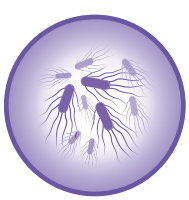
MÉTHODES ANALYTIQUES - SALMONELLA SPP.

Annexe 6



Plateforme de Surveillance de la Chaîne Alimentaire - 2019

SOMMAIRE

REGROUPEMENT D'ÉCHANTILLONS AVANT ANALYSE 5

DÉNOMBREMENT DE *SALMONELLA* SPP 6

ANALYSE EN CONTEXTE D'ÉLEVAGE SUR BOVIN 7

Recherches sur l'animal malade : contexte avortement..... 7
Recherches sur l'animal malade : contexte Septicémies-Diarrhées-Pneumonies 8
Recherches d'animaux porteurs / excréteurs..... 8

ANALYSE EN CONTEXTE D'ENVIRONNEMENT D'ÉLEVAGE 15

ANALYSE EN HYGIÈNE ALIMENTAIRE 18

Recherches sur le lait et le fromage en cours de fabrication ou produit fini 18
Recherches sur l'environnement de production.....18

REGROUPEMENT D'ÉCHANTILLONS

***LE POOLING* OU REGROUPEMENT D'ÉCHANTILLONS EST UNE DÉMARCHE PARFOIS MISE EN ŒUVRE PAR LES LABORATOIRES POUR ANALYSER LES ÉCHANTILLONS PRÉLEVÉS POUR RECHERCHER *SALMONELLA* DANS UN CONTEXTE CONTRAINT EN TERMES DE RESSOURCES FINANCIÈRES ET HUMAINES. EST-CE UNE PRATIQUE À RECOMMANDER ?**

REGROUPEMENT D'ÉCHANTILLONS AVANT ANALYSE

L'objectif de cette approche est de réduire la charge de travail, le coût des réactifs et les étapes de confirmation. Elle peut être mise en œuvre sous réserve que le mélange n'affecte pas les performances de la (ou les) méthode(s) employée(s). Plusieurs études comparatives ont été réalisées pour montrer les limites de cette pratique. Les facteurs influençant les méthodes d'analyse microbiologique sont principalement les profils de température et durée des phases d'incubation, les concentrations initiales et finales des flores bactériennes présentes dans la prise d'essai, le pH de la matrice.

Une récente étude a évalué l'impact de la dilution de la contamination résultant du mélange de plusieurs prises d'essai (25g contaminé versus 25 g contaminé + 14 x 25 g non contaminés = 375 g) pour 5 méthodes de détection basées sur des principes différents (culture, ELISA, PCR temps-réel) vis-à-vis de la méthode de référence (NF EN ISO 6579) (Tomas Fornes *et al.*, 2017). Au total, 23 matrices, 8 souches appartenant à des sérovars différents (Typhimurium inclus – souche isolée d'œuf ; Dublin non inclus) et trois niveaux de contamination ont été testés. Les auteurs ont conclu à l'équivalence de la LOD_{50}[1] pour ces méthodes dans les conditions de l'étude. Cependant, cette étude n'a pas pris en compte les matrices lait et fromage, ni celles issues du secteur santé et production animales.

Une étude danoise publiée en 2017 souligne la perte de sensibilité de détection de *Salmonella* Dublin dans le lait de vache d'une méthode ELISA, suite à la dilution du niveau de contamination par mélange de prises d'essai (Graesboll *et al.*, 2017). Le protocole optimal permettant de mener les analyses au moindre coût doit être défini selon la prévalence de contamination, la taille de chaque pool et les performances de la méthode. Le regroupement d'échantillons est d'autant plus intéressant (gain de ressources) que la prévalence de contamination est faible, sous réserve que la méthode utilisée présente un ratio spécificité/sensibilité optimal au regard du nombre de prises d'essais mélangées.

En conclusion, pour *Salmonella*, peu d'informations sont disponibles et ne précisent pas systématiquement la nature des matrices étudiées et le type de souche bactérienne utilisée. Aussi, il est fortement recommandé de vérifier préalablement (PR NF EN ISO 16140-4) l'impact du protocole incluant le regroupement d'échantillons, sur la capacité à détecter Salmonella spp. spécifiquement dans les matrices à analyser au laboratoire. En cas de grand volume, il est recommandé de préchauffer le milieu utilisé pour le (pré-) enrichissement, comme cela est déjà mentionné par la NF EN ISO 6579-1 :2017, dans le cadre d'un protocole classique (sans pooling) de recherche de *Salmonella* dans les fromages et produits laitiers secs.

Si une étape de regroupement d'échantillons est souhaitée, il est recommandé de la réaliser après obtention des pré-enrichissements individuels, pour pouvoir tester chaque bouillon individuel *a posteriori* d'un résultat positif sur le mélange.

