



ANALYSES DE LABORATOIRE

Cette fiche présente des réflexions des techniciens expérimentés sur la bonne utilisation des analyses de laboratoire, puis elle apporte des indications sur les précautions à prendre en termes d'identification et de transport des échantillons, sur le choix d'un laboratoire... Des éléments techniques sur les principales méthodes d'analyse sont aussi présentés, avant de détailler les méthodes utilisées pour la détection et le dénombrement des 4 pathogènes. La lecture de cette fiche est recommandée avant de lire les démarches d'intervention germe par germe.

I. Quelques réflexions sur les analyses de laboratoire...

1. Ce qu'il faut savoir pour une utilisation adaptée de l'outil d'analyse

Le choix et le nombre des analyses doit être raisonné : elles doivent être adaptées en fonction des premiers éléments de diagnostic disponibles. Il est inutile d'en faire trop : elles n'apporteraient pas d'information pertinente et représenteraient un coût disproportionné pour l'éleveur. Il est important d'anticiper l'ensemble des résultats possibles des analyses pour construire son plan d'analyses. Cela nécessite de vérifier que chaque résultat obtenu (quel qu'il soit) apporte un élément clé pour faire progresser la démarche de résolution du problème posé.

Le (ou les) résultat(s) d'analyses sont le reflet d'une situation à un temps t, qui peut être l'image d'une dérive progressive de la conduite d'élevage, du processus technologique, ou être au contraire l'image d'un événement ponctuel. Selon les germes, l'intermittence des contaminations ou de l'excrétion et l'hétérogénéité de la distribution du pathogène dans l'environnement rendent particulièrement importantes les modalités de prélèvements et d'échantillonnage (voir fiche « **PRELEVEMENTS : CHOIX ET METHODES** »).

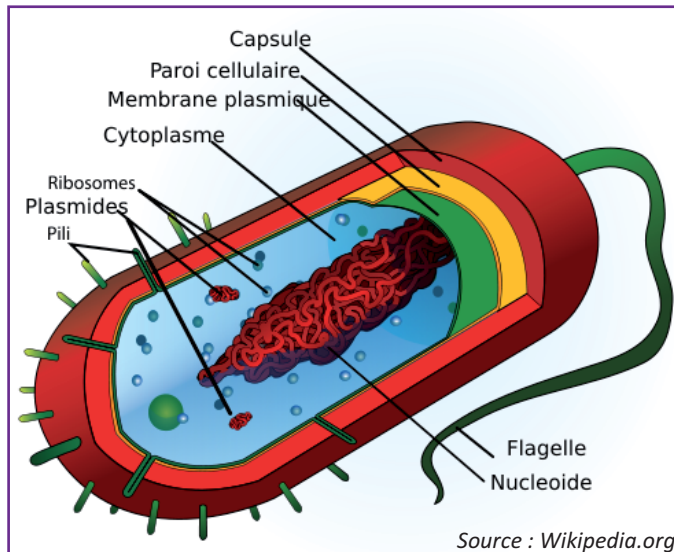
2. Quelques rappels

2-1. Rappels sur l'interprétation des résultats d'analyses :

- l'analyse n'est qu'une photo. Il est donc important de se référer à l'historique des analyses lorsqu'il existe, et dans une démarche préventive et/ou après résolution de l'événement sanitaire, d'apprendre à valoriser les analyses réalisées,
- le résultat de l'analyse ne reflète que l'état de contamination ou non de l'échantillon prélevé ce jour là. Quand l'analyse a pour résultat une présence, on peut, en principe, être sûr du résultat, mais dans un certain nombre de cas, si l'analyse est négative ou considérée comme satisfaisante, on ne peut pas conclure à l'absence du germe,
- toute analyse présente des limites d'interprétation également imputables à la technique elle-même (seuils de détection, sensibilité, spécificité, modalités d'expression des résultats). A titre d'illustration, selon le type d'analyse on peut obtenir des résultats inférieurs à un seuil de détection (<10 UFC/ml par exemple), ce qui ne signifie pas forcément qu'il y a absence du germe.

2-2. Rappels sur les méthodes d'analyse :

Les méthodes de recherche et de dénombrements des germes, ainsi que celles de recherche des toxines des staphylocoques à coagulase positive ont beaucoup évolué au cours de ces dernières années, notamment car elles sont mieux adaptées aux différentes matrices (lait, fromage, selon l'espèce).



Les méthodes d'analyses qui vont être mises en œuvre doivent être des méthodes officielles ou des méthodes normalisées par l'AFNOR (voir § III) :

- c'est le cas dans les laboratoires qui réalisent habituellement des analyses officielles,
- sinon, essayer de travailler avec un laboratoire accrédité et vérifier que les méthodes d'analyses répondent aux exigences souhaitées.

Rappel supplémentaire : l'éleveur est propriétaire de ses résultats.

2-3. La logistique :

Les aspects logistiques sont importants à prendre en compte et nécessitent des échanges avec les laboratoires :

Planification des analyses et transmission des résultats :

- savoir quelles analyses le laboratoire peut faire, à la fois en ce qui concerne les analyses de tel ou tel germe, mais surtout si on envisage de faire des prélèvements de fèces, d'eau ou dans l'environnement : tous les laboratoires ne peuvent pas traiter tous les types de substrats,
- savoir si le laboratoire fait des analyses le week-end ou juste des lectures. S'ils ne font pas d'analyses, ce ne sera pas la peine de leur apporter des prélèvements le vendredi en fin de journée... De même savoir si les analyses peuvent être lancées le jour même de la réception de l'échantillon, ce qui peut faire gagner du temps,
- négocier la transmission des premières lectures des analyses à 24h (suspicion, analyses négatives...), par téléphone ou par mail, notamment si ces résultats ne sont connus que pendant un week-end.
- **et bien sûr... AVANT de lancer des prélèvements, s'assurer que le laboratoire pourra les traiter, sinon vous les aurez faits pour rien.**

Matériel de prélèvement et gestion des échantillons :

- évaluer la possibilité de récupérer des flacons de prélèvement, éventuellement auprès du laboratoire...

- s'entendre avec le laboratoire sur les codages des prélèvements, les modalités de regroupement et de conservation des échantillons en prévision par exemple d'analyses ultérieures, les possibilités de stockage par le laboratoire lui-même.

Interprétation des résultats :

- En matière de dénombrements, il est important de connaître les seuils de dénombrement inférieurs et supérieurs (dilutions) utilisés de manière à pouvoir interpréter les résultats de manière critique.

Il est toujours préférable de créer des habitudes de fonctionnement avec les laboratoires et de connaître leurs contraintes **AVANT** que des problèmes ne surviennent. Dans certaines structures, et si les producteurs l'acceptent, il est possible de signer un contrat avec le producteur pour que le technicien puisse disposer des résultats des analyses en même temps que lui (voir inconvénients dans fiche « **PREPARATION DE LA VISITE** »).

II. Le choix du laboratoire

1. Généralités

Le choix du laboratoire va dépendre du « contexte » des analyses : contrôles officiels ou auto-contrôle. En cas d'auto-contrôle, deux niveaux de réflexion sont à prendre en compte :

- choix du laboratoire lui-même, qui peut être soit agréé (c'est-à-dire agréé par le Ministère) soit accrédité,
- choix des analyses, qui peuvent être mises en place selon les méthodes dites « officielles » ou alors selon des méthodes dites « alternatives », dont l'équivalence avec les méthodes officielles a été validée. Le plus souvent le choix de telle ou telle méthode d'analyse est de l'initiative du laboratoire.

