

COMPARAISON DE MILIEUX POUR LA NUMERATION DE *PSEUDOMONAS*

DETERMINATION DE L'INCLUSIVITE ET L'EXCLUSIVITE (SELON LA NORME ISO 16140)

Face à l'absence de norme pour la numération des *Pseudomonas* dans le lait et les produits laitiers, le groupe de travail mixte AFNOR V08B et FIL-France / ALF de normalisation des méthodes d'analyses microbiologiques, a proposé à la FIL en 2002 un nouveau sujet pour la normalisation d'une telle méthode. Cette proposition a ensuite été soumise au vote et approuvée par les pays membres (16 votes positifs sur 21 votants).

Il existait un projet de norme horizontale pour la numération de *Pseudomonas* (ISO/WD 13720), mais le milieu CFC décrit dans cette norme et habituellement utilisé pour la viande, ne semblait pas convenir pour l'analyse du lait et des produits laitiers. Une enquête réalisée à ce sujet au niveau de la FIL a montré qu'effectivement même si le milieu CFC était le plus utilisé, il manquait des données pour savoir si ce milieu était le mieux adapté pour le lait et les produits laitiers.

Le groupe de travail a donc confié à Françoise LERICHE (ENITA Clermont-Ferrand), spécialiste des *Pseudomonas*, la mise au point d'un nouveau milieu (voir articles parus dans la Lettre de CECALAIT n° 48 et n° 51). Cette étude a abouti à la proposition d'un nouveau milieu, appelé PPA (Penicillin Pimaricin Agar). En 2004, ces résultats ont été présentés à la FIL groupe JAT et il a été décidé de lancer une étude de comparaison de 3 milieux : gélose CFC, gélose GSP et gélose PPA. Ces essais ont été menés conjointement à la FIL (groupe « harmonisation microbiologique ») et à l'ISO (TC 34 / SC 9), pour étudier la possibilité d'utilisation d'un milieu unique pour tous les produits alimentaires.

- Concernant les produits laitiers, les résultats obtenus dans cette étude sont en moyenne plus élevés pour la gélose PPA, assez proches entre les géloses PPA et GSP, et par contre beaucoup plus faibles pour la gélose CFC.

- Pour les autres produits, les résultats obtenus lors de cette étude sont équivalents entre les 3 géloses.

Ces résultats ont été présentés lors de la réunion ISO SC9 qui s'est tenue en juin 2005 et il a été décidé de proposer deux normes sectorielles : une pour le lait et les produits laitiers et l'autre pour la viande et les produits à base de viande (ISO 13720).

Cependant, afin de finaliser une méthode dans les produits laitiers, des essais complémentaires semblaient nécessaires. C'est pourquoi nous avons testé la spécificité et la sélectivité des milieux de numération, en étudiant en parallèle les tests de confirmation.

PRINCIPE :

L'étude a consisté dans un premier temps à comparer la croissance des souches cibles et non cibles sur 4 géloses différentes, dont une gélose non sélective qui servait de témoin, et à calculer la productivité des milieux. Les tests de confirmation ont été ensuite mis en œuvre, ce qui a permis l'évaluation de l'ensemble de la méthode.

De plus, l'étude de souches de référence cibles et non cibles nous a permis de sélectionner les souches à utiliser dans le cadre des tests de performance des milieux, qui doivent maintenant figurer dans toute nouvelle norme ISO.

• Dilution de cette culture de façon à obtenir 50 à 150 colonies par boîtes.

• Ensemencement de 2 boîtes par milieu avec le système Spiral sur 4 milieux différents :

- gélose CFC (AES) : décrite dans la norme ISO 13720, incubée 48 heures à 25°C ;

- gélose GSP (MERCK) : avec les suppléments pénicilline à 100 000 UI/l (Calbiochem) et pimaricine à 0,01 g/l (Molekula), incubée 72 heures à 25°C ;

- gélose PPA : constituée de la base CFC et des suppléments de la gélose GSP (pénicilline et pimaricine), incubée 48 heures à 25°C ;

- gélose TSA (AES) : Trypticase Soja Agar, incubée 48 heures et 72 heures à 25°C, milieu de référence pour vérifier la culture des souches et pour calculer la productivité des milieux sélectifs, pour un même temps d'incubation (selon l'ISO 11133-2) :

1 - MATERIEL ET METHODES

1.1 - PROTOCOLE

Le protocole décrit dans la norme ISO 16140 a été suivi.

