



ALIMENTATION: L'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

Bien peser le pour et le contre

avant de commencer à utiliser ces tests rapides

Els Jonckheere, Control & Automation Magazine

Les recherches microbiologiques sont en pleine évolution ces derniers temps. Suite au développement progressif de la biotechnologie et à l'automatisation, on voit apparaître de plus en plus de méthodes de test alternatives. Il faut avouer cependant que les méthodes classiques font également des progrès grâce à la meilleure connaissance des propriétés du micro-organisme. De plus, grâce à l'attention accrue accordée à la préparation des échantillons, des techniques alternatives peuvent être appliquées avec succès sur la matrice complexe des denrées alimentaires. La Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele de l'Unité de recherche en Sécurité de la chaîne alimentaire et en Qualité alimentaire (Université de Gand) nous fait le point...

L'analyse microbiologique est appliquée dans l'industrie alimentaire pour deux raisons. Elle est un premier lieu un pilier fondamental dans le développement de nouveaux produits alimentaires ou processus de production, ainsi que dans l'optimisation de ceux-ci. La Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele raconte : « Ces tests permettent en effet de contrôler les durées de conservation. Ils sont également appliqués lors de l'exécution de challenge tests en vue d'évaluer la croissance et la survie des pathogènes. Il ne s'agit toutefois que d'une petite partie du domaine d'application de l'analyse microbiologique au sein de l'industrie alimentaire. Car en réalité ces tests sont surtout effectués dans le cadre de la sécurité de la chaîne alimentaire : leur objectif est d'arriver à comprendre la présence de pathogènes et d'identifier de cette manière les points critiques pour rédiger un plan HACCP, de vérifier l'efficacité des pratiques hygiéniques, de les confronter aux spécifications déterminées et d'approuver ou de refuser éventuellement certains lots. Voilà pourquoi le fabricant de produits alimentaires effectuera dans le cadre du suivi de l'hygiène plusieurs tests microbiologiques, dans les différentes phases du cycle de production : lors de la réception des matières premières, sur les demi-produits pendant le processus de production ou dans l'environnement de production juste avant l'expédition des produits finis, ... »

Plus vite est parfois mieux...

La méthode d'analyse à utiliser ne dépend pas uniquement du type de germe que vous voulez analyser (Salmonella, Listeria, Escherichia coli, ...), mais également de l'aliment. La Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele : « Pour la plupart des applications, le législateur a prescrit par la loi la méthode la plus appropriée. Il



Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele: "L'exécution d'analyses microbiologiques deux à trois fois plus vite a évidemment l'air très séduisant. Il faut toutefois bien peser le pour et le contre avant de commencer à utiliser ces tests rapides."

s'agit toutefois de tests basés sur le greffage des cultures, ce qui prend assez de temps. Dans certains cas, on a cependant intérêt à arriver plus vite à des résultats valables : au cas où votre système de prévention HACCP aurait échoué, si vous voulez approuver un lot ou si vous recevez des plaintes au sujet de votre produit, ... Par conséquent, de nombreuses études ont été menées ces dernières années en vue d'accélérer l'analyse microbiologique. Et nous commençons à retirer les bénéfices aujourd'hui, puisqu'il existe entre-temps bon nombre de métho-

des efficaces qui réduisent la durée des tests par un facteur deux ou trois. Le législateur stipule en plus que les tests alternatifs sont autorisés, à condition qu'ils aient été validés en fonction de la norme ISO16140 par un organisme indépendant, comme Afnor en France, MicroVal en Europe ou AOAC aux Etats-Unis. Afin de savoir si les tests ont été agréés par les autorités belges, consulter l'AFSCA. L'agence a en effet dressé une liste de toutes les méthodes de test bactériologiques conformes aux exigences de l'autocontrôle."



photos: Charles Schweizer

Dénombrement plus rapide des colonies

Les méthodes de test rapides se divisent en deux catégories. Les premières méthodes sont destinées au suivi de l'hygiène et partent du dénombrement d'organismes. Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele : « La dernière génération part de milieux chromogènes : des milieux gélosés au pouvoir différentiel amélioré qui permettent de détecter et de dénombrer les colonies typiques de manière fiable, notamment par le biais de la décoloration. Il existe



Photo: Charles Schweitzer

Les méthodes de test à base de techniques d'ADN moléculaire (comme PCR) commencent également à faire fureur dans la détection de pathogènes.

