

Détection des bactéries pathogènes : évolution des méthodes en microbiologie des aliments

François Le Nestour

Responsable Unité Innovation Biologie

Secur'Food, Issy-Les-Moulineaux, le 29 novembre 2011

Risques associés à la pathogénicité

Germes d'altération

Pseudomonas,
Lactobacillaceae...

Risque grave

- Clostridium botulinum,*
- Shigella,*
- Vibrio cholerae,*
- Salmonella* Typhi et Paratyphi (A,B)

Germes traceurs

Escherichia coli,
Enterococcus faecalis.

Risque modéré avec diffusion limitée

- Staphylococcus aureus,*
- Clostridium perfringens,*
- Bacillus cereus,*
- Vibrio parahaemolyticus*

Risque modéré avec possibilité de large diffusion

- Germes pathogènes
- Salmonella* spp,
 - Escherichia coli* vérotoxino-gènes,
 - Listeria monocytogenes*

Germes technologiques

Bactéries lactiques,
Levures...

Les différents principes d'analyse

Il existe plusieurs types de méthodes de détection, basées sur **des principes différents**.

Une seule étape est **commune** à l'ensemble des techniques: la suspension-mère ou **le bouillon d'enrichissement**.

Croissance bactérienne
Activité enzymatique



Milieux chromogènes

Réaction immunologique
antigène-anticorps



Test ELISA, autres...

Réaction d'amplification
génomique



Test PCR

Réaction d'hybridation
moléculaire



ADN /ADN ou ADN /ARN

Méthodes analytiques

Norme ISO 16140

Microbiologie des aliments – Protocole pour la validation des méthodes alternatives

-qualitatives en général

Méthode de référence

basées essentiellement sur la croissance bactérienne en milieux de culture

Méthode reconnue internationalement et largement acceptée

-protocoles avec différentes étapes de sub-cultures avec tests de confirmations

-utilisées dans le cadre des expertises et/ou de contre analyse

Méthode alternative

méthodes normatives (Françaises NF, Européennes EN, Internationales ISO)

Méthode d'analyse permettant de déterminer ou d'estimer le même analyte que celui mesuré avec la méthode de référence correspondante

Propriétés adaptées aux besoins des utilisateurs

-la vitesse d'analyse et/ou de réponse,
Time-to-result (TTR)

-la facilité de réalisation, l'automatisation

-les propriétés analytiques

-la réduction des coûts

-la miniaturisation

Méthode de référence: exemple

ISO 6579: recherche de *Salmonella* spp

Résultat négatif :

4 jours

Résultat positif ou
présumé positif non confirmé :

6 jours

Méthode alternative: exemple

AES Chemunex : méthode ADIAFOOD *Salmonella* spp

Résultat négatif :
de 20 à 27 heures

Résultat positif ou
préssumé positif non confirmé :
4 jours

Validations des méthodes

Objectifs et intérêt de la validation

- obtenir des garanties sur les performances des méthodes en termes de rapidité, fiabilité, praticabilité...
- assurance d'une équivalence des résultats entre la méthode testée et la méthode de référence
- en France, dès 1989, sous le nom : Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse

Organismes ou systèmes de validation

- France : AFNOR Certification



- Etats-Unis : AOAC



- Europe : MICROVAL



- Pays d'Europe du Nord : NORDVAL



Le protocole de validation AFNOR Certification, selon la norme NF EN ISO 16140, comprend **deux étapes principales** :

Étude préliminaire

Réalisée au sein d'un laboratoire expert, elle vise à comparer les performances de la méthode alternative à celles de la méthode de référence

Paramètres étudiés

- exactitude relative, sensibilité relative, spécificité relative
- niveau de détection relatif
- sélectivité

Étude collaborative

Organisée par le laboratoire expert, elle vise à valider les performances de la méthode alternative dans plusieurs laboratoires participants