1.1.1 - NUMERATION :

• Culture des souches dans un bouillon non sélectif (Brain Heart Infusion) incubé environ 18 heures à 25°C

$$\text{PR} = \frac{\text{Nombre de colonies sur le milieu à tester}}{\text{Nombre de colonies sur le milieu TSA}} \quad (\text{productivité})$$

1.1.2 – CONFIRMATION :

• Les confirmations ont été réalisées à partir d'une colonie isolée de chaque gélose sélective, soit 3 colonies par souche.

• Les isollements de ces colonies ont été réalisés sur gélose nutritive incubée 24 à 48 heures à 25°C, avant la réalisation des 2 tests de confirmation :

- **Recherche de l'oxydase** : la méthode décrite dans la norme ISO/WD 13720 ainsi que 3 tests commerciaux différents ont été comparés, en notant pour chaque résultat le temps d'apparition de la couleur violette.

- **Fermentation du glucose** : nous avons testé en parallèle la gélose glucosée (Biokar Diagnostics) et le milieu Kligler Hajna (bioMérieux), milieux préconisés respectivement dans les normes ISO/WD 13720 et NF V04-504. La lecture a été réalisée après 21, 24 et 27 h à 25°C, afin d'étudier l'influence de la durée d'incubation. Une deuxième série de comparaison a été réalisée par la suite entre la gélose glucosée et le milieu O/F (bioMérieux), mais sur seulement une colonie par souche. Le milieu O/F est en effet préconisé dans la révision des normes ISO 21528 parties 1 et 2 sur les *Enterobacteriaceae*, et serait également choisi dans la révision de la norme ISO 13720 à la place de la gélose glucosée.

• Lorsque l'espèce était mal définie ou en cas de doute, 1 galerie API 20NE ou API 20E (bioMérieux) selon le cas, a été réalisée. Pour les *Pseudomonas*, lorsque la galerie API 20 NE n'aboutissait pas à l'identification de l'espèce, une identification complémentaire a été réalisée dans les laboratoires bioMérieux, allant de tests biochimiques supplémentaires à un séquençage ARN 16s, suivant la difficulté de l'identification. 5 souches ont été ainsi testées et pour une seule souche l'espèce n'a pas pu être déterminée précisément.

2 - SOUCHES TESTEES :

62 souches cibles et non cibles différentes ont été testées:

- 49 provenant de 6 laboratoires français : 31 souches provenant d'échantillons de lait et produits laitiers dont en majorité des fromages, 13 de prélèvements d'environnement des industries laitières, 2 d'origine laitière non définie précisément et 3 souches d'origine alimentaire,
- 2 souches de moisissures commercialisées,
- 10 souches de référence,
- 1 souche d'origine non définie.

Dont 48 souches d'origine laitière qui ont permis d'obtenir les résultats d'inclusivité et d'exclusivité :

- 24 souches cibles de *Pseudomonas* dont 13 *P. fluorescens*, 3 *P. stutzeri*, 2 *P. aeruginosa*, 2 *P. aureofaciens*, 2 *P. fragi*, 1 *P. pseudomallei* et 1 *P. spp.*

- 24 souches non cibles connues pour être interférentes avec les souches de *Pseudomonas* dans les produits laitiers, dont 10 *Aeromonas*, 5 *Enterobacteriaceae*, 6 souches Gram négatif et fermentation du glucose négative, 2 moisissures et une levure.

3 - RESULTATS

Nous avons pris en compte uniquement les résultats obtenus sur les souches d'origine laitière : échantillons divers de produits laitiers dont en majorité du fromage, prélèvements d'environnement lors de la production de ces produits et moisissures utilisées pour l'affinage des fromages.

3.1 – INCLUSIVITE

L'inclusivité (ou spécificité) est la capacité de la méthode à détecter les souches cibles. Pour ce faire, la présence des ces souches cibles est testée sur les milieux sélectifs étudiés.

