme ISO 6579 ou la méthode AOAC. Les deux méthodes sont des méthodes qualitatives, où il s'agit de détecter la présence ou l'absence de microorganismes donnés, non de les dénombrer. Les critères habituels de fidélité (répétabilité, reproductibilité) ne peuvent donc être utilisés. A leur place, sont repris les critères de performance : sensibilité, spécificité, accordance, concordance, odds ratio, obtenus et mis au point dans l'étude (dans ce même programme communautaire) portant sur la recherche de *Listeria monocytogenes* (cf Lettre de CECALAIT, n°30, juillet 1999)

Tableau 3 : résultats obtenus en utilisant la méthode décrite dans le projet de norme ISO 6579

Table 3 : results obtained using ISO 6579 (draft) method

Echantillons samples	Niveau level	Nombre labos number labs	sensibilité sensitivity	spécificité specificity	accordance	concordance	odds ratio
Fromage cheese	témoin / blank	21	-	100 %	100 %	100 %	-
	bas / low	21	74,3 %	-	83,8 %	60,5 %	3,38 *
	haut / high	21	83,8 %	-	95,2 %	71,7 %	7,83 *
	RC **	23	100%	-	100 %	100 %	-
Poulet poultry	témoin / blank	20	-	100 %	100 %	100 %	-
	bas / low	20	98 %	-	96,9 %	96 %	1,3
	haut / high	20	100 %	-	100 %	100 %	-
poudre d'œuf egg powder	témoin / blank	21	-	100 %	100 %	100 %	-
	bas / low	21	98,1 %	-	96,2 %	96,2 %	1,32
	haut / high	21	99 %	-	98,1 %	98,1 %	-
Référence Reference		25	94,4 %	-	88,8 %	89,1 %	1

* valeur significative / significant value

** capsules de référence de *Salmonella*, ajoutées avant analyse par chaque participant à des échantillons non inoculés (2 par laboratoire) et servant de contrôles positifs

reference capsules of *Salmonella* added by each participant to uninoculated samples prior to analysis (2 per laboratory) standing for positive controls

avec / with

sensibilité : pourcentage d'échantillons positifs reconnus correctement

spécificité : pourcentage d'échantillons négatifs reconnus correctement

accordance : paramètre équivalent, en gros, à la répétabilité dans les études quantitatives

concordance : paramètre équivalent, en gros, à la reproductibilité dans les études quantitatives

odd ratio : paramètre permettant d'évaluer le degré des variations entre laboratoires, par comparaison entre les valeurs d'accordance et de concordance

(pour les définitions mathématiques exactes, merci de prendre contact avec CECALAIT)

sensitivity : % of samples that are correctly found to be positive

specificity : % of samples that are correctly found to be negative

accordance : parameter somehow equivalent to repeatability in quantitative studies

concordance : parameter somehow equivalent to reproducibility in quantitative studies

odds ratio : parameter to assess the degree of inter-laboratory variation, by comparison between the magnitudes of accordance and concordance.

(if you are interested in the exact mathematical definition, please contact CECALAIT)

Tableau 4 : résultats obtenus en utilisant les méthodes AOACI 995.20 et 2000.06

Table 4 : results obtained using AOACI OMA 995.20 & 2000.06 methods

Echantillons samples	Niveau level	Nombre labos number labs	sensibilité sensitivity	spécificité specificity	accordance	concordance	odds ratio
Fromage cheese	témoin / blank	16	-	100 %	100 %	100 %	-
	bas / low	16	83,8 %	-	88,8 %	71,6 %	3,14 *
	haut / high	16	91,3 %	-	88,8 %	83,6 %	1,56
	RC **	17	97%	-	94 %	94 %	1
Poulet poultry	témoin / blank	14	-	100 %	100 %	100 %	-
	bas / low	14	55,1 %	-	56,6 %	49,5 %	1,33
	haut / high	14	94,3 %	-	92,9 %	88,8 %	1,65
poudre d'œuf egg powder	témoin / blank	15	-	100 %	100 %	100 %	-
	bas / low	15	100 %	-	100 %	100 %	-
	haut / high	15	100 %	-	100 %	100 %	-
Référence Reference		18	96,7 %	-	93,3 %	93,4 %	1

Les tableaux 3 et 4 montrent que les performances des méthodes peuvent varier en fonction du type d'aliment et du niveau de contamination. La méthode ISO semble particulièrement bien convenir pour les faibles niveaux de contamination dans le poulet et la poudre d'œufs ; ses performances sur le fromage sont cependant satisfaisantes. La méthode AOAC semble convenir particulièrement bien pour la poudre d'œufs et est également très satisfaisante pour le fromage. En revanche, des difficultés sont apparues dans cette étude pour la détection des faibles niveaux de contamination en salmonelles dans le poulet. Elles ont, toutefois, été aplanies au cours d'une étude complémentaire, effectuée à la suite de cette étude collaborative, mais toujours dans le cadre du dossier de validation de la méthode ISO auprès de l'AOAC International.