Les Laboratoires Nationaux de Référence (LNR), spécialisés dans un ou plusieurs domaines de compétences, assurent la mise au point et la diffusion de méthodes, la formation technique des laboratoires de terrain, l'organisation d'essais inter-laboratoires, la diffusion de réactifs certifiés, la confirmation de résultats, etc... Les LNR interviennent également sur d'autres aspects (analyse de confirmation de la présence d'entérotoxine, par exemple).

1-1. Laboratoires et analyses dans le cadre de contrôles officiels :

Ce sont des analyses réalisées à l'initiative des services vétérinaires, qui en assument le coût financier.

D'une façon générale les analyses réalisées dans le cadre de contrôles officiels sont réalisées par des **laboratoires agréés** conformément aux méthodes officielles publiées au Bulletin Officiel du Ministère chargé de l'agriculture. Il s'agit, à titre principal, des Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD). Toutefois, le Ministre chargé de l'agriculture peut autoriser un laboratoire agréé à utiliser d'autres méthodes sous réserve que la preuve soit apportée de leur équivalence avec les méthodes officielles. La liste des laboratoires agréés pour la réalisation des analyses officielles est disponible sur le site du Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche, à partir du lien suivant :

<http://agriculture.gouv.fr/sections/thematiques/alimentation/securete-sanitaire/surveillance-controles-alertes/listes-laboratoires>

1-2. Laboratoire et analyses dans le cadre d'autocontrôles (ou d'intervention chez le producteur) :

Ce sont des analyses réalisées à l'initiative du producteur qui en assume le coût financier. Dans le cadre des autocontrôles, les producteurs peuvent les faire réaliser soit dans un laboratoire agréé (cf. paragraphe ci-dessus), par exemple leur laboratoire vétérinaire départemental, soit dans un autre laboratoire. Si le producteur à recours

à un autre laboratoire, il sera préférable, afin de s'assurer de la qualité des analyses réalisées, de choisir un **laboratoire accrédité** COFRAC pour les analyses microbiologiques des produits agroalimentaires. L'accréditation est obtenue pour un domaine ou une compétence, et non pas pour une entreprise dans son intégralité ni pour une durée indéterminée. Lorsque l'on fera appel à ce type de laboratoire, il faudra donc vérifier que l'accréditation leur a bien été renouvelée. La liste des laboratoires accrédités COFRAC pour les analyses microbiologiques des produits agroalimentaires est disponible à partir du lien suivant :

<http://www.cofrac.fr/fr/recherche/getentites.mpi>

1-3. Les méthodes d'analyses :

Comme cela a été dit précédemment deux types de méthodes d'analyses peuvent être mises en œuvre :

- méthodes officielles : ce sont des méthodes dites de « référence » et sont certifiées ISO, c'est-à-dire reconnues et utilisées au niveau international,

- méthodes alternatives certifiées AFNOR. Cette certification, qui a une portée nationale, est la preuve objective que le produit ou le service acheté ou fourni dispose des caractéristiques définies dans une norme ou un référentiel, et qu'il fait régulièrement l'objet de contrôles.

EN BREF, veiller :

- à ce que le laboratoire qui prendra en charge les analyses soit agréé ou accrédité,
- à ce que les analyses qu'il propose soient réalisées par des méthodes officielles ou des méthodes alternatives validées AFNOR,
- et dans tous les cas vérifier que ce laboratoire possède globalement une expertise sur les germes recherchés et les produits laitiers.

Attention également car tous les laboratoires ne possèdent pas les compétences nécessaires pour analyser certaines matrices particulières (eaux, fèces et effluents...).

III. Identification, stockage et acheminement des échantillons

1. Identification des échantillons

C'est une étape primordiale des prélèvements. Le code adopté doit être clair et non équivoque pour les techniciens qui effectuent et analysent les prélèvements. Le mieux est de s'être aussi assuré auprès du laboratoire que le code lui convient et qu'il sera effectivement repris dans le rendu des résultats.

Codage possible :

- nom de l'exploitation et n°EDE (cela permet une double vérification),
- type de prélèvement en abrégé le cas échéant (chiffonnette (CHI)...), abréviation à communiquer au laboratoire),
- ou type de substrat prélevé en abrégé (lait (LA), caillé (CA), fèces (FE)...), abréviation à communiquer au laboratoire),
- le cas échéant, numéro d'ordre, ou numéro de l'animal, et code quartiers,
- date.

Il est recommandé pour le technicien de faire un relevé des échantillons prélevés un jour donné dans une exploitation. Une feuille de compte-rendu des prélèvements est proposée à la fin de la fiche « **PRELEVEMENTS** ». Une copie de ce document sera jointe aux échantillons pour le laboratoire. Veillez à conserver l'original pour vous y référer si nécessaire.

De plus, il faudra être vigilant à ce que les inscriptions portées sur les flacons ou sachets de prélèvement ne puissent pas s'effacer. Il est conseillé d'utiliser un marqueur indélébile résistant au froid et à l'humidité (voir fournisseurs de matériel de laboratoire), et d'écrire le code de l'échantillon si possible à 2 endroits différents (couvercle du pot et côté du pot par exemple). L'utilisation

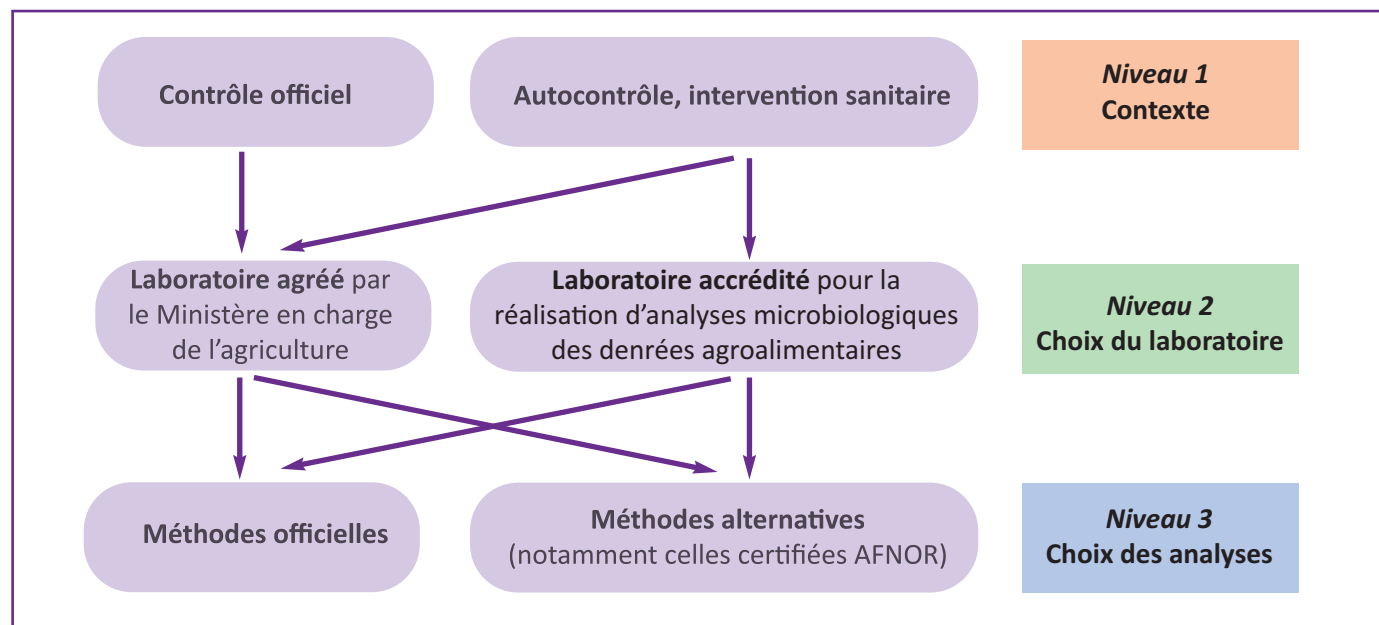


Figure 1 : Schéma récapitulatif des types de laboratoires et analyses pouvant être mis en œuvre

d'étiquettes peut être pratique mais seulement si ce sont des modèles résistants à l'eau, sinon ces dernières risquent de se décoller durant le transport, ou de s'effacer si le milieu est humide.