Tableau 1 : résultats de l'étude d'inclusivité exprimés en pourcentage de souches détectées

n = 24	Avant confirmation			Après confirmation		
	CFC	GSP	PPA	CFC	GSP	PPA
<i>PSEUDOMONAS</i>	100%	96%*	96%*	100%	96%*	96%*
* Souche B'1 (<i>P. stutzeri</i>): PR= 3,3 sur CFC et PR = 0 sur GSP et PPA						

Toutes les souches de *Pseudomonas* ont poussé sur tous les milieux (PR de 0,6 à 4,1) sauf une souche de *P. stutzeri* non détectée sur les milieux PPA et GSP, ce qui conduit à une spécificité un peu plus faible pour ces deux milieux par rapport au milieu CFC.

Des résultats identiques ont été obtenus avant et après confirmation, étant donné que toutes les souches de *Pseudomonas* se sont avérées positives pour

l'oxydase et négatives pour la fermentation du glucose.

Les résultats obtenus sur les souches de référence montrent que sur 8 souches de *Pseudomonas* de collection, 3 ont bien été détectées sur milieu CFC, mais pas du tout ou peu sur milieux GSP et PPA.

Sachant que ces souches de référence ne proviennent pas de produits laitiers, et que le genre *Pseudomonas* a la particularité de ne pas avoir des caractéristiques

physiologiques stables lors de sa conservation, en particulier lors de la congélation, nous avons préféré ne pas tenir compte de ces résultats.

Néanmoins ils nous ont permis de sélectionner la souche *P. fluorescens* ATCC 13525 pour les tests de performance du milieu PPA.

3.2 - EXCLUSIVITE

L'exclusivité (ou sélectivité) est l'absence d'interférence de souches non cibles. Elle est testée par la non-détection de souches non-cibles sur les milieux sélectifs étudiés.

Tableau 2 : résultats de l'étude d'exclusivité exprimés en pourcentage de souches non détectées

n = 24 Milieux	Avant confirmation			Après confirmation		
	CFC	GSP	PPA	CFC	GSP	PPA
Gram- glucose- n=6	0%	33%	50%	50%*	67%*	67%*
<i>Aeromonas</i> n= 10	40%	0%	0%	100%	100%	100%
<i>Enterobacteriaceae</i> n=5	60%	40%	40%	100%	100%	100%
Levures et moisissures n=3	0%	100%	100%	100%	100%	100%
TOUTES LES SOUCHES	29%	29%	33%	88%	92%	92%

*3 souches confirmées comme *Pseudomonas* : *Comamonas acidovarans* et *Burkholderia cepacia* détectées sur tous les milieux et *Shewanella putrefaciens* détectée uniquement sur CFC.

- Avant confirmation :

Les 3 souches de levures et moisissures sont toutes détectées sur milieu CFC mais ne se sont pas développées sur milieu PPA et GSP, ce qui conforte l'utilisation de la pimarcine comme antifongique dans ces deux milieux.

De même, les 6 souches Gram négatif et fermentation du glucose négative, se sont toutes développées sur gélose CFC, mais 2 de ces souches ne poussent pas sur milieu GSP et 3 sur milieu PPA.

Pour les 10 souches *Aeromonas*, c'est le contraire, elles ont toutes poussé sur milieux GSP et PPA, mais 4 ne se sont pas développées sur milieu CFC.

En ce qui concerne les 5 souches d'Entérobactéries, 3 ne cultivent sur milieu CFC et 2 sur milieux GSP et PPA.

Globalement, les résultats sont un peu meilleurs sur milieu PPA que sur milieux CFC et GSP.

- Après confirmation :

Pratiquement toutes les souches sont confirmées comme n'appartenant pas au genre *Pseudomonas*, la spécificité est donc de 100% pour toutes les catégories de souches exceptées 3 souches Gram négatif et fermentation du glucose positive.

Globalement, les résultats sont un peu meilleurs sur milieu PPA et GSP que sur milieux CFC.

Les résultats obtenus sur les souches de référence, mais non repris dans le tableau ci-dessus, nous ont permis de sélectionner les souches *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pour les tests de performance du milieu PPA, en effet aucun des 3 milieux testés n'a pu détecter ces souches.