Références bibliographiques

Graesboll, K., L. O. Andresen, T. Halasa, and N. Toft. « Opportunities and Challenges When Pooling Milk Samples Using Elisa. » Prev Vet Med 139, no. Pt B (Avril 2017): 93-98.

Tomas Fornes, D., W. McMahon, J. Moulin, and A. Klijn. « Validation of Test Portion Pooling for Salmonella Spp. Detection in Foods. » Int J Food Microbiol 245 (Mars 2017): 13-21.

[1] Limite de détection correspondant à la concentration de la contamination (UFC/prise d'essai) conduisant à une probabilité de détection de 50%, autrement dit 50% des prises d'essais contaminées initialement se sont révélées positives (détection de présence) après mise en œuvre de la méthode.

DÉNOMBREMENT DE *SALMONELLA* SPP.

LES MILIEUX GÉLOSÉS SPÉCIFIQUES POUR LA RECHERCHE DE *SALMONELLA* SPP. NE PERMETTENT GÉNÉRALEMENT PAS LE DÉNOMBREMENT DE CES BACTÉRIES DANS LE LAIT CRU OU LES FROMAGES AU LAIT CRU.

Salmonella spp. est très souvent minoritaire parmi les flores microbiennes dans le lait cru ou les fromages au lait cru et leurs propriétés physiologiques peuvent ne pas être suffisamment distinctives pour les différencier sur gélose, sans la phase de pré-enrichissement.

En termes de dénombrement, une seule méthode de référence est disponible, pour la détection de faibles nombres de *Salmonella* spp. Disponible sous la forme d'une spécification technique (TS) (ISO/TS 6579- 2[2]) datant de novembre 2012, elle s'applique aux produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, aux échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de produits alimentaires, aux matières fécales des animaux ; aux échantillons environnementaux au stade de la production primaire.

Cette TS décrit le dénombrement des salmonelles par une technique miniaturisée du nombre le plus probable.

Elle comprend 4 phases successives, soit un pré-enrichissement en milieu liquide non sélectif, un enrichissement en milieu semi-solide sélectif, un isolement sélectif et identification avant la phase finale de confirmation.

Il est ainsi possible de calculer le nombre le plus probable de *Salmonella* spp. par millilitre ou par gramme de l'échantillon pour essai. La limite de détection indiquée dans cette spécification technique pour la méthode sur MSRV miniaturisé est d'environ 1 UFC/g, mais elle peut fluctuer d'un sérovar de *Salmonella* à un autre et d'une matrice à une autre. Elle se révèle déconseillée pour le dénombrement des Salmonelles non mobiles.

[2] Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des Salmonella - Partie 2: Dénombrement par une technique miniaturisée du nombre le plus probable - ISO/TS 6579-2 édition 01/11/2012

ANALYSE EN ÉLEVAGE BOVIN

DEUX CAS DE FIGURE SONT À DIFFÉRENCIER :

- Suspicion clinique : avortement, diarrhée/septicémie, pneumonies…
- Recherche d'animaux porteurs ou excréteurs sans signes cliniques

Le diagnostic de laboratoire peut recourir à des méthodes directes (mise en évidence de la bactérie par culture bactérienne ou par amplification génique) ou indirectes (recherche des anticorps sur sérum ou lait).

Le choix d'une analyse dépendra du contexte, des commémoratifs et des prélèvements disponibles.

Précisions techniques : *Les analyses de mélange de prélèvements issus de plusieurs animaux ne présentent pas suffisamment de fiabilité pour être raisonnablement proposées. Elles sont à l'origine de baisse de sensibilité ou de défaut de détectabilité. Les mélanges de lait des 4 quartiers d'un même animal sont réalisés pour la recherche d'une excrétion mammaire.*

RECHERCHES SUR L'ANIMAL MALADE : CONTEXTE AVORTEMENT

- Recherche directe sur l'avorton : foie, rate, contenu stomacal.
- Recherche directe sur la vache avortée : cotylédon placentaire, mucus vaginal.

Prélèvements

Prélèvement		Méthode de prélèvement / Conditionnement	Intérêt / Limite
Produits de l'avortement (Ordre de préférence décroissant)	**Avorton**	Prélever le foie ou la rate ou le contenu stomacal de l'avorton Mettre le prélèvement dans un pot hermétique	Charge forte Doit être manipulé avec des protections
	Ecouvillon	Charger un écouvillon par frottement de la muqueuse : L'écouvillon doit être coloré et complétement imbibé Ecouvillon : Sec pour la PCR et/ou la culture ; Avec un milieu de transport uniquement pour la bactériologie	Plus facile à manipuler, un écouvillon sec doit être confié au laboratoire dans les 24 heures La présence d'un milieu de transport peut inhiber la PCR
	Placenta	Prélever un cotylédon placentaire si possible in utero dans un pot hermétique	Charge forte Doit être manipulé avec des protections
	Mucus vaginal	Prélever des mucosités vaginales post-avortement, environ 15 à 30 ml. Enfermez-le dans un récipient hermétique pour éviter le dessèchement	Utile en l'absence de placenta Peu de cellule dans ce prélèvement pour assurer un contrôle optimal en PCR
Autres	**Sang**	Prélever un tube de sang de 5 ml rempli	Conservation à température ambiante jusqu'à rétractation du caillot avant de réfrigérer
	Lait	Prélever 30 ml de lait dans un flacon stérile ou avec conservateur selon la recherche	Pas de conservateur pour la bactériologie