2. Stockage et acheminement des échantillons

Le temps de stockage et d'acheminement des échantillons vers le laboratoire doit toujours être le plus court possible. Les échantillons doivent être maintenus à une température comprise entre 0 et +4°C (norme FIL 50B : 1985).

Plusieurs solutions s'offrent aux techniciens :

- utilisation d'une glacière avec des plaques réfrigérantes (placées au congélateur au moins 24h à l'avance) ou d'une glacière qui fonctionne sur l'allume cigare,
- si le transport est long et/ou que l'on est en période estivale, on peut prévoir de mettre les échantillons dans de la glace pilée.

Attention :

Il est conseillé de placer un thermomètre dans la glacière afin de contrôler sa température. Normalement le laboratoire prend la température lors de la réception des échantillons.

Eviter la congélation des échantillons lors du transport car elle peut détruire les germes présents dans le prélèvement.

Certains laboratoires vont conserver les échantillons **plusieurs jours au froid, d'autres vont les congeler. Le technicien devra donc définir les choses au préalable avec son laboratoire** et demander à ce que les échantillons ne soient pas congelés.

IV. Méthodes d'analyses mises en œuvre

1. Analyses bactériologiques : recherche ou dénombrement ?

La recherche d'un microorganisme consiste à déterminer la présence ou l'absence de ce dernier dans une masse ou un volume défini de produit.

Le dénombrement est la détermination du nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) de la bactérie recherchée, dans une quantité déterminée de produit. Pour certains pathogènes la mise en œuvre d'un dénombrement n'est pas toujours possible (ni nécessaire). Si la recherche d'un microorganisme met en évidence sa présence dans l'échantillon, il est parfois envisageable de demander ensuite un dénombrement afin de quantifier la

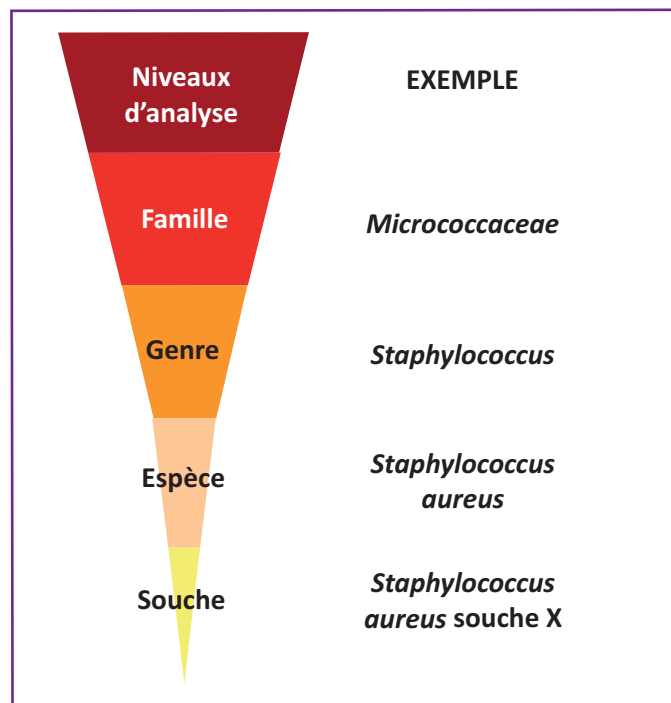


Figure 1 : Niveaux d'analyse de laboratoire possibles en lien avec la taxonomie des germes, exemple des staphylococcus aureus

population présente. En effet, la plupart des laboratoires conservent les échantillons plusieurs jours au frigo au moins le temps d'obtenir les premiers résultats.

1-1. Les niveaux d'information obtenus grâce aux analyses :

Les méthodes de dénombrements sur milieux sélectifs vont généralement donner une information sur la famille et au mieux sur le genre en présence ; néanmoins dans certains cas la méthode pourra permettre d'aller jusqu'à l'espèce (exemple : dénombrement de *Listeria monocytogenes* sur milieu Aloa®). Le niveau « espèce » ou « genre » peut être insuffisant en fonction de la problématique rencontrée. En effet, la détermination de l'espèce (par exemple *monocytogenes* chez *Listeria spp*) peut être indispensable. Cela nécessite la mise en œuvre de tests plus poussés comme des tests phénotypiques (exemple : galerie API...), immuno-enzymatiques ou de biologie moléculaire. Enfin, lorsque les circonstances le nécessitent (identifier la source de contamination d'un produit laitier par exemple) il faut pousser l'analyse jusqu'à la souche si possible techniquement et financièrement. Cette recherche reste exceptionnelle (cas de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) par exemple).

Jusqu'à ces dernières décennies, la recherche et le dénombrement de microorganismes pathogènes passaient essentiellement par leur culture sur milieux sélectifs, le plus souvent dans des boîtes de Pétri. Les méthodes de référence pour les 4 germes étudiés ici sont d'ailleurs basées sur l'utilisation de tels milieux, que ce soit dans le cadre des méthodes officielles ou des méthodes alternatives.

1-2. Les techniques de dénombrements sur gélose :

Les analyses sur milieux de culture se font dans certains cas après une phase d'enrichissement : les échantillons sont mélangés à un milieu de culture liquide plus ou moins sélectif placé à la température optimale de croissance de la bactérie recherchée. Puis quelques gouttes de cette

solution sont utilisées pour ensemer une boîte de Pétri contenant le milieu sélectif souhaité, qui est ensuite mis à incuber. L'analyse effectuée à la suite d'un enrichissement ne peut donner qu'un résultat de type présence/absence et ne permet pas un dénombrement. Cet enrichissement peut s'avérer nécessaire pour certains pathogènes, présents le plus souvent en faible quantité et de façon aléatoire dans les échantillons, comme les Salmonelles.



Figure 2 : Exemple de colonies entourées d'un halo opaque, caractéristiques des staphylocoques à coagulase positive sur milieu Baird-Parker, supplémenté au plasma de lapin + fibrinogène (BP+RPF) (Source : Actilait)

Toutefois, de nombreuses autres techniques ont été testées et un certain nombre validées afin d'obtenir des résultats plus rapidement que par les méthodes conventionnelles, c'est ce que l'on nomme les méthodes alternatives. Elles sont également validées AFNOR ce qui garantit leur équivalence avec les méthodes de référence. Elles sont basées sur des réactions immuno-enzymatiques, ou bien conduites à l'aide d'outils de biologie moléculaire.

