

ESSAIS DE MISE EN ÉVIDENCE DES SALMONELLES DANS DES ALIMENTS DE TYPE FARINE PAR IMPÉDANCEMÉTRIE

Florence HUMBERT, Françoise LALANDE et Gilles SALVAT

CNEVA-Laboratoire Central de Recherches Avicole et Porcine - BP 53 - 22440 PLOUFAGRAN

La technique d'impédancemétrie appliquée à la bactériologie consiste à suivre la décomposition des protéines et des différents composés nutritifs d'un milieu de culture (conséquence d'une croissance bactérienne) par la mesure en continu de la conductivité de ce milieu.

Les protéines sont métabolisées par les bactéries en acides aminés, les carbohydrates principalement en lactate, les lipides en acétate et ces transformations provoquent une augmentation de la conductivité du milieu. Le temps de détection (intervalle de temps séparant le début de la mesure et la phase d'accélération du signal constitué par la conductance) dépend de la concentration initiale des micro-organismes, de la durée de la phase de latence, et du temps de génération de ces micro-organismes. Cette phase d'accélération du signal est obtenue lorsque la population bactérienne recherchée atteint 10^6 à 10^7 bactéries/ml de milieu.

Cette technique peut devenir spécifique si, et seulement si, le milieu introduit dans les puits de mesure ne permet que le développement de germes dont la présence ou l'absence est recherchée, ou si la courbe a des caractéristiques tout à fait spécifiques de ces mêmes germes.

Deux milieux sont actuellement proposés pour la détection spécifique des Salmonelles par impédancemétrie, tant par la littérature scientifique que par certains textes

officiels (Processed Animal Protein Order 1989, Statutory Instruments 1989, N° 661) : les milieux d'Easter - Gibson et d'Ogden (EASTER and GIBSON, 1985 ; OGDEN, 1988).

La présence de Salmonelles dans les aliments pour volailles, si elle ne constitue pas une nouveauté, n'en demeure pas moins difficile à évaluer compte tenu des problèmes d'échantillonnage liés à :

- une contamination bactérienne faible (il y aurait de 1 000 à moins d'une Salmonelle par kg d'aliment) ;
- une répartition hétérogène ;
- l'association à une flore bactérienne nombreuse et variée.

La technique bactériologique classique de recherche de Salmonelles (pré-enrichissement, enrichissement, isolement et identification) constitue la méthode de référence mais elle reste longue, coûteuse et inadaptée si l'on désire analyser un grand nombre d'échantillons.

Le but de l'étude est donc de comparer pour 303 échantillons d'aliments sous forme de farines, destinés aux volailles et naturellement contaminés, les résultats d'analyses effectuées avec une technique bactériologique classique d'une part, et une technique rapide et automatisée, l'impédancemétrie utilisant les deux milieux d'enrichissement préconisés : Easter - Gibson et Ogden d'autre part.

I MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les prélèvements de farines reçus au laboratoire du CNEVA à PLOUFAGRAN sont constitués des restes d'échantillons prélevés par différentes firmes dans le cadre de leurs auto-contrôles. A partir de ces échantillons, des laboratoires prestataires de services, ou appartenant à ces firmes réalisent une recherche de Salmonelles par une technique bactériologique classique et nous expédient en parallèle 50 g de farine afin d'effectuer la même analyse par impédancemétrie.

1. recherche de Salmonelles par une technique bactériologique classique

L'eau peptonnée utilisée pour la recherche classique de Salmonelles correspond à la formule de la norme NF ISO 6579 fabriquée par un des laboratoires, ou à une forme commerciale (MERCK réf. 7228). La phase de pré-

enrichissement consiste en une incubation d'une nuit ou de 18 à 24 h à 37 °C.

L'enrichissement utilise le milieu de Rappaport-Vassiliadis et le Tetrathionate (respectivement BIOMERIEUX réf. 41.214 et MERCK réf. 5172) incubé 24 h à 37 °C.

L'isolement emploie le milieu Hektoën (PASTEUR réf. 64 284 ou MERCK réf. 11 681) additionné ou non de Novobiocine (SIGMA réf. N 1628) à 10mg/l, et pour un laboratoire, le milieu RAMBACH (MERCK réf. 7500-0002), incubés 18 à 24 h à 37 °C.

Les colonies présentant les aspects caractéristiques des Salmonelles ont été étudiées pour leurs caractères biochimiques puis éventuellement sérologiques, ce qui permettait de confirmer ou non la présence de Salmonelles dans l'échantillon.

2. recherche de Salmonelles par impédancemétrie

50 g d'échantillon d'aliment ont été ajoutés à 255 ml d'un milieu de pré-enrichissement "modifié" et recommandé pour l'utilisation de cette technique. Ce milieu contenait par litre : 10 g de peptone bactériologique, 5 g de chlorure de sodium, 3,5 g de phosphate disodique dihydraté, 1,5 g de dihydrogène-phosphate de potassium monohydraté, 5 g de L-lysine et 5 g de D-glucose.