à présent des solutions pour les E. coli, ainsi que pour les pathogènes comme les Listeria monocytogenes. Le défi majeur de travailler avec ces milieux chromogènes est d'annihiler suffisamment les flores microbiennes accompagnatrices que vous ne voulez pas dénombrer." Le système 'Tempo®' introduit par bioMérieux est tout à fait nouveau. Cette solution est une méthode automatisée et optimisée, basée sur le test classique du 'Nombre le Plus Probable'. Le système 'Tempo®' fonctionne avec de petites cartes dans lesquelles se trouvent seize fois trois minitubes, de plus en plus petits, remplis d'un bouillon liquide. "Les germes y sont automatiquement greffés en une série (limitée) de dilutions, pour éviter qu'ils doivent encore être déposés sur des milieux gélosés," explique la Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele. "Il suffit d'introduire les cartes dans l'incubateur pendant la période fixée – un à deux jours – pour qu'on puisse les lire automatiquement et formuler le résultat de l'analyse. Le désavantage de cette méthode est que l'utilisateur doit se procurer l'appareillage nécessaire qui fait partie du 'système Tempo®' sophistiqué. Cette solution ne s'adresse donc qu'aux entreprises alimentaires qui effectuent suffisamment d'analyses. Un autre avantage est d'ailleurs que la solution peut être connectée au système d'informations du laboratoire et qu'elle évite de cette manière l'encodage manuel des résultats des analyses."

Des tests Elisa plus sensibles

La deuxième grande catégorie de méthodes de test rapides est destinée à la détection de pathogènes. Les tests Elisa, détectant les anticorps, sont les plus connus. La Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele : "L'évolution la plus

importante de cette solution est l'application de phagocytes comme facteur liant au lieu des anticorps. Les phagocytes sont en fait des virus qui infectent et tuent certaines bactéries grâce à leurs récepteurs. Par leur spécificité et pouvoir liant excellent, ils éliminent en grande partie les redondances des tests Elisa classiques et rendent l'analyse donc beaucoup plus sensible. Le système 'Vidas' de bioMérieux a intégré récemment les phagocytes (VidasUp™). En conséquence, un test Elisa pour E. coli 0157 dans la viande de bœuf rouge ne dure maintenant que huit heures, par rapport à 24 heures dans le passé !" Dans le cadre du projet européen PathogenCombat dans les laboratoires, ces phagocytes, liés à de petites boules magnétiques, ont été utilisés pour détecter spécifiquement les Listeria dans une suspension et pour réduire leur concentration, ce qui accélère la recherche de quantités réduites. En combinaison avec une méthode de détection rapide, il sera dès lors possible d'effectuer une analyse des Listeria dans les 24 heures.

La technique de l'avenir proche ?

De plus, les méthodes de test à base de techniques d'ADN moléculaire (comme PCR) commencent également à faire fureur dans la détection de pathogènes. "La technique de PCR existe depuis quelque temps, mais elle n'avait pas encore percé puisque la technique d'ADN ne pouvait détecter qu'une seule bactérie par tube PCR, tandis que la microbiologie alimentaire requiert la détection d'une bactérie dans 25 g d'alimentation. La technique PCR devait en plus faire face aux interférences de la matrice complexe," raconte la Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele.

"Plusieurs scientifiques s'en sont rendus compte et se sont concentrés ces dernières années sur l'optimisation des différentes étapes de la préparation des échantillons. Ce processus a d'ailleurs fait l'objet d'une recherche dans notre laboratoire. Nous avons également prêté attention à la détection de pathogènes alimentaires, stressés par l'acidification, la surgélation, ... Lorsque les méthodes de test rapides sont appliquées sur les aliments artificiels greffés dans le laboratoire, quasiment toutes les solutions fonctionneront. Toutefois, comme ces évaluations ne tiennent pas compte des cellules aux lésions subléthales – évidemment présentes dans les aliments naturellement contaminés – les résultats ne correspondront pas toujours avec la réalité. Pour effectuer une analyse microbiologique valable, il faut donc laisser le temps aux cellules stressées et créer les conditions appropriées pour se rétablir avant qu'elles puissent être détectées. En utilisant par exemple des milieux d'enrichissement améliorés. L'application de ces milieux de culture étudiés dans lesquels les cellules aux lésions subléthales peuvent se rétablir et s'accroître, en combinaison avec l'adsorption de particules magnétiques enduites de phagocytes, peut accélérer considérablement la détection de pathogènes. L'optimisation poussée de la méthode d'extraction d'ADN a en plus réduit les interférences dans les réactions PCR, rendant de cette manière la technique in vitro plus maîtrisable. Quelques méthodes de test PCR sont aujourd'hui déjà disponibles sur le marché. Bio-Rad a par exemple introduit récemment une méthode capable de réaliser en à peine huit heures l'enrichissement nécessaire pour la détection PCR des E. coli 0157 dans la viande de bœuf rouge.

Réfléchissez avant d'agir !

L'exécution d'analyses microbiologiques deux à trois fois plus vite a évidemment l'air très séduisant. La Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele ajoute toutefois que les entreprises alimentaires doivent toujours bien peser le pour et le contre avant de commencer à utiliser ces tests rapides. "Vous devez en premier lieu opposer le coût de l'investissement et les avantages de ces solutions. Il faudra en outre tenir compte du fait que le laboratoire devra opérer différemment. Vous risquerez donc de vous heurter à la résistance. Finalement, vous devrez toujours bien analyser si une certaine méthode se prête à votre application spécifique. Tout test rapide a en effet des pour et des contres. Vu le grand nombre de méthodes de test alternatives introduites actuellement sur le marché, il n'est plus si évident de sélectionner la méthode la plus adaptée à vos besoins et produits..." <<