1-3. Les méthodes de détection immunologique :

La détection immunologique (exemples du Vidas, de l'Immuno-Magnetic Separation (IMS), ou séparation immuno-magnétique en français) consiste à utiliser des anticorps spécifiques des antigènes portés par les cellules. Dans cette catégorie, l'ELISA (acronyme de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, c'est-à-dire dosage immunoenzymatique sur support solide) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique. Dans la technique de dosage dite « en sandwich », les puits d'une microplaque sont tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché. Lors de cette opération appelée *coating*, l'anticorps de capture se fixe au plastique des puits par interaction électrostatique. La

spécificité du test dépend de l'anticorps de capture employé. La solution à tester est ensuite déposée dans les puits de la microplaque et si l'antigène recherché est présent il va se lier spécifiquement à l'anticorps de capture. Un deuxième anticorps, l'anticorps traceur, capable de se lier à l'antigène capturé est alors ajouté dans les puits et les anticorps traceurs non fixés sont éliminés par rinçage. L'anticorps traceur est couplé à une enzyme dont l'action entraîne la formation d'un produit coloré. La réaction peut ainsi être quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène puisque le nombre de molécules d'anticorps traceurs fixées dépend du nombre de molécules d'antigènes immobilisées par l'anticorps de capture.

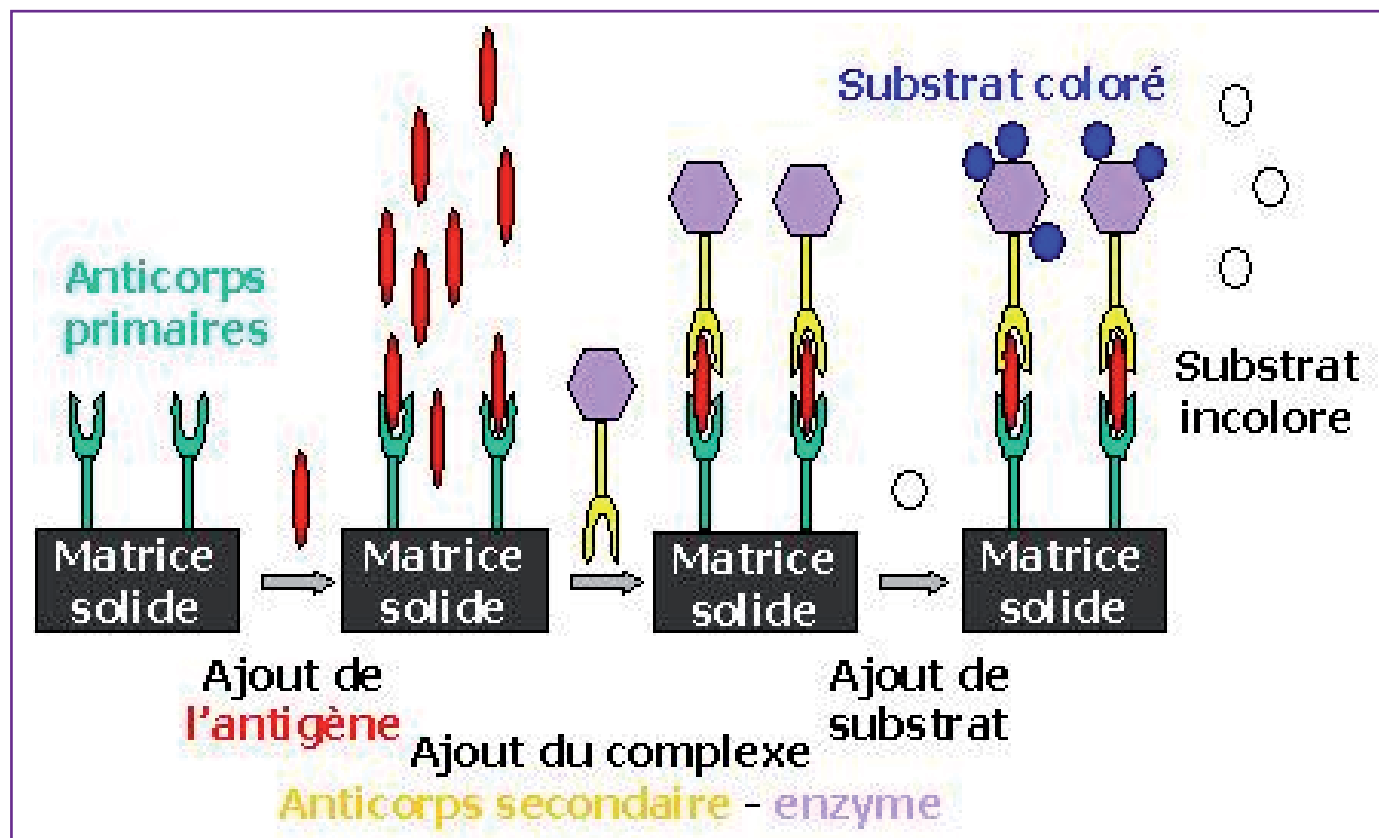


Figure 3 : Schéma de principe de l'ELISA (source : <http://www.doping.chuv.ch/lad-elisa.jpg>)

1-4. Les méthodes de biologie moléculaire :

Les techniques de biologie moléculaire s'avèrent plus pertinentes et beaucoup plus rapides pour l'identification au niveau de l'espèce. Les outils de biologie moléculaire sont devenus des moyens performants de plus en plus utilisés dans le diagnostic spécifique et même intra-spécifique des organismes. Ils reposent sur la connaissance du génome des organismes recherchés. Chaque organisme possède en effet dans son génome des enchaînements de nucléotides dans un ordre précis. Parmi les techniques de biologie moléculaire, on peut citer la PCR (Polymerase Chain Reaction ou en français Réaction en Chaîne par Polymérase) et l'hybridation moléculaire.

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction en Chaîne par Polymérase) :

PCR est l'abréviation de l'expression anglaise *Polymerase Chain Reaction*. À partir d'un échantillon complexe et en faible quantité, cette technique permet d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN. Elle permet par exemple de détecter des gènes spécifiques de *Staphylococcus aureus* dans de l'ADN extrait d'aliments contaminés. La PCR peut permettre de déterminer si les gènes de l'espèce bactérienne recherchée sont présents et selon la technique employée de la quantifier (PCR quantitative).

L'hybridation moléculaire :

Les microorganismes peuvent être identifiés au moyen de sondes qui vont s'hybrider (se fixer) spécifiquement avec un fragment d'ADN, signature du microorganisme. Selon la spécificité de la sonde, il sera possible d'identifier le microorganisme au niveau famille, genre ou espèce.

Ces méthodes donnent le plus souvent qu'une réponse du type présence/absence mais elles sont très sensibles. De plus les méthodes basées sur la recherche d'un ou plusieurs gènes de la bactérie ne permettent pas d'affirmer que la bactérie présente dans l'échantillon est vivante. Une réponse positive devra toujours être

confirmée par un isolement de la bactérie avec recours indispensable aux méthodes « traditionnelles ».

1-5. Le sérotypage :

Il est parfois nécessaire d'identifier les souches voire de les caractériser pour apprécier leur pouvoir pathogène. Le sérotypage consiste à différencier les souches de microorganismes en fonction de leur composition antigénique (sérotype ou sérovar) grâce à une technique sérologique (qui utilise des anticorps). La recherche est basée sur la mise en évidence d'une réaction spécifique entre un anticorps présent dans un sérum test et un antigène porté par le microorganisme étudié. Cette

réaction est visualisée par une agglutination qui est le résultat macroscopique de la réaction antigène-anticorps.

2. Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (SCP) et recherche des toxines

2-1. Généralités :

Trois espèces appartenant aux staphylocoques à coagulase positive sont importantes en pathologie humaine et animale : *S. aureus* (deux sous-espèces), *S. intermedius* et *S. hyicus*. Trois autres espèces sont plus rarement isolées : *S. delphini*, *S. schleiferi subsp. coagulans* et *S. pseudintermedius*.

