

POINT SUR L'ACTIVITE DU GROUPE DE TRAVAIL « MILIEU TBX » DE LA COMMISSION AFNOR V08B « MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS »

PARTIE 2 : ACTIVITES DU GROUPE DE TRAVAIL

Les géloses tryptone-bile-glucuronide (TBX) et peptone-tergitol-glucuronide (PTX) sont des milieux chromogènes de même principe qui permettent la numération des *E. coli* par leur caractère positif pour la β -D-glucuronidase, présente dans environ 95% des *E. coli* des produits alimentaires, le sérotype pathogène O157:H7 en est par exemple dépourvu.

Décrit depuis 1993 dans une norme de routine au niveau national (NF V08-053), le milieu PTX semblait poser des problèmes de sélectivité. En effet, le tergitol 7, agent sélectif de ce milieu, est connu pour son manque de sélectivité. Par la suite, la non-commercialisation du tergitol 7, a contribué au remplacement fin 2002 du milieu PTX par le milieu TBX. Ce milieu était déjà normalisé au niveau international depuis 2001 (ISO 16649 parties 1 et 2) et avait été choisi suite à la réunion ISO SC9 en 1997, où avaient été présentées des comparaisons entre différents milieux chromogènes sur différentes matrices. Au regard de ces résultats, le milieu TBX ne semblait cependant pas avoir des performances nettement supérieures aux autres milieux chromogènes.

Suite à l'utilisation de ce nouveau milieu, plusieurs laboratoires ont rencontré des difficultés, en particulier pour l'analyse des produits laitiers. Ces observations ont été reprises dans un premier article dans « La lettre de CECALAIT » N° 54. Suite à ces constats, la commission V08B a décidé de créer un groupe de travail pour regrouper ces observations, les étudier et essayer d'y apporter des solutions. Organisé par l'AFNOR, ce groupe de travail animé par P. ROLLIER de CECALAIT regroupe une dizaine de membres fournisseurs ou utilisateurs et s'est réuni 3 fois entre 2004 et 2005. Les activités et conclusions de ce groupe sont exposées dans cette seconde partie.

1) ETUDE DE COMPARAISON DE METHODES REALISEE PAR L'AFSSA

Suite à des remarques émanant du réseau européen lait, l'AFSSA a mené une étude de comparaison de différentes méthodes. Une partie de cette étude a été présentée au groupe de travail TBX. Nous avons repris ici uniquement la conclusion concernant le milieu TBX :

- L'étude portait sur la comparaison des différentes parties de l'ISO 16649 : 2001 (partie 1 ensemencement sur membrane et en surface ; partie 2 ensemencement en profondeur ; partie 3 par méthode NPP). A signaler que ces essais ont été menés avec des milieux TBX provenant d'un seul fournisseur.
- Concernant l'utilisation du milieu TBX (parties 1 et 2) les résultats ont montré que sur des fromages naturellement contaminés, la partie 1 est soit équivalente à la partie 2, soit permet de récupérer plus d'*E. coli* que la partie 2, en particulier pour les échantillons contenant des bactéries stressées. Mais la partie 1 demande une étape supplémentaire de récupération sur membrane peu pratique à mettre en œuvre, et explique pourquoi pratiquement aucun laboratoire ne l'applique.

Ainsi, les études présentées dans les paragraphes 2 et 3 ont été réalisées selon le protocole de la partie 2 ou de la norme NF V08-053 : 2002 pratiquement équivalent.

2) PROBLEMES POSES PAR LES MILIEUX PRETS A L'EMPLOI

Le groupe de travail s'est plus particulièrement intéressé aux milieux prêts à liquéfier qui semblaient poser plus de problèmes que les milieux reconstitués à partir de poudre. En effet, certains laboratoires ont remarqué que les milieux TBX prêts à l'emploi en flacons semblaient plus fragiles et plus sensibles à la chaleur que les milieux préparés en déshydratés, avec en particulier, une couleur plus diffuse des colonies.