RECHERCHES SUR L'ANIMAL MALADE : CONTEXTE SEPTICÉMIES-DIARRHÉES-PNEUMONIES

- Recherche directe sur animal vivant : fèces.
- Recherche directe sur organes filtres ou lésés, prélevés lors de l'autopsie : foie, nœuds lymphatiques, poumon, encéphale…
  - Si l'animal a reçu une antibiothérapie préalablement au prélèvement, il faudra mettre en place une étape préliminaire de pré-enrichissement.
- En l'absence d'isolement direct, recherche indirecte possible sur la base d'une cinétique de séroconversion.

La vaccination interfère avec la sérologie.

Prélèvements

Prélèvement	Méthode de prélèvement / Conditionnement	Intérêt / Limite
Fèces	Enfermer 50 g dans un récipient hermétique	Souvent liquide lors d'épisode clinique, doit être prélevé en quantité suffisante
Organe filtre ou lésé	Prélever entier ou en partie (30 à 50 g) lors de l'autopsie et enfermer dans un récipient hermétique	L'état de lyse avancée d'un organe peut inhiber la PCR
Sang	Prélever 5ml de sang sur tube sec	Conservation à température ambiante jusqu'à rétractation du caillot avant de réfrigérer Ne pas congeler

RECHERCHES D'ANIMAUX PORTEURS / EXCRÉTEURS

La recherche d'animaux porteurs sains, potentiels excréteurs, est demandée suite à une alerte de la filière agro-alimentaire ou suite à un épisode clinique identifié.

Des recherches sur l'ensemble du troupeau et couplant différentes méthodes d'investigation (méthodes d'analyses, type de prélèvements) se heurtent rapidement à des limites économiques.

Transit passif : pas d'implantation dans le tube digestif, $<10^5$ UFC/g, dure quelques jours seulement : bactériologie fugacement positive dans les fèces, sérologie négative.

Portage actif : animaux sains ou convalescents qui excrètent une grande quantité de salmonelles $>10^5$ UFC/g, excrétion longue durée, non continue (faire 3 coprocultures à 15 jours) : bactériologie fortement positive et stable, sérologie positive après un délai non connu de séroconversion (persistance de la séropositivité de durée non connue).

Portage latent : multiplication et fixation dans les nœuds lymphatiques, pas d'excrétion fécale régulière (bactériologie négative), phases de réactivation suite à un stress (bactériologie positive).

Prélèvements

Prélèvement	Méthode de prélèvement / Conditionnement	Intérêt / Limite
Fèces	50 g enfermé dans un récipient hermétique	
Lait	30 ml de lait dans un flacon stérile ou avec conservateur selon la recherche	Pas de conservateur pour la bactériologie
Sang	Prélever 5 ml de sang sur tube sec	Conservation à température ambiante jusqu'à rétractation du caillot avant de réfrigérer Ne pas congeler

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-1

Recherche sur l'animal malade
Diagnostic direct chez les bovins par culture

OBJECTIF

Mise en évidence de la bactérie par culture bactérienne chez des bovins présentant des signes cliniques : avortement, diarrhée/septicémie, pneumonies…

Réglementation

Pas de réglementation à ce maillon.

MÉTHODOLOGIE

Norme

NF U47-102 Janvier 2008 : Méthodes d'analyse en santé animale - Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les mammifères.

Contexte

Méthode de 1ère intention.

Une antibiothérapie préalablement à la réalisation du prélèvement peut interférer avec la culture bactérienne.

Elle peut être levée par une étape préliminaire de pré-enrichissement.

Caractéristiques de l'échantillon

50 g de fèces dans un pot hermétique.

Foie ou rate ou contenu stomacal de l'avorton dans un pot hermétique.

Cotylédon placentaire dans un pot hermétique.

Organe filtre ou lésé (entier ou en partie) dans un pot hermétique.

Pool d'échantillons

Non prévu par la norme.

Condition de conservation

Conservation au froid positif (+5°C +/-3°C) inférieur à la semaine.

Prise d'essai

0,1 g ou 50 µl ou un écouvillon chargé.

Principe de la méthode

Une première phase d'enrichissement dans deux milieux sélectifs liquides suivie d'un isolement sur deux milieux sélectifs solides terminée par une identification du sérotype.

Récupération de souche

Oui.