Tableau I : Méthodes officielles et alternatives, laboratoire national de référence pour les analyses des staphylocoques à coagulase positive

	Méthodes officielles		Méthodes alternatives (notamment celles certifiées AFNOR)	Laboratoire national de référence
	Méthodes d'analyse de référence (règlement n° 2073/2005)	Méthodes d'analyses normalisées autorisées		
Dénombrement des SCP	NF EN ISO 6888-1 ou NF EN ISO 6888-2	ou NF V08-057-1	Rapid'Staph	Anses, Maisons-Alfort
Recherche des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers	Méthodes européennes du Laboratoire Communautaire de référence (LCR) pour les staphylocoques à coagulase positive, reprises dans la note de service DGAL/SDSSA/SDPPS/N2009-8136			

Remarque : l'AFSSA est devenue l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail)

Plan d'échantillonnage pour le dénombrement des SCP, la recherche de 1ère intention et la confirmation :

Les quantités d'échantillons nécessaires pour chaque étape sont les suivantes :

- **10 g** pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive.
- **25 g** pour la **recherche de 1^{ère} intention** des entérotoxines ; le laboratoire en demande toujours davantage : de ce fait, prévoir 50 g.
- **50 g** pour la confirmation par le Laboratoire de Référence (Anses Maisons-Alfort) d'un éventuel résultat positif à l'analyse de 1^{ère} intention.

Le LNR demande également au laboratoire ayant réalisé l'analyse de 1^{ère} intention, de lui fournir 5 isolats issus des dénombrements et repiqués sur une gélose de conservation. Cela permet au LNR, lorsqu'en cas de présence de toxine, de vérifier que les souches de SCP dénombrées dans l'échantillon sont bien productrices de la toxine retrouvée.

En conséquence : prévoir un minimum de 110 g pour chaque unité composant l'échantillon.

La recherche des toxines des staphylocoques à coagulase positive :

Les laboratoires lancent les analyses de SCP. En parallèle les échantillons de fromages analysés sont parfois congelés. S'il y a dépassement en SCP ($\geq 100\ 000$) la recherche de toxine est lancée soit dans le même laboratoire s'il a cette compétence, soit dans un autre laboratoire. Le fromage peut donc ainsi rester congelé de 48 h (temps de réponse de l'analyse) à plusieurs jours (si le résultat arrive la veille d'un week-end par exemple) avant que la recherche de toxine ne soit réalisée. Toutefois, les entérotoxines étant résistantes à la congélation, cette étape n'a pas d'effet sur la fiabilité du résultat ultérieur.

Les notes de service de la DGAL (DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8136 du 12 mai 2009 et DGAL/SDSSA/SDPPST/N2010-8138, du 11 mai 2010)

proposent plusieurs méthodes pour les analyses d'entérotoxines (A à E) de staphylocoques à coagulase positive dans les produits laitiers.

Les Vidas SET2 ou le Ridascreen SET Total sont indiqués dans le cadre des **contrôles officiels**. Dans le cadre des **autocontrôles** le recours à deux autres méthodes (Transia Plate SE et Set RPLA) est également possible mais **non conseillé**, ces méthodes ayant présenté un certain nombre de limites.

Les méthodes actuelles permettent de rechercher les toxines A à E.

Si la recherche de toxine ressort positive, le laboratoire demande au producteur (par fax ou accord oral) de donner l'autorisation de procéder à une confirmation (car le coût de la confirmation est à la charge du producteur). L'échantillon est alors expédié à l'Anses de Maisons-Alfort, qui est le laboratoire communautaire de référence. Dans le cas d'un autocontrôle, si la recherche en 1^{ère} intention s'avère positive, la demande de confirmation doit être faite par l'éleveur. C'est à lui de décider si oui ou non il fait confirmer le résultat par l'Anses. Dans le cadre d'un contrôle officiel, ce sont bien sûr les services sanitaires qui prennent cette décision.

Le délai de réponse pour la confirmation est de 1 semaine.

Prix indicatif d'une recherche de toxine en laboratoire départemental ou autre : entre 45 et 80 euros HT environ
Prix indicatif de la confirmation par l'Anses : environ 300 euros (source : Anses, Maison-Alfort)

Confirmation de la présence des entérotoxines et interprétation des résultats discordants :

Le principe des méthodes mises en œuvre par le laboratoire de référence pour la confirmation est le même que celui des techniques employées pour le dosage des toxines (Notes de service de la DGAL DGAL/N 2009-8136

du 12/05/09 et DGAL/SDSSA/SDPPST/N2010-8138, du 11 mai 2010.) Il s'en distingue toutefois par le recours à des anticorps spécifiques qui permettent de dire précisément quelle toxine est retrouvée et de la quantifier. Ces méthodes demandent l'achat de consommables onéreux et beaucoup de temps de travail, ce qui explique le coût élevé de la confirmation.

Les notes de service de la DGAL citées ci-dessus attirent l'attention des laboratoires sur des interférences possibles. En effet, des réactions non spécifiques peuvent parfois être observées lors de la détection des entérotoxines dans certaines matrices alimentaires. Certaines protéines par exemple la protéine A peuvent interférer. D'autres interférences peuvent être liées à la présence, dans le lait cru, d'enzymes endogènes comme la lactopéroxydase ou la phosphatase alcaline. Lorsque des échantillons retrouvés positif en 1^{ère} intention arrivent au LNR et que des interactions avec des enzymes endogènes sont suspectées, des protocoles visant à inactiver ces enzymes sont mis en œuvre et le dosage de toxines refait. Si le résultat sort négatif suite à cette inactivation il s'agit donc d'un cas de faux positif.

L'amélioration constante de ces méthodes permet aujourd'hui de ne quasiment plus retrouver de cas de faux-positifs. Les faux-positifs sont les cas pour lesquels la présence de toxine a été détectée lors de l'analyse de 1^{ère} intention et n'a pas été détectée lors de l'analyse de confirmation par le LNR.

Dans la majorité des cas, lorsque des problèmes de faux-positifs sont rencontrés, ils sont liés à des interférences entre la méthode Vidas Set 2 et la phosphatase alcaline contenue dans les laits crus d'ovins. Un kit R bio pharm peut alors être utilisé dans le cadre des auto-contrôles (voir note de service de la DGAL : Recherche des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE dans les produits laitiers du 12 mai 2009).

3. Recherche et dénombrement de *Listeria monocytogenes*

3-1. Généralités :

Le genre *Listeria* comprend 6 espèces dont seule l'espèce *monocytogenes* est pathogène pour l'homme. Le genre *Listeria* sans distinction de l'espèce est aussi nommé *Listeria spp.* Les analyses réalisées sur les produits alimentaires sont ciblées sur la recherche de *L. monocytogenes*. Toutefois, la recherche de *Listeria spp.* peut parfois s'avérer utile car elle est indicatrice d'un défaut d'hygiène, et peut indirectement faire suspecter une présence potentielle de *L. monocytogenes*. Dans la méthode de référence, les premiers résultats obtenus au bout de 4 jours permettent de dire si les bactéries retrouvées sont bien des *Listeria spp.*, mais il faut ensuite attendre les résultats des tests de confirmation de l'espèce *monocytogenes*.

A la fin des années 80, la recherche de *L. monocytogenes* nécessitait 2 à 3 semaines, alors qu'aujourd'hui elle est réalisée en 4 à 7 jours avec les méthodes de référence (NF EN ISO 11290-1 pour la recherche, et la NF EN ISO 11290-2 pour le dénombrement), et en 2 jours avec les méthodes alternatives rapides (Rapid'L mono, Vidas LMO, Aloa One Day...) qui pour la plupart ont été validées par l'AFNOR.