Le laboratoire L2 a ainsi comparé des milieux TBX du même fournisseur en prêt à l'emploi ou préparés à partir de milieu déshydraté sur des échantillons naturellement contaminés de fromages au lait cru et sur un essai d'aptitude CECALAIT dans le lait :

- Sur les échantillons de fromages au lait cru, ce laboratoire a observé des numérations un peu plus faibles ou de même ordre qu'en déshydraté. Un seul échantillon montre une sous-estimation très élevée (1,7 log).
- Sur les échantillons de l'essai d'aptitude, les différences sont plus élevées (entre 0,6 et 0,8 log), ceci peut s'expliquer par la nature des échantillons : ils sont artificiellement contaminés avec un mélange de 3 souches et contiennent un conservateur bactériostatique qui peut entraîner un stress supplémentaire des bactéries.

Un autre laboratoire a remarqué qu'un milieu préparé à partir de milieu déshydraté non autoclavé était plus

performant qu'après autoclavage, mais cette pratique n'a pas été cautionnée par les fournisseurs.

A CECALAIT, nous avons également observé sur un milieu préparé en déshydraté une performance décroissante dans le temps (voir essais de performance décrits ci-dessous).

Il est fort probable qu'un composé contenu dans le milieu TBX soit très sensible à certains facteurs et à la chaleur en particulier. Il est peut-être nécessaire de mieux sensibiliser les laboratoires sur les bonnes pratiques d'utilisation des milieux prêts à l'emploi : comme par exemple la température de conservation qui peut agir sur la stabilité du chromogène ou bien limiter au minimum le temps de chauffage du milieu pour le ramener sous forme liquide, et l'utiliser ensuite rapidement.

3) TESTS DE PERFORMANCE DE MILIEUX

Les membres du groupe de travail se sont ensuite penchés sur les tests de performance pour savoir tout d'abord s'ils étaient souvent mis en œuvre par les laboratoires et ensuite s'ils pouvaient mettre en évidence un défaut de croissance.

3.1 Principe général des tests de performance

Le protocole de réalisation de ces tests de performance et les souches à utiliser sont généralement décrits dans la norme ISO/TS 11133-2 et seraient à réaliser par les laboratoires dans le cas de milieux préparés à partir de milieu déshydraté. Pour le milieu TBX, les souches à tester sont décrites dans la norme de routine NF V08-053. Les milieux sont validés après avoir passé avec succès un test de stérilité et des tests de croissance. Pour chaque test de croissance, le milieu à évaluer est comparé à un milieu de référence non sélectif, TSA (Tryptone-Soja-Agar) en général.

3 tests de croissance sont décrits :

- **La productivité** : concerne des souches dénombrées ou recherchées par le milieu testé et permet d'apprécier la performance du milieu pour la croissance de ces souches.
- **La sélectivité** : au contraire, concerne des souches non dénombrées ou recherchées par le milieu testé. La sélectivité mesure la capacité du milieu à inhiber totalement ces souches.
- **La spécificité** : dans la même catégorie, permet d'évaluer la culture des souches présentant un aspect non caractéristique.

En ce qui concerne le milieu TBX, le protocole et les souches décrits dans les normes pour tester la sélectivité semblent convenir. Il existait cependant un problème sur la référence d'une souche préconisée en spécificité dans la norme NF V08-053. Le groupe de travail a étudié cette question et deux souches ont été proposées en remplacement lors de la commission V08B du 22 mars 2005 (point 4- PV 165).

Le groupe de travail s'est penché plus particulièrement sur les tests de productivité dans les études décrites ci-dessous, puis a réalisé une enquête sur l'utilisation de ces tests de performance dans les laboratoires utilisateurs.

3.2 Tests de productivité sur le milieu TBX

3.2.1 Tests de productivité réalisés par un laboratoire d'analyses début 2003:

Les tests de productivité ont été réalisés sur une souche de *E. coli* isolée de produits alimentaires mais différente de celles décrites dans la norme NF V08-053 par ensemencement en profondeur en milieux PTX et TBX. Ces tests ont mis en évidence l'inhibition de *E. coli* sur tous les milieux TBX provenant de 4 fournisseurs différents préparés sous forme déshydratés ou en prêts à l'emploi. Ces tests ont permis de valider le milieu PTX sous forme déshydraté mais non en prêt à l'emploi.