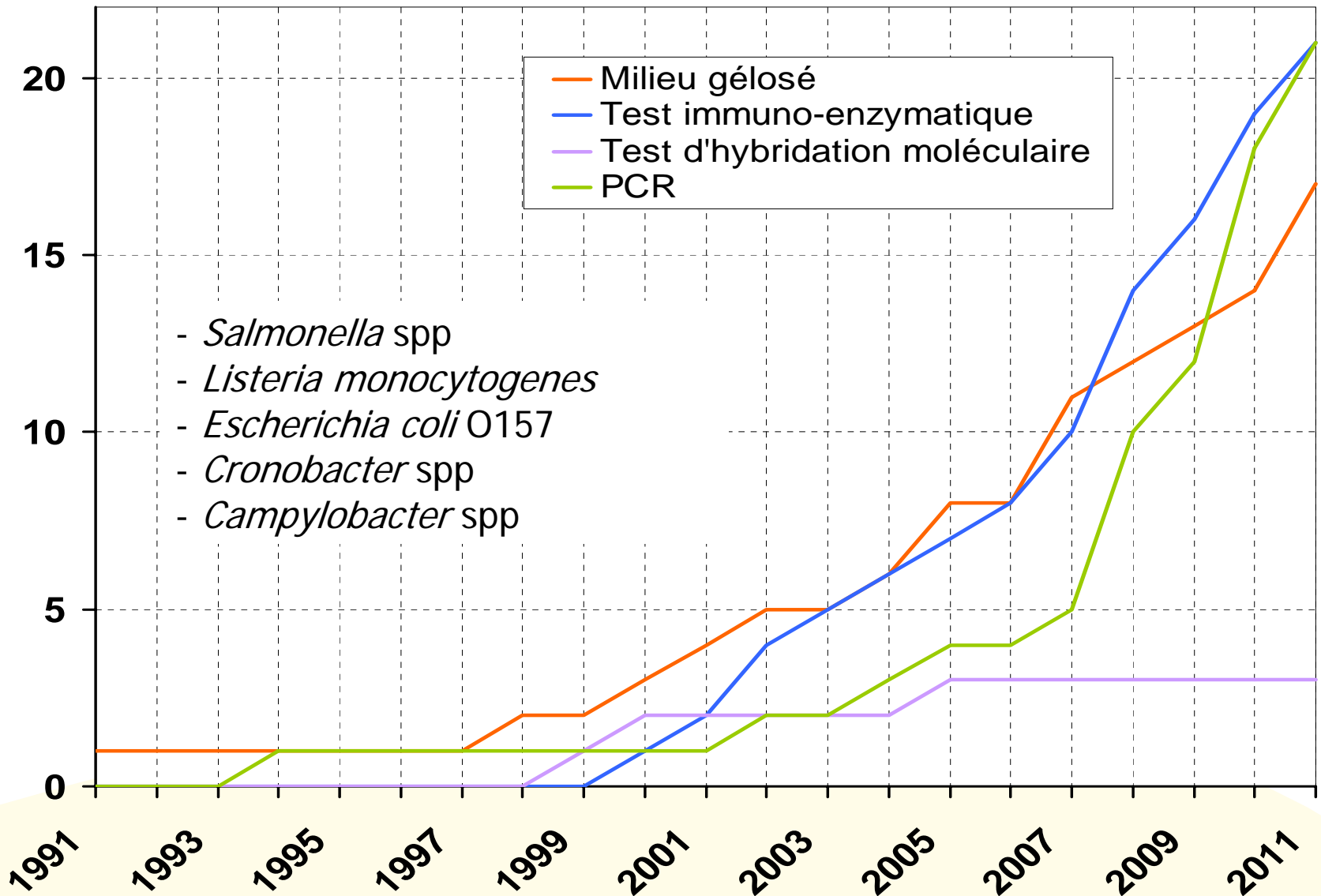
Paramètres étudiés

- répétabilité
- reproductibilité
- praticabilité

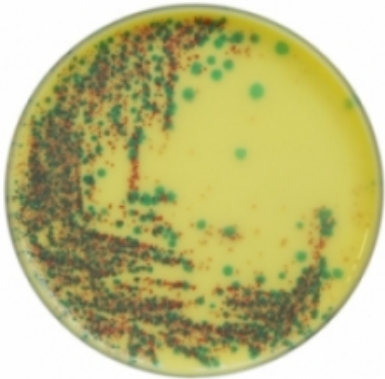
Nombre de méthodes validées AFNOR Certification depuis 1991

<u>Principe de la méthode</u>	<u>Microorganisme cible</u>			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>E. coli</i> O157	<i>Campylobacter</i> spp <i>Cronobacter</i> spp
Milieux de culture	8	7	1	1
Tests immuno-enzymatiques	5	13	2	1
PCR	4	9	7	1
Hybridation moléculaire	2	1	0	0

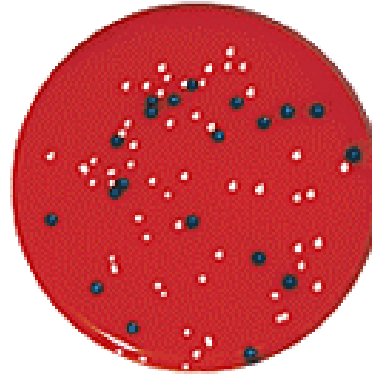
Evolution des technologies pour les méthodes validées AFNOR Certification depuis 1991



Milieux chromogéniques / chromogènes



IBISA
AES CHEMUNEX
Salmonella spp



Rapid L'mono
BIORAD
Listeria monocytogenes

Campyfood Agar
BioMérieux
Campylobacter spp



Méthodes immuno-enzymatiques



VIDAS
bioMérieux
Listeria, Salmonella...