L'isolement et l'identification de *L. monocytogenes* dans les aliments, l'environnement ou les prélèvements vétérinaires nécessitent l'utilisation d'agents sélectifs et de procédures d'enrichissement de façon à limiter la croissance des micro-organismes contaminants et à faciliter ainsi la multiplication de *L. monocytogenes* de manière à en assurer la détection.

La quantité d'échantillon nécessaire selon les méthodes est de 30 à 50 g. Comme toujours, penser à se renseigner auprès de son laboratoire.

3-2. Recherche de *Listeria monocytogenes* : Méthode de référence (NF EN ISO 11290-1)

Dans la méthode de référence, la recherche de *L. monocytogenes* nécessite 4 étapes successives permettant d'obtenir confirmation de sa présence (ou non) en 5 jours :

- 1- Enrichissement primaire en milieu semi sélectif (24h)
- 2- Enrichissement secondaire en milieu sélectif (48h)
- 3- Isolement et identification (sur gélose Oxford ou PALCAM) (24 à 48h) = confirmation *Listeria spp.*
- 4- Confirmation (24 à 48h) = confirmation ou non de l'espèce *monocytogenes*

Les 2 étapes d'enrichissement ont pour objectif de permettre la revivification des cellules de *Listeria* stressées.

L'isolement sur milieu de culture permet de visualiser la présence de colonies considérées comme caractéristiques de *Listeria*.

Enfin, la dernière étape consiste à repiquer des colonies que l'on présume être des *Listeria* et à confirmer (ou non), via des tests biochimiques et morphologiques appropriés, leur appartenance à l'espèce *monocytogenes*.

Avec la méthode de référence, les résultats de présence de *Listeria spp* ne sont obtenus qu'au bout de 4 jours minimum. La confirmation de l'espèce *monocytogenes* demande 1j supplémentaire au minimum.

Devant la longueur de ces temps de réponses, différentes méthodes alternatives, plus rapides, ont été développées.

Méthodes alternatives :

Milieux de culture sélectifs spécifiques (cf. tableau ci-contre) :

Avec ces milieux on peut obtenir une réponse sous 2 jours. Les colonies de *Listeria monocytogenes* présentent un aspect typique sur le milieu gélosé. Sur ces colonies typiques une confirmation est ensuite réalisée (24h supplémentaires).

Tableau 2 : Méthodes officielles et alternatives, laboratoire national de référence pour les analyses des staphylocoques à coagulase positive

	Méthodes officielles	Méthodes alternatives (notamment celles certifiées AFNOR)	Laboratoire national de référence
	Méthodes d'analyse de référence (règlement n° 2073/2005)		
Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i> (alimentation humaine et environnement)	NF EN ISO 11290-1	Transia Plate <i>Listeria monocytogenes</i> Listeria Précis™ Rapid L'Mono, Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> , OAA, ALOA One day...	Anses, Maisons-Alfort
Dénombrement de <i>Listeria monocytogenes</i> (alimentation humaine et environnement)	NF EN ISO 11290-2	Listeria Précis™ Rapid L'Mono, OAA, ALOA one day...	

Attention : les limites sont les mêmes pour tous ces milieux de culture : *L. ivanovii* ainsi que certains *Bacillus* peuvent aussi donner des colonies caractéristiques. Seule la confirmation permet donc de trancher.

Tests immuno-enzymatiques :

Ces tests mettent en œuvre la technique Elisa, basée sur la détection dans le produit d'anticorps spécifiques de l'espèce bactérienne recherchée. Ces méthodes ont l'avantage d'être sensibles et spécifiques. Elles sont mises en œuvre avec l'appareil automatisé VIDAS®. L'ordinateur compare les valeurs (traduites par une intensité de fluorescence) à des standards et un rapport d'analyse positif ou négatif est produit. Les 1ers résultats sur *Listeria* spp sont obtenus en 50 heures. Cette méthode nécessite aussi ensuite une étape de confirmation. Un nouveau kit vient d'être mis sur le marché par Biomérieux (VIDAS *Listeria monocytogenes* Xpress). Il permet la détection d'antigènes de *Listeria monocytogenes* en 28h. Cette méthode est appropriée aux produits d'origine alimentaire autant qu'aux prélèvements effectués dans l'environnement. Attention toutefois, car le recours, lors des prélèvements, à des substrats de type coton ou cellulose (filtres à lait, chiffonnettes....) peut induire des résultats faux positifs : l'utilisation de sacs stomachers avec filtres peut limiter ce genre de problèmes.

Méthodes basées sur la reconnaissance des acides nucléiques :

Ces méthodes de détection se sont développées ces dernières années. Elles sont basées soit sur de l'hybridation soit sur de la PCR. Cette dernière présente une meilleure sensibilité par rapport aux méthodes par hybridation.

La PCR :

Les kits commerciaux ont facilité l'utilisation des tests PCR en routine. Les résultats sont donc généralement obtenus en moins de 24h. D'autre part, des méthodes PCR semi quantitatives ont été développées et elles permettent

d'estimer le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon.

L'hybridation moléculaire :

La phase d'enrichissement dure de 20 à 22h et la phase d'hybridation 2 heures. La réponse est donc obtenue en 24 heures.

Le développement de nouvelles méthodes basées sur des techniques de cultures sur gélose, tests immuno-enzymatiques ou de biologie moléculaire permettent donc actuellement d'obtenir des résultats (sans confirmation) sur la présence ou non de *Listeria* en 24 à 48 heures selon les méthodes. Les étapes de confirmation ultérieures restent indispensables pour pouvoir incriminer ou non *L. monocytogenes*.

Si un sérotypage est souhaité afin par exemple de tracer la souche de l'élevage jusque-là l'aliment, les isolats peuvent être envoyés au laboratoire de référence.

3-3. Dénombrement (NF EN ISO 11290-2) :

Lorsque l'on souhaite réaliser un dénombrement, on ne procède pas aux étapes d'enrichissement, mais l'échantillon (et ses dilutions) est mis en culture directement sur boîtes de Petri. Si l'échantillon est suspecté comme étant très contaminé les dilutions sont indispensables afin de pouvoir comptabiliser les bactéries. En 24 à 48 heures, les *Listeria* spp sont dénombrées puis la présence de l'espèce *monocytogenes* confirmée au bout de 24 h supplémentaires. D'autre part, lorsque la présence de *Listeria monocytogenes* est détectée par le laboratoire, on peut demander la réalisation d'un dénombrement afin de quantifier le niveau de contamination du produit.

3-4. Sérotypage :

Les souches de *Listeria monocytogenes* se différencient en 13 sérotypes différents basés sur la combinaison de leurs antigènes somatiques (O) et flagellaires (H). Bien que tous soient considérés comme potentiellement pathogènes, la

plupart des isolats cliniques (>95 %) appartiennent à 4 sérotypes seulement, 1/2a, 1/2b, 1/2c et 4b.

3 méthodes proposées par le laboratoire de référence :

- la séroagglutination permet de déterminer quel est le sérotype de la souche analysée parmi les 13 sérotypes existants. Le coût est d'environ 30 euros par souche.
- le sérotypage moléculaire, réalisé par PCR, est moins précis. Il permet de dire si la souche appartient à un des 4 sérotypes majeurs de *Listeria monocytogenes*, mais pas aux autres. En revanche il est moins cher : environ 10 euros par souche.
- enfin, la technique par électrophorèse en champs pulsés est la plus précise. Elle permet d'obtenir le profil moléculaire de la souche et peut donc par exemple permettre de déterminer si une souche issue de l'environnement est la même que celle isolée de l'aliment. Le coût de cette analyse est d'environ 45euros/souche. Pour ces 3 analyses il faudra compter entre 1 semaine à 10 jours de délai de réponse.