3.2.2 Tests de productivité réalisés en juillet 2004 sur les souches utilisées dans les essais d'aptitude CECALAIT

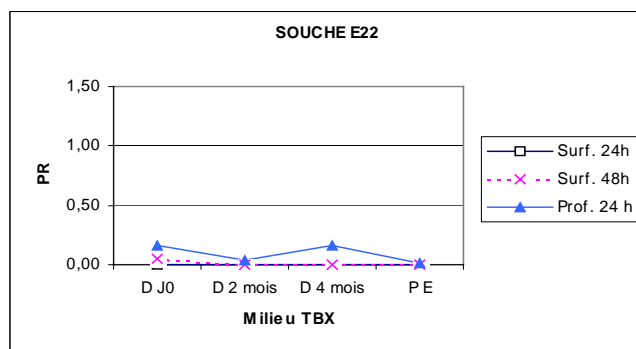
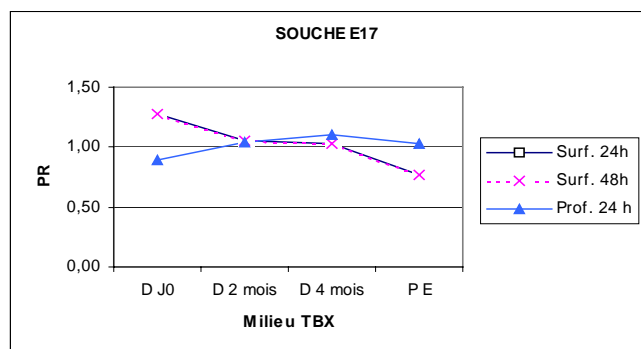
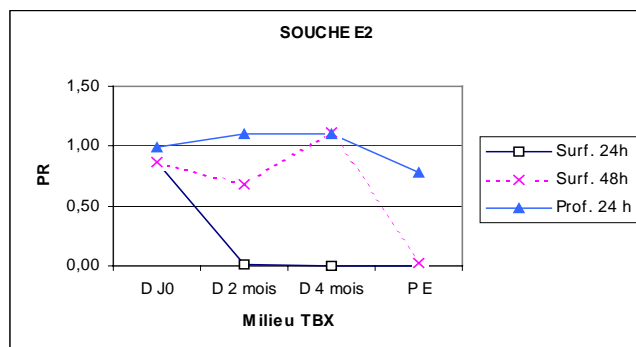
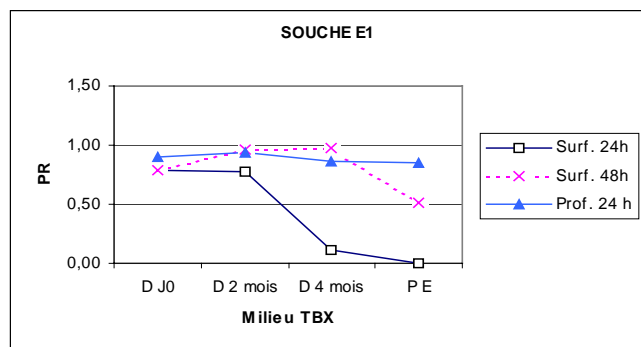
L'objectif de cette étude réalisée dans le laboratoire de CECALAIT était de savoir si les souches utilisées dans les essais d'aptitude étaient sensibles à l'effet milieu, et si l'on obtenait des différences de productivité en fonction du mode de préparation des milieux, leur temps de stockage et aussi en fonction de l'inoculation pour la réalisation des tests de performance en surface ou en profondeur.

Les 4 souches testées sont celles habituellement utilisées dans les essais d'aptitude CECALAIT, et ont été isolées à partir d'échantillons de produits laitiers.