Intérêts

Détection du sérovar de salmonelle.

Utilisation d'une méthode normée.

100% de Spécificité.

Limites

Détectabilité : Nécessite la présence de bactérie vivante.

Risque de contamination du prélèvement.

Délai d'analyse de 2 à 6 jours.

Il existe des alternatives. Ces méthodes (non validées) font appel à des milieux chromogènes et/ou des équipements analytiques utilisés en hygiène alimentaire dont la sensibilité et la spécificité ne sont pas établies pour les prélèvements de santé animale.

Remarque générale : Attention, il s'agit de diagnostics en Santé animale, de surcroît sur des animaux malades, rentrant donc dans le cadre règlementaire strict de l'exercice vétérinaire (de la réalisation du prélèvement, jusqu'à celle de l'analyse par un « laboratoire vétérinaire » selon une méthode validée).

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-2

Recherche sur l'animal malade
Diagnostic direct chez les bovins par PCR

OBJECTIF

Mise en évidence de la bactérie par culture bactérienne chez des bovins présentant des signes cliniques : avortement, diarrhée/septicémie, pneumonies…

Réglementation

Pas de réglementation à ce maillon.

MÉTHODOLOGIE

Norme

NF U47-600-1 Février 2015 : Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 1 : exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale.

Contexte

Méthode de 1ère intention.

Utilisable quel que soit le contexte.

Caractéristiques de l'échantillon

50 g de fèces dans un pot hermétique.

Cotylédon placentaire dans un pot hermétique.

Organe filtre ou lésé (entier ou en partie) dans un pot hermétique.

Foie ou rate ou contenu stomacal de l'avorton dans un pot hermétique.

Pool d'échantillons

Non prévu par la notice fournisseur.

Condition de conservation

< 8 jours : au froid positif (+ 5°C +/- 3°C).

> 8 jours : au froid négatif (- 20°C).

Prise d'essai

1 g ou 1 ml ou 1 écouvillon chargé.

Principe de la méthode

Extraction des ADN contenus dans l'échantillon puis recherche d'une partie du patrimoine génétique de la bactérie, détectée par amplification en temps réel.

Récupération de souche

Non.

Intérêts

Rapidité : analyse sur la journée.

Bonne détectabilité : Seuil de détection 5.10^4 équivalent génome par g ou 10^4 équivalent génome par écouvillon.

Limites

Détecte les bactéries mortes et/ou les contaminations.

Spécificité en relation directe avec la cible choisie.

Peu de laboratoires réalisent cette analyse.

Pas d'identification du sérovar.

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-3

Recherche d'animaux porteurs
Diagnostic direct chez les bovins par culture

OBJECTIF

Mise en évidence de la bactérie par culture bactérienne chez des bovins sans signes cliniques.

Réglementation

Pas de réglementation à ce maillon.

MÉTHODOLOGIE

Norme

NF U47-102 Janvier 2008 : Méthodes d'analyse en santé animale - Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les mammifères.

Contexte

Méthode de 1ère intention.

Recherche des animaux à risque.

Caractéristiques de l'échantillon

20 ml de lait dans un flacon avec conservateur. 50 g de fèces dans un pot hermétique – 3 fois à 15j/3 semaines d'intervalle.

Pool d'échantillons

Non prévus par la norme.

Condition de conservation

Conservation au froid positif (+5°C +/-3°C) quelques jours.

Prise d'essai

10 g ou 10 ml.

Principe de la méthode

Une phase de pré-enrichissement suivie d'une phase d'enrichissement dans 2 milieux sélectifs liquides suivie d'un isolement sur 2 milieux sélectifs solides terminée par une identification du sérotype.

Récupération de souche

Oui.

Intérêts

Détection du sérovar de salmonelle.

Utilisation d'une méthode normée.

100% de Spécificité.

Limites

Détectabilité : Nécessite la présence de bactérie vivante.

Délai d'analyse de 3 à 7 jours.

A répéter éventuellement : 5 traites de suite, par exemple (une extrême vigilance est attendue vis-à-vis de la contamination lors de la réalisation du prélèvement).

Il existe des alternatives. Ces méthodes font appel à des milieux chromogènes et/ou des équipements analytiques utilisés en hygiène alimentaire dont la sensibilité et la spécificité ne sont pas établies pour les prélèvements de santé animale.

Remarque générale : Attention, il s'agit de diagnostics en Santé animale, rentrant donc dans le cadre règlementaire strict de l'exercice vétérinaire (de la réalisation du prélèvement, jusqu'à celle de l'analyse par un « laboratoire vétérinaire » selon une méthode validée).

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-4

Recherche d'animaux porteurs
Diagnostic direct chez les bovins par PCR

OBJECTIF

Mise en évidence de la bactérie par amplification génique chez des bovins sans signes cliniques.

Réglementation

Pas de réglementation à ce maillon.