4. Recherche des Salmonella

4-1. Généralités :

Comme toutes les *Enterobacteriaceae*, les *Salmonella* possèdent des antigènes somatiques O (situé dans la paroi). Il en existe 67, on distingue l'antigène O majeur caractérisant un groupe de *Salmonella* et l'antigène O mineur qui est accessoire. La délétion par mutation de l'antigène O entraîne une perte partielle ou totale du pouvoir pathogène. Les *Salmonella* possèdent également des antigènes flagellaires H.

Le sérotypage des salmonelles a pour objectif d'obtenir la formule antigénique qui désigne un sérotype (ou sérovar) seul moyen d'individualiser une variété donnée de Salmonelles. Cela présente un intérêt épidémiologique pour la filiation des cas de gastro-entérites alimentaires par exemple.

D'après les travaux récents de taxonomie en particulier par hybridation de l'ADN, le genre *Salmonella* comporte deux espèces, dont seule la principale, *Salmonella enterica*, peut concerner les produits alimentaires. Cette dernière comprend plus de deux-mille sous-espèces ou sérotypes — dont la plus fréquente est *Salmonella enterica Enterica* — elles-mêmes divisées en de nombreux sérotypes (Enteritidis, Derby, Hadar, Infantis, Paratyphi, Typhimurium, Virchow, etc.).

La plupart des sérotypes ont un large spectre d'hôtes. Habituellement, les sérotypes à large spectre d'hôtes provoquent des gastro-entérites, qui, dans la plupart des cas, ne s'accompagnent d'aucune complication et ne nécessitent pas de traitement. Elles peuvent cependant être graves chez les jeunes, les personnes âgées et les malades dont l'immunité est diminuée.

Comme pour les *Listeria*, différentes méthodes basées soit sur la culture en milieux gélosés soit sur des réactions immuno-enzymatiques.

4-2. Méthode de référence pour la recherche des salmonelles :

Pour les aliments et les échantillons d'environnement (hors élevage) :

La recherche de *Salmonella* nécessite 4 phases successives. En effet, les *Salmonella* peuvent être présentes en petit nombre dans certains échantillons et associées à un nombre beaucoup plus grand d'autres microorganismes appartenant à la famille des Entérobactéries ou à d'autres familles. En conséquence un enrichissement sélectif est nécessaire et peut être précédé d'un pré-enrichissement en vue de mettre en évidence des bactéries en nombre restreint ou ayant subi une altération.

- 1- Pré enrichissement en milieu non sélectif pendant 18h
- 2- Enrichissement en milieux sélectifs liquides pendant 24h
- 3- Isolement et identification sur milieux gélosés pendant 24h

4- Confirmation de l'identification des colonies présumées de *Salmonella* 48h.

Pour les matières fécales des animaux et dans des échantillons environnementaux au stade de la production primaire, les étapes réalisées et les temps de réponse associés sont les mêmes.

La méthode de référence permet d'obtenir des résultats au minimum en 3 jours et confirmation 2 jours plus tard. La confirmation peut être faite par sérologie afin de déterminer le sérotype en présence.

4-3. Méthodes alternatives :

Afin d'obtenir des résultats plus rapides, différents tests basés sur des réactions immuno-enzymatiques de type Elisa existent sur le marché. Cette méthode Elisa permet d'obtenir un screening négatif dans un délai de 22h. La phase d'enrichissement nécessite entre 16h et 20h et le test Elisa entre 5h30 et 6h. Parmi ces méthodes, le test VIDAS permet la détection automatisée par immunofluorescence enzymatique de salmonelles mobiles et non-mobiles. L'efficacité du système repose sur l'affinité et la spécificité de ses anticorps pour les antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) de *Salmonella*. La méthode Vidas est applicable aussi bien aux denrées alimentaires qu'aux échantillons de matières fécales ou d'origine environnementale, avec cependant un risque de faux positifs avec des échantillons en coton, cellulose... (filtres à lait, chiffonnettes...), qui semble pouvoir être limités par l'utilisation de sac stomacher avec filtres.

Une méthode de type Elisa peut permettre de réaliser des analyses pour recherche individuelle d'excrétion mammaire de salmonelles chez une vache (contact : Lilano, St Lô dans la Manche ou LDA, Poligny, dans le Jura).

Les méthodes de dénombrement de *Salmonella* sont en cours de mise au point. A ce jour il n'existe donc aucune méthode encore validée et utilisable par les laboratoires d'analyses de routine.

Tableau 3 : Méthodes officielles et alternatives, laboratoire national de référence pour les analyses des salmonelles

	Méthodes officielles	Méthodes alternatives (notamment celles certifiées AFNOR)	Laboratoire national de référence
	Méthodes d'analyse de référence (règlement n° 2073/2005)		
Recherche de <i>Salmonella spp</i> (alimentation humaine et environnement SAUF environnement d'élevage)	NF EN ISO 6579	Transia Plate Salmonella Gold, Salmonella Precis™, Salmonella rapid test, Vidas Salmonella, SMS..	Anses, Ploufragan et Maisons-Alfort
Recherche de <i>Salmonella spp</i> dans les matières fécales des animaux et dans des échantillons environnementaux au stade de la production primaire	NF EN ISO 6579/A1		

Tableau 4 : Avantages et inconvénients d'une méthode de recherche de Salmonelle basée sur une technique Elisa

Méthode	Avantage	Inconvénient
Utilisation d'un antigène bactérien inactivé pour détecter des anticorps contre salmonelle dans le lait individuel des animaux.	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement non aseptique • Moins cher que de la microbiologie « classique » • Anticorps présents même si bactérie absente (excrétion intermittente) : on ne peut pas passer à côté 	<ul style="list-style-type: none"> • Savoir quel sérotype on recherche (doit déjà avoir été isolé dans l'élevage), • N'existe pas en petits ruminants à ce jour. • Risque de faux positifs (pas gênant), • Reconfirmer avec bactério si plusieurs animaux positifs ou si résultats douteux

4-4. Sérotypage :

Lorsque la présence de Salmonelle est détectée dans un échantillon, une première confirmation sérologique est faite au laboratoire, puis les souches considérées comme étant des *Salmonella* sont envoyées de façon systématique au Laboratoire de référence en vue d'une détermination définitive du sérotype. Le client à l'initiative de la demande de recherche de Salmonelles, peut demander le résultat du sérotypage à son laboratoire. Le sérotypage ne lui est pas facturé car il s'agit d'un accord conclu entre le laboratoire et le LNR. Le résultat est obtenu sous 2 à 3 semaines.

5. Dénombrement des *Escherichia coli*

5-1. Généralités :

Escherichia coli est considéré comme un hôte normal de la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces animales. A ce titre il est recherché dans les aliments comme indicateur de contamination fécale. *Escherichia coli* est un genre bactérien dans lequel on ne retrouve qu'une seule espèce ; mais il existe plus de 1.000 types antigéniques. Ces sérotypes sont définis selon leurs antigènes somatiques O (171), capsulaires K (80) et flagellaires H (56). La question de la recherche des STEC est développée au point 5.3.

