



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université d'Oran des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf USTO-MB



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département du Vivant et de L'environnement

Polycopié du cours

« Méthode d'analyse et de contrôle microbiologique »

A l'usage des étudiants de Master 1 Microbiologie Appliquée

Présentée par : Dr. CHAMEKH Rajaa

Année universitaire

2024/2025

Sommaire

Introduction.....	1
I- Bactéries bénéfiques et néfastes à la santé humaine.....	1
1. Bactéries bénéfiques.....	1
2. Bactéries néfastes à la santé humaine.....	2
2.1. Origine des microorganismes présents dans un aliment.....	2
2.2. Altération de la qualité sanitaire des aliments.....	2
2.2.1. Flores indicatrices d'une contamination fécale.....	2
2.2.2. Microflores responsables de toxi-infection.....	4
2.3. Pouvoir pathogène des bactéries.....	5
2.3.1. Pouvoir invasif.....	5
2.3.2. Pouvoir toxique.....	7
2.4. Manifestations cliniques d'une maladie toxi-infectieuse.....	9
II- Maladies transmissibles par les aliments.....	10
1. Maladies d'origine bactérienne.....	10
1.1. Bactéries causants des diarrhées hydriques.....	10
1.1.1. <i>Vibrio cholerae</i>	10
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> entérotoxiques (ETEC).....	13
1.1.3. <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes (EPEC).....	13
1.1.4. <i>Staphylococcus</i>	14
1.1.5. <i>Bacillus cereus</i>	14
1.1.6. <i>Clostridium perfringens</i>	16
1.2. Bactéries causant des diarrhées inflammatoires.....	17
1.2.1. <i>Shigella</i>	17
1.2.2. <i>Escherichia coli</i> entéro-invasifs (EIEC).....	19
1.2.3. <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques (EHEC).....	19

1.2.4. <i>Salmonella</i>	19
1.3. Bactéries sécrétant des neurotoxines : Le botulisme.....	21
2. Maladies parasitaires.....	23
2.1. Différents types d'hôtes.....	23
2.2. Le cycle biologique.....	23
2.3. Les parasites protozoaires.....	24
2.4. Les parasites métazoaires.....	28
III- Les analyses Microbiologiques	38
1- Préparation de l'échantillon.....	38
2- Revivification.....	39
3- Techniques générales de numération et/ou de recherche des bactéries responsables des altérations de la qualité des aliments.....	39
3.1. Flore totale aérobie mésophile.....	39
3.2. La flore fongique.....	40
3.3. Les coliformes.....	40
3.4. Les streptocoques fécaux.....	45
3.5. Les anaérobies sulfite-réducteurs.....	47
3.6. <i>Clostridium perfringens</i>	48
3.7. <i>Vibrio cholerae</i>	48
3.8. <i>Staphylococcus aureus</i>	49
3.9. <i>Bacillus</i>	50
3.10. <i>Salmonella</i>	51
Annexe 1 : Composition des milieux de culture.....	53
Annexe 2 : Tables de Mac Grady.....	67
Références bibliographiques.....	71

Introduction

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires omniprésents et diversifiés qui jouent un rôle crucial dans divers aspects de la microbiologie alimentaire. Leur capacité à coloniser une large gamme d'environnements leur permet d'influencer directement la qualité, la sécurité et la durabilité des aliments. En microbiologie alimentaire, les bactéries sont étudiées non seulement pour leur potentiel pathogène, mais aussi pour leur utilisation bénéfique dans des processus tels que la fermentation alimentaire.

Ces microorganismes peuvent affecter la texture, le goût et la valeur nutritionnelle des aliments. De plus, leur capacité à produire des toxines ou à provoquer des altérations indésirables peut poser des risques pour la santé publique. Comprendre la dynamique des populations bactériennes dans les aliments, ainsi que leurs interactions avec d'autres microorganismes et leur environnement, est essentiel pour garantir la sécurité alimentaire et optimiser les processus de production alimentaire.