4 types de milieux d'un même fournisseur (A) ont été testés : milieu TBX en déshydraté préparé le jour de l'étude (J0), le même milieu utilisé 2 et 4 mois après préparation ; milieu TBX en prêt à l'emploi (PE) ; avec le milieu TSA-YE (Tryptone-Soja-Agar et Extrait de Levure) utilisé en référence.

Les boîtes ont été ensemencées en surface (système Spiral) et en profondeur, et incubées 24 et 48 h à 44 +/- 1°C. La productivité (PR) a été calculée en fonction de ces différents facteurs, le critère de validation d'un lot étant PR>0,5.

Les résultats présentés dans les figures ci-dessous montrent l'influence de différents facteurs sur la productivité du milieu TBX :



- 1- **Effet souche** : On constate que suivant la souche testée, elle peut être soit toujours inhibée (E22), jamais inhibée (E17) ou avoir une réponse différente selon les milieux (E1 et E2). D'après ces résultats la souche E22 serait du même type que la souche de l'étude décrite ci-dessus, inhibée quel que soit le type de TBX utilisé. La question qui se pose est de savoir à quelle fréquence ce type de souches est rencontré dans les produits naturellement contaminés, ce qui pourrait expliquer les problèmes rencontrés ponctuellement dans les échantillons naturels. Suite à cette étude, la souche E22 n'est plus utilisée dans les essais d'aptitude CECALAIT.
- 2- **Effet milieu** : Un effet milieu est constaté sur les souches E1 et E2. Les milieux classés en performance décroissante sont : le milieu déshydraté préparé à J0 – préparé 2 mois avant – préparé 4 mois avant – milieu prêt à l'emploi. La durée de stockage des milieux préparés ne doit normalement pas dépasser 3 mois au réfrigérateur (ISO/TS 11133-1). Le milieu TBX préparé en flacon voit ses performances diminuer au cours du stockage, et d'autre part doit subir un chauffage supplémentaire avant utilisation, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, le manque de performance du milieu prêt à l'emploi testé ici.
- 3- **Effet du type d'ensemencement** : L'inhibition est plus importante en surface qu'en profondeur et permet d'obtenir des effets milieu plus

importants. Dans le cas d'un ensemencement en surface, une incubation prolongée de 24 heures permet d'obtenir des colonies dénombrables, qui sans doute ne s'étaient pas développées ou n'exprimaient pas la couleur bleue en 24 heures. Cet effet avait déjà été observé sur des échantillons d'essais d'aptitude ou lyophilisés. La norme ISO/TS 11133-2, actuellement, laisse le choix sur le mode d'inoculation, il est noté en chapitre 5.3.1.2 note 2 : « La méthode d'ensemencement en profondeur peut aussi être utilisée pour les milieux de culture normalement utilisés pour le dénombrement par cette méthode ». Le groupe de travail a donc décidé de proposer une nouvelle rédaction plus directive pour les tests quantitatifs : le choix est encore laissé entre une inoculation en surface ou en profondeur, mais il est précisé que l'ensemencement du milieu doit se faire de la même façon que celui décrit dans la norme correspondant au milieu testé. Cette proposition a été transmise pour approbation au groupe de travail chargé de la révision de la norme ISO/TS 11133-2.

3.3 Enquête sur la réalisation de tests de performance dans les laboratoires

- **Objectifs de l'enquête** : La question que s'est posée le groupe de travail était de savoir si ces tests pouvaient détecter un lot susceptible ensuite de poser des problèmes lors de son utilisation. C'est pourquoi, il a été décidé d'envoyer en

septembre 2004 une enquête aux membres de la commission V08 B afin de savoir, tout d'abord, si des problèmes étaient souvent rencontrés lors de l'utilisation du milieu TBX, si des tests de performance étaient souvent réalisés et, dans ce cas, s'ils permettaient d'écarter des lots pour lesquels des problèmes avaient été constatés.

- **Résultats de l'enquête :** Seulement 6 laboratoires sur 95 sollicités ont répondu. Le problème le plus souvent rencontré (3 laboratoires) est la croissance d'autres bactéries non cibles, mais ceci ne serait pas lié à l'utilisation de milieu prêt à l'emploi. Un seul laboratoire réalise des tests de performance mais avec un protocole et avec des souches différentes de ceux décrits dans les normes. Ces tests n'ont pas pu mettre en évidence le problème de non-spécificité observé par ce laboratoire dans ses analyses de routine.