Transia Plate Salmonella Gold
BIOCONTROL
Salmonella spp



RapidChek SELECT Salmonella
SDIX
Salmonella spp

Méthodes PCR



BAX real-time PCR
OXOID Thermofischer Scientific
Salmonella spp, *E. coli* O157

Microseq
Life Technologies
Salmonella spp, *E. coli* O157



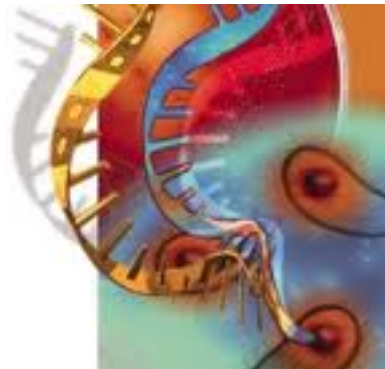
Genedisc
Pall Genedisc Technologies
Listeria monocytogenes, *E. coli* O157



Hybridation moléculaire

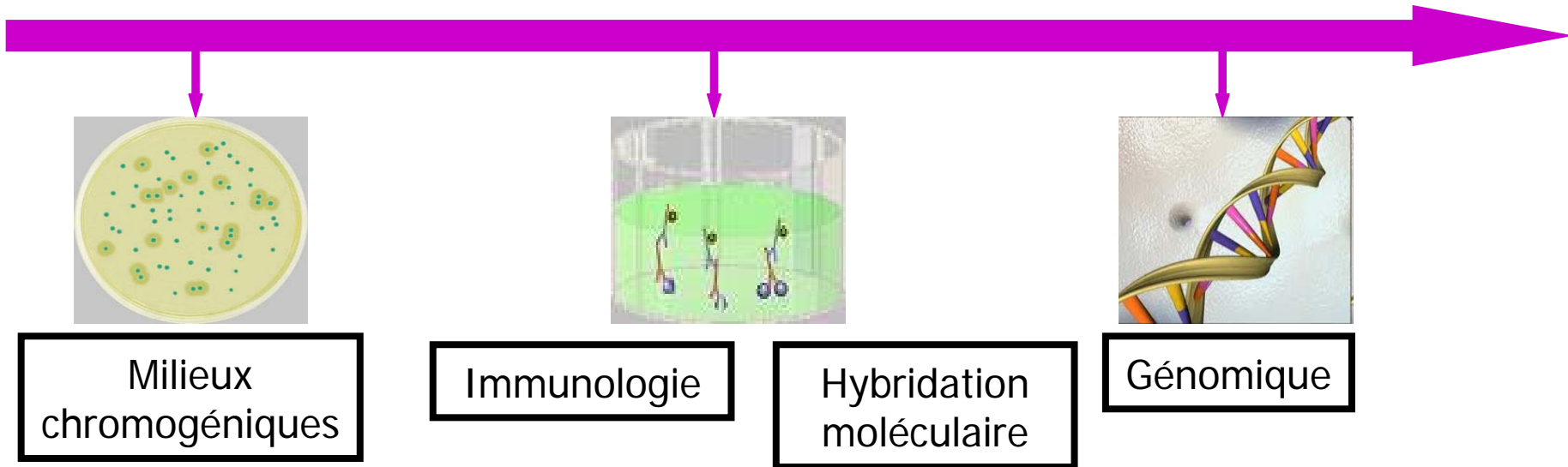


Lumiprobe
Europrobe
Salmonella spp, *Listeria
monocytogenes*



Accuprobe
GEN-PROBE
Listeria monocytogenes

Evolution des méthodes et axes de développement



Tendances actuelles de développement

- diminution des temps d'enrichissement (préchauffage des bouillons d'enrichissement) et augmentation de leur sélectivité
- développement de techniques multiplex (PCR principalement) pour détecter plusieurs germes-cibles à partir d'un seul bouillon d'enrichissement

Conclusion

Les méthodes de demain?

-mise au point de nouvelles techniques d'analyse: puce à ADN, spectrométrie de masse (MALDI-TOF), cytométrie en flux

⇒ Techniques très coûteuses actuellement et difficiles à mettre en place pour de grandes quantités d'échantillons

Quelle méthode pour ma problématique?

-de nombreuses techniques disponibles mettant en jeu des principes différents
-permettent aux utilisateurs de faire le choix lié à leur critère d'intérêt principal et /ou à leurs contraintes:

- nombre d'échantillons analysés
- rapidité du résultat
- espace disponible
- coût de revient...

Merci de votre attention