I- Bactéries bénéfiques et néfastes à la santé humaine

1- Bactéries bénéfiques

Les bactéries bénéfiques jouent un rôle crucial dans l'industrie alimentaire, où elles sont exploitées pour leurs propriétés fermentaires et probiotiques. Ces microorganismes non seulement améliorent la qualité et la sécurité des aliments, mais contribuent également à leur valeur nutritionnelle et à leurs caractéristiques organoleptiques. Parmi les principales bactéries bénéfiques, on trouve : *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*

Les bactéries lactiques jouent un rôle clé dans la fermentation des aliments. Elles convertissent les sucres en acide lactique, ce qui améliore la conservation des aliments, leur texture et leur saveur. Certaines bactéries bénéfiques, comme *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont utilisées comme probiotiques. Elles favorisent la santé intestinale en équilibrant la flore intestinale, en renforçant le système immunitaire et en aidant à la digestion. En plus de la fermentation, ces bactéries produisent des composés bénéfiques comme les vitamines (notamment les vitamines B et K), les peptides bioactifs et les enzymes qui améliorent la qualité nutritionnelle des aliments.

Les bactéries bénéfiques jouent également un rôle dans la sécurité alimentaire en inhibant la croissance des microorganismes pathogènes. Elles produisent des substances

antimicrobiennes, telles que les bactériocines, qui empêchent la contamination et la détérioration des aliments.

2- Bactéries néfastes à la santé humaine

2.1. Origine des microorganismes présents dans un aliment

Les produits alimentaires contiennent généralement des microorganismes. Ces microorganismes ont deux origines possibles :

- **Origine endogène** : les microorganismes préexistent dans la matière première d'origine végétale ou animale (matière brute) avant toute manipulation ou transformation.
- **Origine exogène** : les microorganismes sont apportés accidentellement lors des manipulations ultérieures de l'aliment ou ajoutés volontairement.

2.2. Altération de la qualité sanitaire des aliments

Pour évaluer la qualité sanitaire du produit, il sera réalisé une quantification de microflore indicatrices de contamination fécale et une recherche de microflore spécifiques responsables de toxi-infection.

2.2.1. Flores indicatrices d'une contamination fécale

La présence de ces flores témoigne d'une altération de la qualité sanitaire de l'aliment.

Les flores indicatrices d'une contamination fécale sont représentées par les microorganismes vivant normalement dans l'intestin de l'homme et des animaux. Leur présence dans un aliment révèle une contamination fécale et la présence éventuelle d'une bactérie pathogène responsable de toxi-infection.

Les flores indicatrices d'une contamination fécale sont représentées par trois groupes :

- les coliformes et coliformes thermotolérants, en particulier *E. coli*,
- les Streptocoques fécaux ;
- les *Clostridium* sulfitoréducteurs.

Pour être prises en compte comme indice de contamination, ces flores doivent répondre à un certain nombre de critères :

- la grande sensibilité de détection: ces microorganismes doivent apparaître en plus grande quantité que les pathogènes.

- la résistance des microorganismes indicateurs qui est définie par leur durée de survie dans le milieu extérieur, et qui doit être supérieure à celle des germes pathogènes.

- la spécificité à l'égard de la source de la contamination : selon la nature des germes-tests recherchés, une réelle contamination d'origine fécale pourra être présumée plus ou moins fortement. La meilleure spécificité est assurée par des bactéries d'origine strictement fécale: c'est le cas des coliformes thermotolérants, qui restent le groupe privilégié, et plus particulièrement *E. coli*. Les coliformes thermotolérants font l'objet de dénombrements pour la plupart des produits alimentaires. Il n'y a pas de risque de présence d'un microorganisme pathogène si les microorganismes indices sont absents dans le produit.

- Les bactéries indicatrices doivent être mises en évidence, dénombrées, voire identifiées par des méthodes simples et fiables.

➤ **Les coliformes**

Le terme coliforme correspond à « des organismes en bâtonnets, non sporogènes, à coloration de Gram négative, oxydase négative, aérobies ou facultativement anaérobies, capables de croître en présence de sels biliaires ou d'autres agents possédant des activités inhibitrices de croissance similaires, et capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures, à des températures de 35 à 37°C ».

Pratiquement tous les coliformes peuvent exister en abondance dans les matières fécales des hommes et des animaux à sang chaud, mais certains sont également les hôtes habituels du sol et des eaux (*Citrobacter*, *Enterobacter*). Une température plus élevée permet de sélectionner les souches d'origine fécale par rapport aux bactéries issues de l'environnement. Celles-ci se développent rapidement à 44°C.

E. coli est l'espèce la plus spécifique de la contamination fécale humaine dans la mesure où elle n'existe quasiment pas à l'état saprophyte. De plus, chez l'homme, elle est présente en très grande quantité (10^8 /g), d'où une bonne sensibilité de la recherche.