Les tests de performance normalisés sont à priori peu ou pas mis en œuvre dans les laboratoires utilisateurs du milieu TBX, ils ne sont à priori réalisés que chez les fournisseurs. Tous les milieux commercialisés sont conformes à l'issue de ces tests, qui sans doute ne peuvent pas mettre en évidence les problèmes décrits ci-dessus.

4) CONCLUSION

Dès les premières utilisations du milieu TBX en remplacement du milieu PTX pour la numération des *E. coli* dans les aliments, certains laboratoires analysant des échantillons naturellement contaminés ou des échantillons des essais d'aptitude CECALAIT ont constaté ponctuellement des problèmes d'inhibition plus ou moins marqués sur le milieu TBX. A signaler que le conservateur bactériostatique contenu dans les échantillons de ces essais d'aptitude peut engendrer un stress supplémentaire des souches par rapport à un échantillon naturel et, de ce fait, peut accentuer les problèmes constatés sur certains lots.

Le groupe de travail a montré qu'il peut exister des effets liés à différents facteurs :

- l'échantillon (type de souche, état physiologique des souches, matrice),
- le milieu lui-même (lot, mode de préparation et de stockage),
- la méthode (diluant, mode d'ensemencement)...
- et peut-être d'autres facteurs non encore identifiés.

Ces effets en se cumulant peuvent sans doute générer des différences importantes dans les numérations.

En travaillant sur les tests de performance de milieux, le groupe de travail a montré que ces tests ne

semblaient pas pouvoir mettre en évidence ce type d'inhibition, et que de toute façon peu de laboratoires utilisateurs les appliquaient.

Ce groupe de travail n'a cependant pas pu mettre en évidence l'origine de ce problème, lié plus à une variabilité de lots qu'à un fournisseur particulier. La différence entre les milieux PTX et TBX provient essentiellement de leur composition différente en peptones (peptone de viande pour PTX et de caséine pour TBX) et en agents sélectifs (tergitol 7 pour PTX et sels biliaires n° 3 pour TBX). Il est connu que l'utilisation d'ingrédients biologiques de composition chimique pas bien définie, comme le sont les peptones et les sels biliaires, peut entraîner des variabilités de culture non négligeables. A signaler cependant que la norme ISO/TS 11133-2 (4.1.2) permet des tolérances dans les quantités d'ingrédient à mettre en œuvre pour la fabrication d'un lot de milieu, afin que les fournisseurs de milieux puissent optimiser leur formule. Une étude bibliographique⁽¹⁾ réalisée par un des membres de ce groupe de travail montre que les sels biliaires peuvent avoir en fonction de leur nature un effet inhibiteur plus ou moins marqué sur *E. coli*. Il faut cependant noter que les sels biliaires n°3 entrant dans la composition du TBX sont mieux définis chimiquement que des sels biliaires classiques. Ils sont également bien purifiés et stables.

Pour solutionner ce problème, la seule issue envisageable était de retravailler sur la composition et de proposer un nouveau milieu en normalisation. Cette proposition a été rejetée pour le moment par le groupe de travail, sachant que les problèmes sur le milieu TBX semblent être moins fréquemment rencontrés. De plus, cette étude demanderait un travail technique très important et très long de mise au point supporté par les laboratoires adhérents des organismes de normalisation.

Le groupe de travail « TBX » n'ayant pas trouvé l'origine de cette variabilité, son activité a été suspendue, mais nous restons à l'écoute des utilisateurs et referons un point dans la « Lettre de CECALAIT » pour vous informer, le cas échéant, sur de nouveaux éléments.

Patricia ROLLIER

(1) Cette étude bibliographique peut vous être fournie sur simple demande

Nous remercions tout particulièrement :

- *Les laboratoires utilisateurs qui ont bien voulu nous faire part de leurs résultats*
- *Les membres du groupe de travail*