L'échantillon a ensuite été incubé une nuit à 37 °C.

Deux prélèvements de 0,2 ml chacun ont été effectués pour inoculer 2 tubes contenant chacun un des deux milieux suivants :

- milieu de Easter - Gibson (0,5 g de peptone bactériologique, 1 g Na_2HPO_4 et 0,5 g de dulcitol pour 100 ml d'eau) additionné après stérilisation (10 mn à 100 °C), de 1 ml d'une solution de L-cystine (0,1 g de L-cystine diluée dans 15 ml de soude 1 N puis complétée à 100 ml avec de l'eau

distillée stérile) et d'un supplément TMAO-sélénite (AES, réf. 184 137), conformément à la publication originale (EASTER et GIBSON 1985) ;

- milieu d'Ogden (AES, réf. 140 282) correspondant à la formulation d'Ogden (OGDEN 1988).

Ces deux milieux ont été répartis stérilement à raison de 8 ml par tube d'impédancemétrie (AES, réf. DNWR0995) et utilisés le jour même.

Les tubes inoculés ont ensuite été placés dans un système RABIT (Rapid Automated Bacteriological Impedance Technique, DON WHITLEY Scientific, UK). Les paramètres suivants ont été utilisés :

- température d'incubation : 37 °C
- temps total d'analyse : 24 h
- critères de présomption de présence de Salmonelles : accélération du changement de conductance $\geq 20 \mu\text{S}/3\text{mn}$ et changement total de conductance $\geq 1500 \mu\text{S}/24\text{h}$.

II RÉSULTATS

Les résultats concernant les 303 échantillons analysés sont regroupés dans le tableau suivant. Dans ce tableau, les échantillons classés positifs par impédancemétrie ont donné une réponse positive par l'un, l'autre ou les deux milieux d'enrichissement employés. Dans la majorité des cas cependant, c'est le milieu d'Easter et Gibson qui détecte les échantillons positifs. Inversement, les échantillons classés négatifs par impédancemétrie n'ont abouti à aucune présomption de positivité et ceci quel que soit le milieu d'enrichissement considéré.

Tableau : Présence de Salmonelles dans 303 échantillons d'aliments pour volailles analysés par deux techniques.
Technique bactériologique classique

	+	-	TOTAL
Impédance +	23	54	77
Impédance -	10	216	226
TOTAL	33	270	303

dans notre cas, la technique bactériologique classique) est de 69,7 %.

La spécificité (nombre de vrais négatifs par la technique d'impédancemétrie rapporté au nombre total de négatifs obtenus par la technique de référence) est de 80 %.

En utilisant les milieux d'Easter - Gibson et d'Ogden, l'impédancemétrie ne peut être considérée comme une technique spécifique et sensible pour la recherche des Salmonelles dans les aliments pour volailles.

Ces résultats sont très différents de ceux obtenus par GIBSON et al. (1992) au cours d'une étude collaborative concernant, il est vrai, des échantillons artificiellement contaminés.

Nos résultats sont par ailleurs très semblables à ceux obtenus par DONAGHY et MADDEN (1992) qui ont également travaillé sur des échantillons d'aliments et de matières premières naturellement contaminés et qui obtiennent un fort pourcentage de faux positifs.

Différentes pistes de recherche sont actuellement explorées afin d'adapter cette technique, qui présente par ailleurs d'énormes avantages (rapidité, simplicité et automatisation), à la recherche spécifique des Salmonelles (DONAGHY et MADDEN 1993 ; DALTRY et al. 1993 ; PARMAR et al. 1992).

Bibliographie

- ANONYME, 1989. Animal Health. The processed Animal Protein Order 1989 (N° 661). Scotland and Wales, MAFF.
- DALTRY D.-C. et al., 1993. Comparison of direct and indirect impedance technology for the recovery of *Salmonella* Enteritidis from mayonnaise. I.J.F.M. (submitted for publication).
- DONAGHY J.-A. and MADDEN R.-H., 1992. Impedance detection of *Salmonella* in processed animal protein and meat. I.J.F.M., 16 : 265-269.
- DONAGHY J.-A. and MADDEN R.-H., 1993. Detection of *Salmonella* in animal protein by Rappaport Vassiliadis broth using indirect impedimetry. I.J.F.M., 17 : 281-288.
- EASTER M.-C. and GIBSON D.-M., 1985. Rapid and automated detection of *Salmonella* by electrical measurements. J. Hyg. Cambridge. 94 : 245-262.
- GIBSON D.-M. et al., 1992. Automated Conductance method for the detection of *Salmonella* in foods : Collaborative study. Journal of AOAC International. 75 (2) : 293-302.
- OGDEN I.-D., 1988. A conductance medium to distinguish between *Salmonella* and *Citrobacter* spp. I.J.F.M. 7 : 287-297.
- PARMAR N. et al., 1992. The detection of *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium* using immunomagnetic separation and conductance microbiology. Letters in Applied Microbiology, 15 : 175-178.