5) ETUDES COMPLEMENTAIRES

Ces essais supplémentaires ont été nécessaires pour compléter le dossier de validation de la méthode ISO auprès de l'AOAC International. Il s'agissait, d'une part, de faire de nouvelles analyses par les deux méthodes sur des échantillons encore plus faiblement contaminés que précédemment ; d'autre part de tester la spécificité de la méthode ISO sur un grand nombre de souches. Ces essais n'ont cependant pas été repris par l'ensemble des participants à l'étude précédente.

➤ ESSAIS COMPLEMENTAIRES DE DETECTION PAR LES METHODES ISO ET AOAC

Concernant les niveaux de contamination, l'AOAC International souhaite généralement effectuer des essais à des taux très bas, pour lesquels certaines des prises d'essai de 25g sont détectées négatives. Il a donc fallu préparer de nouveaux échantillons de poulet et de poudre d'œufs. Pour le fromage, les échantillons de fromage faiblement contaminés utilisés dans le cadre de l'étude collaborative ci-dessus avaient, en effet, abouti à un résultat jugé satisfaisant.

Les nouveaux échantillons de poudre d'œufs (appelés ici II) ont été préparés comme précédemment par le RIVM. En revanche, les échantillons de poulet (II) ont été préparés par le laboratoire BioControl Systems, aux Etats-Unis, à partir de poulet naturellement contaminé.

Les résultats, exprimés en nombres de résultats positifs, (ce qui correspond à la sensibilité, ramenée au nombre d'essais), obtenus pour l'ensemble des deux études avec les deux méthodes, sont donnés dans le tableau 5, ci-dessous (issu de la future publication de l'AOAC International sur ce point, Feldsine et al., 2001)

tableau 5 résultats de l'étude interlaboratoires pour la détection de *Salmonella* spp. dans les aliments par la méthode ISO 6579 (Pr.) et les méthodes AOACI 995.20 et 2000.06 (in Feldsine et al., 2001)

table 5: interlaboratory study results for the detection of *Salmonella* in foods by ISO 6579 (draft) culture method and AOACI OMA 995.20 and 2000.06 (in Feldsine et al., 2001)

Echantillons sample	Niveau level	NPP / g MPN / g	Nombre labs number labs	nombre de prises d'essais number of test portions	test positif / test positive*		** χ^2
					ISO	AOAC	
Fromage cheese	bas / low	0,028	15	75	57	65	3,1
	haut / high	1,49	15	75	66	70	1,5
	témoin / control	-	15	75	0	0	-
poudre d'œuf I egg powder I	bas / low	0,385	15	75	73	75	0,5
	haut / high	4,62	15	74	73	74	0,0
	témoin / control	-	15	74	0	0	-
poudre d'œuf II egg powder II	bas / low	0,028	8	40	13	19	1,6
	témoin / control	-	8	40	0	0	-
Poulet I poultry I	bas / low	0,147	15	74	72	39	29,3
	haut / high	0,231	15	75	75	70	3,2
	témoin / control	-	15	75	0	0	-
Poulet II poultry II	lot 1	0,009	13	78	15	14	0,0
	lot 2	0,042	13	78	14	24	3,1

avec / with

* positif : culture confirmée par la méthode ISO ou AOACI

positive : culturally confirmed data by ISO or AOACI method

** $\chi^2 : (|a-b| - 1)^2 / (a + b)$, avec a : nombre d'échantillons positifs par la méthode ISO et négatifs par la méthode AOACI et b : nombre d'échantillons négatifs par la méthode ISO et positifs par la méthode AOACI. $\chi^2 > 3,84$ indique une différence significative à $P < 0,05$

$\chi^2 : (|a-b| - 1)^2 / (a + b)$, where a : samples positive by ISO and negative by AOACI and b : samples negative by ISO and positive by AOACI. $\chi^2 > 3,84$ indicates significance at $P < 0,05$

Ces résultats montrent qu'à l'exception des taux faibles sur le lot de poulet I, les deux méthodes sont comparables.

➤ ESSAIS DE SPECIFICITE

Dans le cadre de la validation de la méthode ISO auprès de l'AOAC International, une étude de sa spécificité était nécessaire. Cette étude a été menée par l'AFSSA de Ploufragan, qui a donc appliqué

la méthode (sans les étapes de confirmation) à un ensemble de 100 à 200 souches de salmonelles et à une trentaine de germes n'appartenant pas à ce genre.