MÉTHODOLOGIE

Norme

NF U47-600-1 Février 2015 : Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 1 : exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale.

Contexte

Méthode de 1ère intention.

Utilisable quel que soit le contexte.

Caractéristiques de l'échantillon

20 ml de lait dans un flacon avec conservateur.

50 g de fécès dans un pot hermétique 3 fois à 15j/3 semaines d'intervalle.

Pool d'échantillons

Non prévus par la notice fournisseur.

Condition de conservation

< 8 jours : au froid positif (+ 5°C +/- 3°C).

> 8 jours : au froid négatif (- 20°C).

Prise d'essai

10 g ou 10 ml.

Principe de la méthode

Une phase de pré-enrichissement suivie d'une extraction des ADN contenus dans l'échantillon puis recherche d'une partie du patrimoine génétique de la bactérie, détectée par amplification en temps réel.

Récupération de souche

Non.

Intérêts

Délai analytique : analyse sur 2 jours.

Bonne détectabilité : Seuil de détection 5.10^4 équivalent génome par g après enrichissement.

Limites

Détecte les bactéries mortes et/ou les contaminations.

Spécificité en relation directe avec la cible du kit.

Pas d'identification du sérovar.

Peu de laboratoires réalisent cette analyse.

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-5

Recherche d'animaux porteurs d'Ac
Méthode indirecte chez les bovins par sérologie

Point important : un animal séropositif n'est pas forcément un animal « porteur »

OBJECTIF

Mise en évidence des anticorps dirigés contre les antigènes somatiques O : 1, 9, 12 de *Salmonella* du groupe D.

Réglementation

Pas de réglementation à ce maillon.

MÉTHODOLOGIE

Norme

NF U47-019 Février 2010 : Méthodes d'analyses en santé animale - Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA.

Contexte

Méthode de 1ère intention.

Ce test est utilisable sur lait de tank de bovins.

Caractéristiques de l'échantillon

10 ml de lait dans un flacon avec conservateur.

5 mL de sang sur tube sec.

Pool d'échantillons

Lait de tank ; Mélange de 10 sérums.

Condition de conservation

NF U47-020 Juillet 2001 : Méthodes d'analyse en santé animale - Guide de bonnes pratiques de traitement de l'échantillon soumis à des analyses immuno-sérologiques.

Principe de la méthode

ELISA indirect.

Récupération de souche

Non.

Intérêts

Mettre en évidence une séroconversion en l'absence d'isolement direct.

Economique : possibilité utilisation d'un échantillon collectif.

Rapide.

Pas de faux positif en cas de contamination.

Evaluation globale du troupeau : peut servir de screening avant de passer à la méthode individuelle.

Limites

A répéter éventuellement 15 jours/3 semaines plus tard.

Persistance variable et non connue des anticorps.

Interférence de la vaccination sur l'interprétation des résultats.

Difficultés d'interprétation

> Ce test peut croiser avec *S.* Enteritidis, *S.* Panama, *S.* Gallinarum mais aussi *S.* Typhimurim qui possède l'Ag O12.

Peu de laboratoires réalisent cette analyse.

Pas de discrimination du ou des individu(s) à risque.

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-6

Recherche d'animaux porteurs d'Ac
Méthode indirecte chez les bovins par immunolgie

Point important : un animal séropositif n'est pas forcément un animal « porteur »

OBJECTIF

Mise en évidence des anticorps dirigés contre l'antigène O : 9.

Réglementation

Pas de réglementation à ce maillon.

MÉTHODOLOGIE

Norme

NF U47-019 Février 2010 : Méthodes d'analyses en santé animale - Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA.

Contexte

Méthode de 1ère intention et/ou de confirmation.

Ce test est utilisable sur sérums individuels ou laits individuels de bovin, ovin, caprin.

Caractéristiques de l'échantillon

5 ml de sang dans un tube sec .

10 ml de lait dans un flacon avec conservateur.

Pool d'échantillons

Mélange de 10 sérums possible.

Mélange de 3 à 4 laits possible.

Condition de conservation

NF U47-020 Juillet 2001 : Méthodes d'analyse en santé animale - Guide de bonnes pratiques de traitement de l'échantillon soumis à des analyses immuno-sérologiques.

Principe de la méthode

ELISA de compétition.

Récupération de souche

Non.

Intérêts

Rapidité : analyse sur la journée.

Mettre en évidence une séroconversion en l'absence d'isolement direct.

Economique : cibler les analyses de diagnostic direct à entreprendre préférentiellement sur les animaux séropositifs.

Beaucoup plus spécifique de S. Dublin (croise seulement avec S. Gallinarum et S. Enteritidis).

Rapide.

Pas de faux positif en cas de contamination.

Limites

A répéter éventuellement 15 jours/3 semaines plus tard.

Persistance des anticorps variable et non connue.

Interférence de la vaccination sur l'interprétation des résultats.