➤ **Les streptocoques fécaux**

Les streptocoques fécaux sont des cocci Gram positif en chaînettes, catalase négative et possédant l'antigène de groupe D.

Ce groupe se caractérise par une très forte résistance à l'azide de sodium, qui est fortement inhibiteur pour les entérobactéries. La sélectivité peut être suffisante pour rendre pratiquement inutile l'identification.

➤ ***Clostridium* sulfito-réducteurs**

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont des bacilles Gram positif anaérobies stricts capables de sporuler, réduisant les sulfites en sulfure. Hôtes normaux de l'intestin, ils peuvent également être d'origine tellurique.

La recherche et le dénombrement des spores d'anaérobies sulfito-réducteurs est faite dans deux buts :

- Recherche de *Clostridium perfringens* responsable d'intoxications alimentaires
- les anaérobies sulfito-réducteurs (ou leurs spores), bactéries commensales de l'intestin ou saprophytes du sol, sont dénombrées afin de rechercher une contamination fécale ancienne. *Clostridium perfringens* fait partie des anaérobies sulfito-réducteurs.

2.2.2. Microflore responsables de toxi-infection alimentaire

Une toxi-infection alimentaire (TIA) est définie comme un ensemble de dysfonctionnements de l'organisme résultant de l'ingestion d'un aliment contaminé par des microorganismes pathogènes. Elle est qualifiée de collective (TIAC) lorsque au moins deux cas groupés, d'une symptomatologie similaire, le plus souvent de type gastro-intestinal dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire, peuvent être observés.

La plupart des bactéries responsables d'infections d'origine alimentaire présentent un tropisme intestinal. Ils sont capables d'adhérer à la membrane apicale des entérocytes. Les troubles observés sont à relier à la capacité de ces microorganismes de se multiplier dans les entérocytes (bactéries entéro-invasives) ou de sécréter une toxine perturbant le fonctionnement de l'entérocyte (bactéries entérotoxiques).

Il est possible de résumer les principales interactions susceptibles de se produire entre l'aliment, le microorganisme et le consommateur de la façon suivante :

Maladie	Consommateur
Maladie infectieuse	Multiplication du microorganisme chez le consommateur
Toxi-infection alimentaire (TIA)	Réponse à l'absorption de toxine. Multiplication du microorganisme.
Intoxication	Réponse à l'absorption de toxine.

2.3. Pouvoir pathogène des bactéries

Le pouvoir pathogène des bactéries est déterminé par leur pouvoir invasif (leur capacité à proliférer dans l'organisme) et leur pouvoir toxique (leur capacité à sécréter des toxines)

2.3.1. Pouvoir invasif

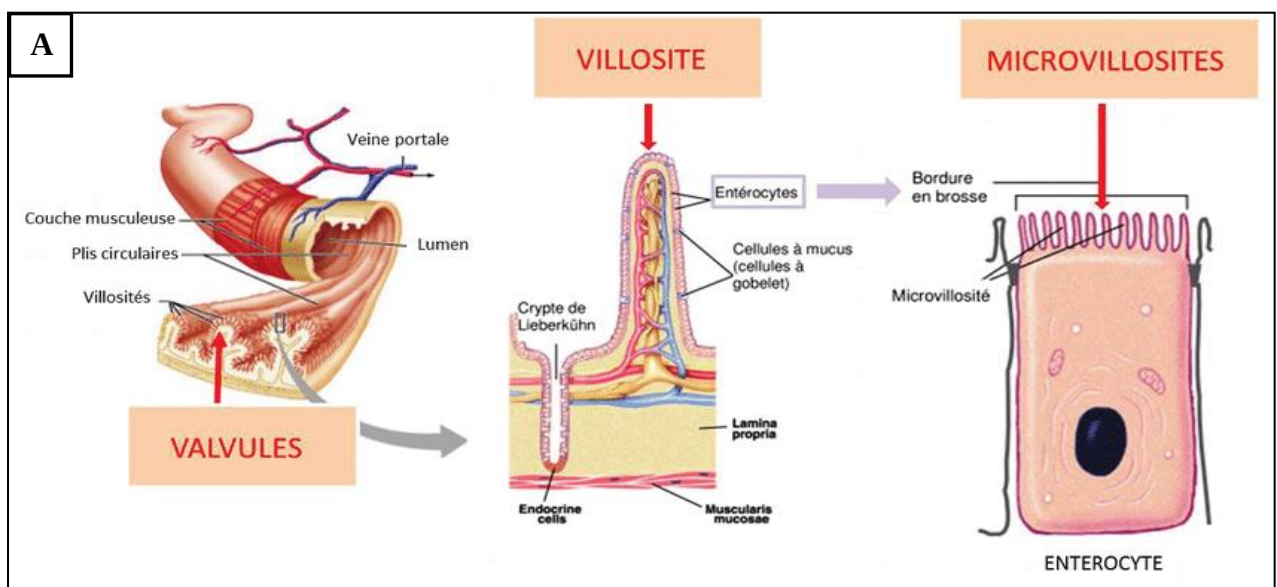
Le pouvoir invasif d'une bactérie peut être lié à :