Le tableau 6 ci-dessous donne les principaux résultats obtenus. Les analyses effectuées sont détaillées après le tableau.

tableau 6 : étude de spécificité de la méthode ISO 6579 (Pr)
 table 6 : specificity study using ISO 6579 (draft) method

souches strains	croissance après enrichissement growth after enrichment		après isolement after isolation		
	RVS	MKTTn	croissance après enrichissement RVS puis isolement growth after RVS enrichment and further isolation	croissance après enrichissement MKTTn puis isolement growth after MKTTn enrichment and further isolation	aspect colonies aspect of colonies
Salmonella spp.	81/125 *	102 /124 *	XLD : 84/117 BGA : 85/114 BS : 87/117 Rambach : 84/117 HE : 57/114 XLT4 : 78/117 SS : 65/114 *	XLD : 101/124 BGA : 104/123 BS : 105/124 Rambach : 102/124 HE : 93/123 XLT4 : 92/123 SS : 99/123 *	typiques sur XLD et BGA, rarement atypiques typical on XLD and BGA ; seldom atypical
S. Typhi	selon les souches : - 3 log ou survie depending on strains : - 3 log or survival	selon les souches : - 1 log ou survie depending on strains : - 1 log or survival			BGA : typiques / typical BS : noires / black Rambach : typiques si elles sont bien isolées, sinon atypiques Rambach : typical if well isolated, otherwise atypical atypiques sur autre gélose other media : atypical
S. Paratyphi B	comme / as <i>Salmonella</i> spp.				
S. Paratyphi C	inhibition	inhibition			
flore annexe / non-<i>Salmonella</i> flora					
<i>E. coli</i>	même croissance que <i>Salmonella</i> spp. same growth as <i>Salmonella</i> spp.				très différent de <i>Salmonella</i> spp very different from <i>Salmonella</i> spp.
<i>Citrobacter</i>	± inhibée selon les souches depending on strains, may be inhibited				très ressemblant à <i>Salmonella</i> spp very close to <i>Salmonella</i> spp.
<i>Proteus</i> <i>Providencia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i>	± inhibée selon les souches depending on strains, may be inhibited				± atypiques selon les souches
<i>Morganella</i>		non inhibée no inhibition			depending on strains, may be atypical
autres genres other genera	inhibition				

* In Feldsine et al., 2001 : nombre de souches de *Salmonella* à 10⁸ cfu/mL, après enrichissement 24h
 number of *Salmonella* strains at 10⁸ cfu/mL, after overnight enrichment

En règle générale, la procédure d'étude de la spécificité se borne à constater ou non la détection des germes testés. Le laboratoire a, ici, estimé qu'il serait plus judicieux et plus riche d'enseignements de procéder à un dénombrement à l'issue de chaque étape de la méthode, c'est à dire après pré-enrichissement, enrichissement sur chacun des milieux RVS et MKTTn et enfin isolement sur gélose XLD et sur une autre gélose.

Les dénombrements ont été effectués par la méthode Spiral sur gélose nutritive (PCA) après pré-enrichissement et enrichissement, puis sur 7 géloses d'isolement différentes, dont le milieu obligatoire XLD ainsi que les milieux les plus utilisés lors de la première étude collaborative. Au total, 134 souches de *Salmonella* spp., représentatives de l'ensemble des groupes de salmonelles ont ainsi été englobées dans l'étude, dont 46 sérotypes O différents ainsi qu'une dizaine de souches atypiques. Enfin, 8 souches de *S. Typhi* et 2 de *S. Paratyphi* ont également fait partie de cette étude.

A l'issue de l'étape de préenrichissement, l'ensemble des salmonelles, mais aussi la grande majorité des autres germes testés ont montré une croissance satisfaisante. Les résultats obtenus après les étapes ultérieures sont résumés dans le tableau 6 ci-dessus.

Il en ressort que, malgré la longueur et la complexité de la procédure, *Salmonella* spp. est convenablement détectée par cette méthode. Les risques de confusion avec d'autres genres n'apparaissent cependant pas négligeables, d'où l'importance d'une certaine expertise dans la méthode et, bien sûr, des étapes de confirmation.

Les choses sont encore plus délicates avec *S. Typhi* et *Paratyphi*. Pour *S. Typhi*, le degré d'inhibition après enrichissement en milieu RVS est tel qu'on ne peut espérer détecter cette espèce en présence d'autres salmonelles. L'enrichissement en milieu MKTTn est plus performant à cet égard, mais ne donne toutefois pas lieu à une forte croissance (pour mémoire, dans l'ancien bouillon sélénite, il y a soit survie, soit croissance très légère). Pour *S. Paratyphi*, les résultats sont visiblement très différents selon le sérovar testé : ici, un sérovar est détecté, pas l'autre.

