

Évaluation d'une méthode de quantification des bactéries viables de *Listeria* après désinfection

Financeurs :
Inaporc, FAM

Contact :
bastien.fremaux@ifip.asso.fr

Valorisation

- Rapport de fin d'étude
- Formation IFIP N&D

Contexte et objectifs

Le nettoyage et la désinfection (N&D) des installations en agroalimentaire est une procédure fondamentale pour garantir la qualité et la sécurité sanitaire des aliments. La validation de l'efficacité des opérations de N&D repose le plus souvent sur un contrôle visuel de l'état de propreté des surfaces et sur la mise en œuvre d'analyses microbiologiques classiques basées sur des méthodes culturelles.



Il est aujourd'hui connu que certains stress, tels que l'exposition aux désinfectants, peuvent conduire à l'apparition de bactéries viables non cultivables (VNC), non détectées dans les procédures de contrôle actuelles. Leur présence non contrôlée sur les surfaces d'ateliers peut être problématique en cas de transfert à l'aliment en contact, où elles pourront se revivifier et se multiplier.

Ce programme visait (1) au développement et à la mise en œuvre au laboratoire d'une méthode de PMA-PCRq pour la quantification des formes viables de *L. monocytogenes*, (2) à évaluer la PMA-PCRq pour la quantification des formes viables (dont les non cultivables) de *L. monocytogenes* adhérentes en biofilm sur deux types de surface (acier inoxydable et PET) suite à l'exposition à 3 produits désinfectants largement employés dans l'industrie charcutière et plus généralement dans l'agroalimentaire : un alcalin chloré, une formulation à base d'ammonium quaternaire et de glutaraldéhyde et une formulation à base d'acide peracétique.

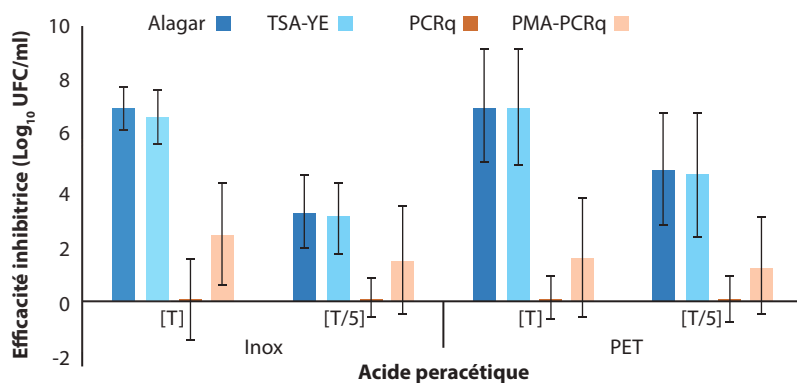
Résultats

La méthode développée dans cette étude présentait une inclusivité de 100% vis-à-vis de *L. monocytogenes* et une exclusivité acceptable de 94%. Suivant les conditions du protocole utilisé, elle permettait une quantification fiable jusqu'à un nombre de copies d'ADN théorique de 3,3 Log₁₀ copies d'ADN/mL. Les essais ont montré qu'un traitement des échantillons à l'aide de 50 μM de PMA suivi de 15 min d'obs-

curité et de 15 min de photoactivation à la lumière LED (60 W) à une intensité de 100% (barème recommandé par la fabricant) permettait d'inhiber de manière efficace l'amplification en PCRq de cellules mortes (inactivées thermiquement). Ce barème de photoactivation n'avait aucun impact significatif sur le signal d'amplification en PCRq obtenu pour les cellules viables de *L. monocytogenes*. La fiabilité de la méthode a été vérifiée à partir de ratios de cellules mortes/viables à partir desquels il a été montré que l'utilisation du PMA à 50 μM permettait, en présence de 106 UFC/ml de cellules mortes de *L. monocytogenes*, une quantification fiable jusqu'à 103 UFC/ml de cellules viables de *L. monocytogenes*, et ce, quelle que soit la souche testée. Les résultats obtenus à partir de biofilms de *L. monocytogenes* traités à l'acide peracétique à 1,5% (concentration recommandée par la fabricant) ont permis de quantifier des formes viables non cultivables (en comparaison aux résultats de dénombrement obtenus sur TSA-YE) équivalentes à 4,3 et 5,5 Log₁₀ copies d'ADN/ml pour les supports inox et PET, respectivement. Les observations par microscopie confocale de biofilms de *L. monocytogenes* formés sur surfaces inox traités à l'acide peracétique à 1,5% n'ont toutefois pas permis de confirmer ces résultats, avec la présence quasi exclusive de cellules marquées comme mortes.

Perspectives

Il est important d'intégrer la limite des milieux de culture dans l'interprétation des résultats associés au contrôle de l'état microbiologique des surfaces prélevées. Les résultats obtenus dans cette étude méritent d'être consolidés en confrontant la méthode de PMA-PCRq à d'autres technologies (microscopie confocale ou cytométrie en flux) utilisant un marqueur de viabilité cellulaire basée sur l'activité métabolique.



Efficacité inhibitrice de l'acide peracétique, utilisée à deux concentrations ([T] : terrain ; [T/5] : terrain/5), déterminée à partir de biofilms de *L. monocytogenes* (toutes souches confondues) formés sur surfaces inox et PET par méthodes culture-dépendantes (Alagar, TSA-YE) et culture-indépendantes (PCRq et PMA-PCRq).