5-2. Dénombrements des *E.coli* :

Le dénombrement des *E.coli* est basé sur la mise en culture de l'échantillon sur un milieu sélectif. Outre la méthode de référence, des méthodes dites rapides sont utilisées par les laboratoires, qui permettent d'avoir un premier résultat de dénombrement à 24h confirmé ensuite par une lecture à 48h.

Il est important de s'enquérir des seuils de détection employés par le laboratoire en particulier si l'échantillon est du lait :

- seuil inférieur (demander <10 *E. coli*/ml)
- seuil supérieur (> 10 000 *E. coli*/ml au minimum).

5-3. Recherche et dénombrement des STEC :

Les souches dites STEC (Shiga-toxin-Producing *E. coli*, le terme VTEC pouvant aussi les désigner) sont toutes les souches de *Escherichia coli* ayant les gènes *stx* codant les shiga-like toxines ou vérotoxines. Ces dernières peuvent être responsables de conséquences graves voire mortelles.

Les STEC n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sur un milieu particulier, à l'exception de O157:H7. Les méthodes validées et/ou disponibles dans des laboratoires de routine concernent essentiellement ce sérotype. Des progrès rapides devraient être faits dans les années à venir pour la recherche des O26, qui semblent concerner plus particulièrement les produits laitiers en France.

La recherche des STEC nécessite d'avoir recours à la PCR ou à des méthodes immuno-enzymatiques de type IMS par exemple. Les méthodes de PCR reposent sur la recherche de gènes codant pour des facteurs de virulence particuliers, comme *stx* codant pour la production de toxines... Les méthodes immuno-enzymatiques reposent sur la recherche d'antigènes caractéristiques. Ces analyses doivent être confirmées par l'isolement et la caractérisation des souches présentes dans l'échantillon. De plus la définition des souches STEC dangereuses est difficile. En France, un avis de l'Anses du 15 juillet 2008,

Tableau 5 : Méthodes officielles et alternatives, laboratoire national de référence pour les analyses des *Escherichia coli*

	Méthodes officielles	Méthodes alternatives (notamment celles certifiées AFNOR)	Laboratoire national de référence
	Méthodes d'analyse de référence (règlement n° 2073/2005)		
Dénombrement des <i>E.coli</i> bêta-glucuronidase positive (alimentation humaine)	NF EN ISO 16649-2	Gélose COLI-ID, REBECCA™ BASE	ENV-UMAP Lyon
Recherche des <i>E.coli</i> O157 (aliments dont lait cru)	NF EN ISO 16654	BAX® E.COLI0157:H7 MP	ENV-UMAP Lyon

complété par un avis de l'AFSSA du 27 mai 2010 et un avis de l'Anses du 11 janvier 2011, défini comme dangereuses les souches de 5 sérotypes porteuses de certains gènes de virulence. Des méthodes de dénombrement de ces bactéries font l'objet de travaux de recherche mais ne sont pas disponibles en routine.



TABLE DES ABREVIATION

L'ISO : **Organisation internationale de normalisation** ; elle élabore des normes internationales sur des sujets très variés.

AFNOR : **Agence Française de Normalisation** ; elle est un des membres de l'ISO ; elle certifie notamment un certain nombre de méthodes d'analyses. Dans le domaine de la microbiologie alimentaire, plus de 80 méthodes alternatives bénéficient de la marque AFNOR VALIDATION.

Certification : action par laquelle un organisme compétent et indépendant reconnaît qu'une entité respecte les exigences d'un référentiel de façon efficace.

Ce dossier a été piloté par l'Institut de l'Élevage et réalisé avec le soutien financier de FranceAgriMer et de la région Rhône-Alpes

Ce guide a été rédigé par : Sabrina Raynaud (Institut de l'Élevage), Julie Barral (Actilait Centre de Carnejeane), Sylvie Morge (PEP caprins Rhône-Alpes), à partir de la capitalisation de l'expérience de techniciens de terrain : Jean-Marie Ducret (Centre Technique des Fromages Comtois), Marie-Annick Dye (Chambre d'Agriculture de l'Isère), Jean-François Guittard (Syndicat du Saint Nectaire), Emilie Gillet (Association des Vendeurs Directs de Produits Laitiers de Haute-Normandie), Maxime Marois (Groupement de Défense Sanitaire des Alpes de Haute-Provence), Bruno Mathieu (Syndicat Interprofessionnel du Reblochon), Jacky Mège (Association des Éleveurs Transhumants des Trois Vallées), Pascal Picant (Groupement de Défense Sanitaire du Calvados), Jean-Charles Ray (Etablissement Régional de l'Élevage d'Ile-de-France), Violaine Salaün (Interprofession lait de brebis des Pyrénées Atlantiques), Laurent Thomas (Groupement de Défense Sanitaire du Rhône)

Relecture : Guillemette Allut (Languedoc Roussillon Elevage / Centre Fromager de Bourgogne), Aline Bazin (Centre Technique des Fromages Comtois), Emilien Fatet (Actilait Centre de Carnejeane), Yves Lefrileux (Institut de l'Élevage), Laëtitia Rossignol (Centre Fromager de Bourgogne), Marie Vandewalle (Association Régionale des Vendeurs Directs Nord Pas de Calais)

Référents techniques : Renée de Crémoux et Philippe Roussel (Institut de l'Élevage), Jean-François Combes (ENILV Aurillac), Valérie Michel (Actilait), Jean-Luc Simon (Groupements de Défense Sanitaire de Rhône-Alpes)

Responsables professionnels : Marc Lesty et Frédéric Blanchard (FNEC)

Mise en page : Isabelle Guigue – Réf. : 00 11 38 014

Crédit photos : Institut de l'Élevage, Violaine Salaün, Bruno Mathieu, Actilait, Jean-Luc Simon, Laurent Thomas, PEP Caprins Rhône-Alpes, Jacky Mège, Marie Vandewalle, Charlotte Geyl



Association des Vendeurs Directs
de Produits Laitiers de Haute-Normandie



Interprofession
Lait de brebis
Pyrénées
Atlantiques



AVEC LE SOUTIEN
FINANCIER DE :



FranceAgriMer

Rhône-Alpes Région

BIBLIOGRAPHIE

La liste des méthodes alternatives validées AFNOR présentées dans les parties suivantes, pour chaque germe, n'est pas exhaustive. La liste complète est disponible sur le site de l'AFNOR à partir du lien suivant : <http://www.afnor-validation.org/pdf/liste-methodes-validees-titulaires.pdf>

AFSSA, 2003. Bilan des connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC). Rapport, 220 pages. (téléchargeable sur le site de l'Anses, ex-AFSSA, ainsi que des fiches sur les STEC).

Notes de service DGAL/N 2009-8136 du 12/05/09 et DGAL/SDSSA/SDPPST/N2010-8138, du 11 mai 2010.

Le Loir Y. et Gautier M., Staphylococcus aureus, éditions Tec et Doc., 2009

Corbière Morot-Bizot S., 2006. Les staphylococques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons- Mémoire de thèse- Université Blaise Pascal.

Hennekinne J.A., 2009. Nouvelles approches pour la caractérisation des Toxi Infections Alimentaires à staphylocoques à coagulase positive. Thèse soutenue le 8 juillet 2009. Agro Paris Tech.

Sites internet de la DGAL, Anses, AFNOR, ISO et COFRAC.

Nous remercions les personnes qui ont répondu à nos questions et nous ont fourni des informations : J. Hennekinne (Anses), E. Maucci (Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières de Haute-Savoie), Michèle Dietrich (Actilait), laboratoires vétérinaires départementaux de l'Isère et des Hautes-Alpes.