3.3 - CONFIRMATIONS

Les résultats précédents d'exclusivité montrent que l'étape de confirmation, qui a porté sur la recherche de l'oxydase et la fermentation du glucose, est nécessaire. De plus, elle semble assez performante puisque toutes les souches de *Pseudomonas* ont été bien identifiées et seulement 3 souches non cibles sur 24 n'ont pas été éliminées lors de cette étape.

A - Recherche de l'oxydase :

D'une façon générale, même si à première vue il est très simple à réaliser, le test oxydase comporte plusieurs difficultés liées à différents facteurs :

- L'imprégnation du disque : Pour les tests où un disque de papier est imbibé de réactif (méthode de référence et test « B »), la quantité de réactif doit être ni trop faible ni trop importante au risque de ne pas voir apparaître la couleur violette.

- La couleur et la texture des colonies : Nous avons dans cette étude une souche de *Serratia* pigmentée en rouge, qui s'est avérée impossible à tester. De même des colonies très sèches, comme c'était le cas des souches de moisissure et levure, sont difficiles à déposer sur le support du test. Dans ce cas, l'aspect des colonies suffit pour les écarter de la confirmation.

- Le temps maximum d'apparition de la couleur violette : Il peut être plus long que le temps préconisé dans la notice d'emploi du test ou dans la procédure normalisée. Pour la méthode de référence cette limite est actuellement de 10 s. Nous avons observé sur 4 souches de *Pseudomonas* un temps un peu plus long, environ 15 à 20 s au lieu de 10 s. Nous préconiserons

donc dans le projet de norme un temps limite de 30 s. Dans le cas du test « C » le temps limite de 5 s nous a semblé également un peu court.

- L'interprétation de la couleur : comme toute lecture visuelle, l'intensité de la couleur est quelquefois difficile à apprécier.

En reprenant l'ensemble des résultats, la comparaison de la méthode de référence et des 3 tests commerciaux montre des résultats équivalents : sur les 62 souches testées, 3 seulement ont donné des

résultats divergents. Ces résultats sont repris dans le tableau suivant, où nous avons testé l'influence du temps d'incubation sur gélose nutritive et de la durée de son stockage au froid. Ces résultats montrent que ces facteurs ont peu d'influence sur le test oxydase. Une incubation de 24 heures sur gélose nutritive semble cependant préférable pour la méthode de référence, notamment pour la souche de *Stenotrophomonas maltophilia* qui est normalement négative pour ce test.

Tableau 3 : Influence du temps d'incubation sur gélose nutritive incubée 24 et 48 h à 25°C puis du stockage de cette gélose 5 jours à 4°C, sur le résultat du test oxydase

Souche	Identification	A			B			C			D		
		24h	48h	4°C	24h	48h	4°C	24h	48h	4°C	24h	48h	4°C
HA : témoin négatif	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F5 : témoin positif	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-*45s	+20s	+20s	-	-	-	-	-	-	-	-*30s	-*30s
06-183-01	<i>P. putida</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MSII 2.1	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+*	+	+	+	-	(+)	+	+	+	+
MS 4.1.3.9	<i>P. fragi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 12633	<i>P. putida</i>	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+
ATCC 13525	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIP 103022	<i>P. stutzeri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Méthodes	Oxydase +
A: référence	< 30s
B:	10 à 30 s
C:	< 5s
D:	20 à 60 s

Oxydase -*: Couleur très claire

Oxydase +*: Couleur claire

Oxydase (+): Pour C > 5 s

B - Fermentation du glucose :

Sur l'ensemble des 62 souches, et sur 3 isolats par souches, nous avons obtenu les mêmes résultats avec la gélose glucosée et le milieu Kligler, quelque soit le temps d'incubation : 21, 24 ou 27 heures à 25°C.

La comparaison du milieu glucosé et du milieu O/F, réalisée plus tard sur 1 isolat par souche et sans adjonction d'huile en surface pour les deux milieux, donne également des résultats identiques. Cependant, sur milieu O/F les résultats négatifs sont plus difficiles à interpréter : la couleur du tube reste verte ou bien le tube présente la moitié supérieure jaune et la moitié inférieure verte. La gélose glucosée étant dans un tube plus haut et plus fin, le changement de couleur n'apparaît que sur environ 1 cm à la surface du tube. Il aurait peut-être fallu ajouter de l'huile à la surface du tube O/F pour se trouver en anaérobiose et de ce fait améliorer la lecture, mais cela nécessiterait une manipulation supplémentaire.