Difficultés d'interprétation.

Le colostrum n'est pas utilisable.

Peu de laboratoires réalisent cette analyse.

ANALYSE EN ENVIRONNEMENT DE L'ÉLEVAGE

Dans le cadre des investigations suite à une détection de salmonelles en élevage, la recherche des salmonelles dans l'environnement de production vise à :

- Décrire les voies d'entrée et de circulation des salmonelles dans l'élevage.
- Identifier les facteurs de risque pour pouvoir proposer des actions correctives et préventives.

Les prélèvements suivants peuvent être conduits à la carte, selon les résultats d'un audit préliminaire.

Prélèvements

	Prélèvement	Conditionnement	Méthode de prélèvement
Effluents d'élevage	Lisier, fumier Préciser avant/après traitement	Un ou plusieurs pots à prélèvement stériles, fermés hermétiquement	Pots remplis (100 g par pot). Echantillonner un volume en plusieurs points (représentativité)
Eau	Réseau, puits, tonne/citerne	Bouteille/bidon stérile ou bouteille d'eau minérale neuve, vidée juste avant prélèvement, avec thiosulfate si l'eau est chlorée	Prélever 5 L (pour filtration) Protocole pour prélèvement aseptique (flamber ou désinfecter le robinet)
	Abreuvoir, mare	Flacon stérile, avec thiosulfate si l'eau est chlorée	100 ml (si petits volumes), à multiplier si besoin pour une meilleure représentativité
Aliment	Ensilage	Sachet plastique scellé	Environ 100 g Echantillonner un volume en plusieurs points (représentativité)
	Aliment sec (foin, farine et concentrés)		
Matériel et salle de traite	Filtre à lait	Sac ou pot de 180ml stérile	Filtre
	Eau de lavettes	Flacon stérile	Pot rempli (100 ml par pot)
Mamelles ou trayons	Chiffonnettes	Sachet, chiffonnette pré-imprégnée avec ou sans milieu nutritif, avec ou sans neutralisant de désinfectant.	Sur plusieurs vaches
Environnement	Chiffonnettes ou pédi-chiffonnettes	Sachet, chiffonnette pré-imprégnée avec ou sans milieu nutritif, avec ou sans neutralisant de désinfectant.	Sur la litière, les quais de traite, les cornadis…. Protocole défini
Nuisibles	Traces, cadavres		Non représentatif

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-7

Environnement de l'élevage

Diagnostic direct dans l'environnement par culture

OBJECTIF

Mise en évidence de la bactérie par culture bactérienne dans l'environnement des bovins.

Réglementation

Pas de réglementation à ce maillon.

MÉTHODOLOGIE

Norme

F U47-100 Juillet 2007 : Méthodes d'analyse en santé animale - Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales.

Norme NF EN ISO 6579 : Méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des salmonelles dans l'alimentation animale.

Contexte

Méthode de 1ère intention.

Environnement des productions animales lors d'épisode clinique ou de recherche d'animaux porteurs.

Caractéristiques de l'échantillon

Tous les prélèvements cités dans le tableau précédent sauf l'eau.

Pool d'échantillons

Non prévus par la norme.

Condition de conservation

Conservation au froid positif (+5°C +/-3°C) quelques jours.

Prise d'essai

Variable selon la nature du prélèvement.

Principe de la méthode

Une phase de pré-enrichissement suivie d'une phase d'enrichissement dans 2 milieux sélectifs liquides suivie d'un isolement sur 2 milieux sélectifs solides terminée par une identification du sérotype.

Récupération de souche

Oui.

Intérêts

Détection du sérotype de salmonelle.

Utilisation d'une méthode normée.

100% de Spécificité.

Limites

Détectabilité : Nécessite la présence de bactérie vivante.

Délai d'analyse de 3 à 7 jours.

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-8

Environnement de l'élevage

Diagnostic direct dans l'environnement par PCR

OBJECTIF

Mise en évidence de la bactérie par amplification génique dans l'environnement des bovins.

Réglementation

Pas de réglementation à ce maillon.

MÉTHODOLOGIE

Norme

Pas de norme.

Contexte

Méthode de 1ère intention.

Utilisable quel que soit le contexte.

Caractéristiques de l'échantillon

Lisier, fumier.

Aliment.

Chiffonnette.

Rejets (tout effluent).

Eau de rinçage des lavettes.

Pool d'échantillons

Non prévus par la notice fournisseur.

Condition de conservation

Quelques jours au froid positif (+ 5°C +/- 3°C).

Prise d'essai

Variable selon la nature du prélèvement.

Principe de la méthode

Une phase de pré-enrichissement suivie d'une extraction des ADN contenus dans l'échantillon puis recherche d'une partie du patrimoine génétique de la bactérie, détectée par amplification en temps réel.

Récupération de souche

Non.

Intérêts

Délai analytique : analyse sur 2 jours.