6) CONCLUSION

A l'issue de cette étude, la méthode de référence ISO 6579 (pr.) a été trouvée globalement satisfaisante pour la détection de *Salmonella* spp., plus délicate pour la détection de *S. Typhi* et *S. Paratyphi*. Comparée aux méthodes américaines AOACI 995.20 & 2000.06, ses performances en termes de fidélité apparaissent équivalentes.

Il a donc été recommandé aux instances de l'AOAC International de valider la méthode ISO. Du côté des instances de l'ISO (et du CEN), les recommandations pour l'évolution de la norme et de son statut, tirées de cette étude, ont été décidées lors de la dernière réunion de ce programme, en juin 2001, à Berne. Il s'agit :

- ♦ d'inclure, en annexe informative de la future norme, les données de fidélité déterminées dans cette étude.

- ♦ de rajouter dans la partie « domaine d'application » un avertissement sur les risques de ne pas pouvoir détecter *S. Typhi* et *S. Paratyphi*.

- ♦ d'inclure les résultats de l'étude comparative avec les méthodes AOAC, à paraître dans Feldsine et al., 2001, dans la bibliographie de la future norme.

- ♦ de poursuivre la procédure de révision de la norme sur la base de ce projet de norme modifié.

Abréviations

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments
AOAC ou AOACI : Association of Official Analytical Chemists International
AM : arrêté ministériel
BGA : gélose au vert brillant (brilliant green agar)
BPLS : gélose lactose-sucrose au vert brillant et au rouge de phénol (brilliant green phenol red lactose sucrose)
CEN : Comité Européen de Normalisation
DGAI : Direction Générale de l'Alimentation
ISO : International Standardization Organization
IvS : Institut de Veille Sanitaire
MAFF-CSL : Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Central Science Laboratory
MKTTn : bouillon Mueller-Kaufmann au tétrathionate-novobiocine
MLCB : gélose mannitol lysine au cristal violet et vert brillant
OMA : Official Methods of analysis
PCA : Plate Count Agar
RIVM : Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu
RVS : bouillon de Rappaport-Vassiliadis modifié, peptone de soja/ chlorure de magnésium/ vert malachite
RV : milieu de Rappaport-Vassiliadis
XLD : gélose xylose lysine désoxycholate
XLT4 : gélose xylose lysine tergitol 4

Bibliographie

- ♦ AOAC International Official method 995.20 *Salmonella* in raw, highly contaminated foods and poultry feed. Detection. In AOAC International Official methods of analysis, 17th edition, 2000, HORWITZ W. Ed., chapitre 17, 17.9.22, pages 120-122
- ♦ DG 24. Aperçu des critères microbiologiques pour les denrées alimentaires dans la législation communautaire en vigueur, mis à jour en juin 2001, paru le 20/09/2001 sur http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/mr/mr_crit_fr.pdf, 5 pages
- ♦ DGAI/SDHA. Critères microbiologiques applicables aux aliments. 2^e version. Note de service n°2001-8090 du 27/06/2001, 17 pages.
- ♦ FELDSINE P. et al. Recovery of *Salmonella* in selected foods by the International Standard Organization 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC International Official Method of analysis : collaborative study. J. AOAC Int., 2001
- ♦ HEUCHEL V. Origines et moyens de maîtrise à la production de la contamination du lait de vache par les salmonelles. Point n°13 Institut de l'Élevage ICTA Pilote, Rapport final (dossier, n° 97/04-2), 2000, 8 p.
- ♦ NORME NF EN 12824, février 1998 Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella*. (AFNOR V 08-013), 31 pages
- ♦ PROJET DE NORME NF EN ISO 6579, juin 2000 Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp. (AFNOR V 08-034), 25 pages
- ♦ site consacré à l'hygiène alimentaire et aux principales toxi-infections alimentaires collectives : <http://www.chez.com/guatemalt/SALMON.html>

- ♦ http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm
- ♦ US Food & Drug Administration / Center for Food Safety & Applied Nutrition. *Salmonella spp.* In Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (Bad Bug Book).
<http://vm.cfsan.fda.gov/mow/chap11.ht>

- ♦ VAN SCHOTHORST M. ; RENAUD A. ; VAN BEEK C. *Salmonella* isolation using RVS broth and MCLB agar. Food Microbiology, 1987, V ; 4, p. 11-18