CONCLUSION : PROPOSITIONS POUR L'ELABORATION DE LA NORME SUR LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS

1. Milieu de numération :

Les résultats de l'étude d'inclusivité sont légèrement en faveur du milieu CFC, la différence ne provenant que d'une souche sur 24. Par contre les résultats d'exclusivité montrent une performance un peu meilleure pour le milieu PPA.

Si l'on reprend les résultats obtenus sur des échantillons de lait et de produits laitiers par F. LERICHE (la Lettre de CECALAIT n° 48 et n° 51), et dans l'étude ISO/FIL, les numérations de *Pseudomonas* obtenues sur milieu PPA sont beaucoup plus élevées que sur milieu CFC.

Les milieux PPA et GSP donnent des résultats assez semblables, légèrement en faveur du milieu PPA, mais la couleur du milieu GSP empêche de distinguer

correctement l'aspect des colonies, en particulier leur pigment, et sa base gélosée trop riche ne favoriserait pas la culture des *Pseudomonas*.

C'est pourquoi nous préconisons dans le projet de norme le milieu PPA incubé 48 +/- 2 h à 25°C.

2. Confirmation :

Cette étude nous a montré qu'une confirmation était nécessaire et que les tests oxydase et fermentation du glucose étaient adaptés.

Lors de la réunion ISO SC9 en avril 2007, il a été proposé pour la révision de la norme ISO 13720 concernant la viande et les produits à base de viande de garder uniquement le test oxydase pour la confirmation, la fermentation du glucose devenant un test optionnel.

Cette proposition étudiée lors de la semaine analytique FIL en mai 2007, a été refusée par le groupe « harmonisation microbiologique ». En effet il semblait très dangereux de proposer une méthode de référence à 2 vitesses, avec ou sans l'option fermentation du glucose et qui pouvait aboutir à une présomption de *Pseudomonas*.

Concernant la fermentation du glucose, même si les 3 tests étudiés ici ont donné des résultats équivalents, la gélose glucosée semble mieux convenir :

- elle est plus facile à préparer que la gélose Kligler, pour laquelle il faut solidifier la gélose en pente après régénération,
- elle ne nécessite pas l'adjonction d'huile en surface,
- la lecture est plus facile que sur le milieu O/F.

Nous préconisons donc pour cette norme les tests de confirmation oxydase, avec un temps de lecture inférieur à 30 s et la fermentation du glucose sur gélose glucosée incubée 24 +/- 3 h à 25°C

3. Autres propositions :

- Il a été décidé lors de la dernière réunion FIL de publier cette norme en tant que **spécification technique** afin de raccourcir le délai de parution, le projet de norme étant déjà bien avancé, et pour pouvoir tester cette nouvelle méthode avant sa normalisation en tant que telle.
- Dans le domaine d'application, la **possibilité d'analyser des prélèvements d'environnement** des produits laitiers a été ajoutée.
- **Les tests de performance des milieux** ont été ajoutés en partie à partir des résultats de cette étude.
- Des détails importants ont été ajoutés sur la **préparation de la solution de pimarinine**, ainsi que sur les conditions de conservation des solutions et des milieux.

Patricia ROLLIER

Cette étude a été menée dans le laboratoire de microbiologie de CECALAIT, mais est aussi le fruit d'une collaboration avec d'autres laboratoires, et nous tenons à remercier plus particulièrement :

- *Françoise LERICHE (ENITA Clermont-Ferrand) pour la fourniture de souches et ses conseils*
- *Arlette DARBON (LDA 01) pour la fourniture de souches et sa collaboration technique*
- *Blandine VOIVENEL (SOGEPS), Véronique LAFARGE (AFSSA LERQAP) et Agnès CAZALET (SODIAAL) pour la fourniture de souches*
- *Isabelle DESFORGES (BioMérieux) pour sa collaboration sur l'identification des souches et ses conseils*

Nous remercions également Laurence MASSON et Fabienne FAUSTINO, techniciennes à CECALAIT.