Bonne détectabilité.

Limites

Spécificité en relation directe avec la cible du kit.

Peu de laboratoires réalisent cette analyse.

ANALYSE EN HYGIÈNE ALIMENTAIRE

RECHERCHES SUR LE LAIT ET LE FROMAGE EN COURS DE FABRICATION OU PRODUIT FINI

La recherche des salmonelles peut être menée sur la matière première, le lait cru, et sur les produits transformés (caillés, fromages à divers stades d'affinage, produits finis).

Au niveau réglementaire (CE 2073/2005), seule la recherche au stade « produit fini » est obligatoire pour le metteur en marché.

Les analyses sur matière première et/ou produits transformés à un stade plus précoce que celui de la libération de lots ont pour objectif de :

- De détecter précocement une contamination de la chaine de fabrication.
- Déterminer l'origine ou les origines de la contamination (dans le cas des laits individuels des fermes laitières alimentant la transformation).

RECHERCHES SUR L'ENVIRONNEMENT DE PRODUCTION

Des analyses peuvent être également menées dans l'environnement de l'atelier de fabrication (poussières, surfaces, eaux stagnantes…) pour détecter d'éventuelles disséminations de la bactérie et mettre en œuvre les mesures de réactivité adaptées.

Prélèvements

Les prélèvements doivent être menés en condition aseptique, au moyen de matériel stérile, à usage unique* et conditionnés dans un pot/flacon (un contenant) stérile et fermés hermétiquement.

Dans le cas de matière première ou de matière première transformée, ce sont en général 25 g de prise d'essai** qui sont mis en analyse individuelle.

Les analyses de mélange de plusieurs échantillons (effet pooling) sont à l'origine de baisse de sensibilité ou de défaut de détectabilité. Cette façon de procéder est décrite dans la fiche sur le regroupement d'échantillons. L'impact du plan d'échantillonnage sur la probabilité de détection peut être simulé en utilisant des méthodes de type AQR (Norme NF ISO 28590, décembre 2017) (cf. échantillonnage).

A titre normatif, une méthode d'échantillonnage ou une technique de prélèvement recommandée est donnée dans :

- XP CEN ISO/TS 17728 pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux.
- NF EN ISO 707 pour le lait et les produits laitiers.
- NF EN ISO 13307 pour l'échantillonnage au stade de la production primaire.
- NF ISO 18593 pour l'échantillonnage des surfaces.

Le tableau ci-dessous illustre quelques exemples de prélèvements types et n'est en aucun cas exhaustif.

Prélèvement		Méthode de prélèvement / Conditionnement	Intérêt / Limite
Echantillons de l'environnement	**Poussières**	Prélever sur un support de filtre adéquat, sur filtre permettant de retenir les bactéries (membrane 0.22 m)	Difficulté de calibrer *à priori* le volume d'air à filtrer Conservation du filtre à sec limité à 24 h
	Lingette	Délimiter la surface à prélever. Frotter vigoureusement avec la lingette (porter des gants à usage unique), puis transférer la lingette dans un sac stérile. Utilisable à sec ou en étant pré-imbibée (préférable) – dans ce cas, la pré-imbiber avec eau peptonnée tamponnée stérile ou tout autre diluant neutre	Vérifier la présence de salmonelle sur une surface non totalement décontaminée *Salmonella* spp. peu décrite comme apte à faire des biofilms Utilisable pour des prélèvements sur les mains des opérateurs
	Ecouvillon	Frotter vigoureusement l'écouvillon sur la surface à prélever Utilisable à sec ou en étant pré-imbibé (préférable) – dans ce cas, le pré-imbiber avec eau peptonée tamponnée stérile ou tout autre diluant neutre	Permet d'échantillonner des surfaces peu accessibles (joints, coins…). Un écouvillon sec doit être confié au laboratoire dans les 24 heures. Conservé au froid positif
	Lait	50 ml de lait dans un flacon stérile, fermé hermétiquement	Conservé au froid positif (+5°C ±3°C), quelques jours Pas de conservateur pour la bactériologie
Echantillon alimentaire	**Caillé**	50 g dans un flacon ou poche stérile, fermé hermétiquement	Conservé au froid positif(+5°C ±3°C), quelques jours
	Fromage	50 g dans un sac de prélèvement stérile	Conservé au froid positif (+5°C ±3°C), quelques jours

* usage unique : lors de la réalisation de différentes prises d'essai sur un même lot (ex n= 5 échantillons), il est essentiel de désinfecter ou renouveler le matériel de prélèvement entre chaque prise d'essai (pour éviter d'éventuelles contaminations croisées).

** Dans le cas de prises d'essai de taille supérieure, il est nécessaire de respecter le rapport entre « prise d'essai » et solution d'enrichissement. Il est également conseillé de préchauffer le bouillon d'enrichissement avant ajout de la prise d'essai.

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-9

Recherche en hygiène alimentaire

Diagnostic direct dans un échantillon par culture

OBJECTIF

Mise en évidence de la bactérie par culture bactérienne dans un échantillon alimentaire.

Réglementation

Réglementation sur produits mis sur le marché pendant sa durée de conservation (CE 2073/2005).

MÉTHODOLOGIE

Norme

NF EN ISO 6579 (avril 2017) : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella.*
Partie 1 : Recherche des *Salmonella* spp.

Contexte

Lait.

Caillé.

Fromage affiné.

Caractéristiques de l'échantillon

Lisier, fumier.

Aliment.

Chiffonnette.

Rejets (tout effluent).

Eau de rinçage des lavettes.

Pool d'échantillons

Non prévus par la norme.

Condition de conservation

Conservation au froid positif (+5°C ±3°C) quelques jours.

Prise d'essai

Variable selon la nature du prélèvement.

Principe de la méthode

4 phases successives :

- phase de pré-enrichissement en milieu liquide non sélectif.
- phase d'enrichissement dans 2 milieux sélectifs liquides.
- isolement sur 2 milieux sélectifs solides.
- confirmation par essais biochimiques et sérologiques.

Récupération de souche

Oui.

Intérêts

Détection du sérotype de salmonelle.

Utilisation d'une méthode normée.

100% de Spécificité.

Limites

Détectabilité : Nécessite la présence de bactérie vivante.
Délai d'analyse de 3 à 7 jours.

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-10

Recherche en hygiène alimentaire

Diagnostic direct dans l'environnement alimentaire

OBJECTIF

Mise en évidence de la bactérie par culture bactérienne dans un échantillon d'environnement.

Réglementation

Réglementation sur produits mis sur le marché pendant sa durée de conservation (CE 2073/2005).

MÉTHODOLOGIE

Norme

NF EN ISO 6579 (avril 2017) : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella*.
Partie 1 : Recherche des *Salmonella* spp.

Contexte

Méthode de 1ère intention.

Échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de denrées alimentaires.

Échantillons au stade de la production primaire, tels que des matières fécales, de la poussière ou des prélèvements de surface.

Caractéristiques de l'échantillon

Ecouvillons de surface (matériel de collecte, de transformation).

Ecouvillons de surface (mains du personnel).

Pool d'échantillons

Non prévus par la norme.

Condition de conservation

Conservation au froid positif (+5°C +/-3°C) quelques jours.

Prise d'essai

Variable selon la nature du prélèvement.

Principe de la méthode

4 phases successives :

- phase de pré-enrichissement en milieu liquide non sélectif.
- phase d'enrichissement dans 2 milieux sélectifs liquides.
- isolement sur 2 milieux sélectifs solides (1 seul milieu pour les échantillons au stade de la production primaire).
- confirmation par essais biochimiques et sérologiques.

Récupération de souche

Oui.

Intérêts

Détection du sérotype de salmonelle.

Utilisation d'une méthode normée.

100% de Spécificité.

Limites

Détectabilité : Nécessite la présence de bactérie vivante.

Délai d'analyse de 3 à 7 jours.

Remarque générale : La méthode est aussi utilisable sur les matières fécales.

MÉTHODE ANALYTIQUE

A-11

Recherche en hygiène alimentaire
Diagnostic direct dans un échantillon par PCR

OBJECTIF

Mise en évidence de la bactérie par amplification génique dans un échantillon alimentaire.

Réglementation

Réglementation sur produits mis sur le marché pendant sa durée de conservation (CE 2073/2005).

MÉTHODOLOGIE

Norme

Pas de norme.

Contexte

Méthode de 1ère intention.

Utilisable quel que soit le contexte.

Caractéristiques de l'échantillon

Lait.

Caillé.

Fromage affiné.

Pool d'échantillons

Non prévus par la notice fournisseur.

Condition de conservation

Quelques jours au froid positif (+ 5°C +/- 3°C).

Principe de la méthode

Une phase de pré-enrichissement suivie d'une extraction des ADN contenus dans l'échantillon puis recherche d'une partie du patrimoine génétique de la bactérie, détectée par amplification en temps réel.

Récupération de souche

Non.

Intérêts

Délai analytique : analyse sur une journée après enrichissement.

Existence de nombreux kits PCR alternatifs validés AFNOR*.

Bonne détectabilité (informations des différents kits disponible le cas échéant dans le rapport de validation du kit).

Limites

Détecte les bactéries mortes et/ou les contaminations.

Spécificité en relation directe avec la cible du kit .

Pas d'identification du sérovar.

Nécessité de confirmation de la souche.

* liste disponible sur le site NF Validation (adresse : https://nf-validation.afnor.org/domaine-agroalimentaire/salmonella/)

DROITS PHOTOS : ADOBESTOCK / P. BOURGAULT / CNIEL