- Son aptitude à adhérer à une muqueuse (franchissement des muqueuses)
- Son aptitude à produire des substances endommageant les barrières anatomiques de l'organisme (franchissement du tissu conjonctif)
- Sa capacité à inhiber la phagocytose.

La muqueuse intestinale se compose d'un épithélium simple (une seule couche de cellules) et d'un tissu conjonctif sous-jacent appelé chorion ou Lamina propria.

Cet épithélium simple comprend quatre types de cellules :

- les entérocytes
- les cellules M
- les cellules caliciformes
- les cellules de Paneth



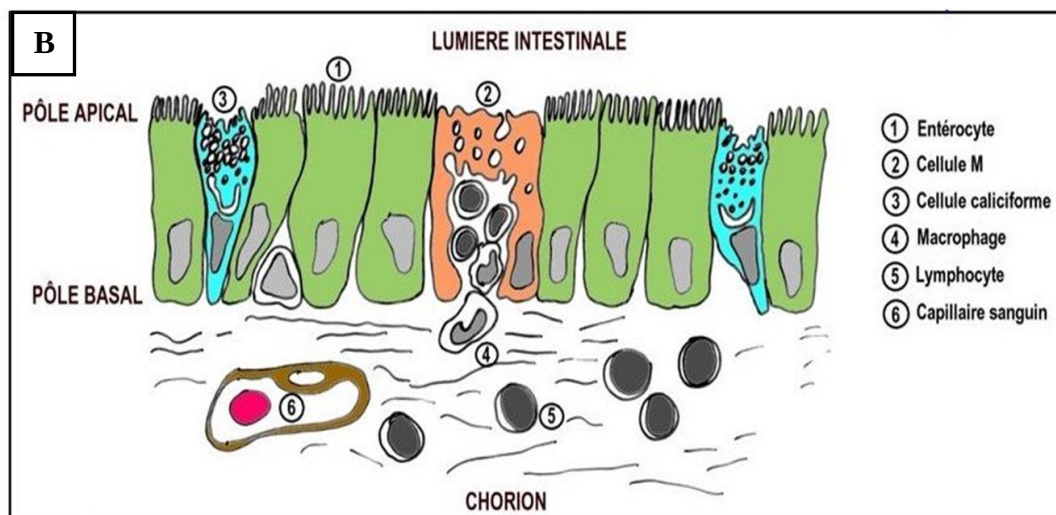


Figure 1 : Structure de l'intestin (A) et de l'épithélium intestinal (B).

➤ Le franchissement des muqueuses

Les bactéries invasives peuvent intervenir efficacement dans la destruction localisée d'une muqueuse. La plupart de ces bactéries possèdent à leur surface des structures d'adhésion leur permettant de se fixer sur les muqueuses.

L'adhérence d'une bactérie à une surface cellulaire constitue la première étape de la colonisation d'un site. Lorsque la bactérie est invasive, la colonisation peut aboutir à l'installation d'un foyer infectieux. Dans d'autres cas, cette colonisation permet l'implantation d'une flore commensale représentant une barrière de défense.

➤ Le franchissement du tissu conjonctif

De nombreuses bactéries invasives possèdent un équipement enzymatique catalysant l'hydrolyse des constituants du tissu conjonctif comme l'hyaluronidase, collagénase, protéases diverses. Le tissu conjonctif liquéfié est facilement franchi et les bactéries peuvent alors se multiplier dans l'organe concerné ou / et gagner le sang et être disséminées vers d'autres organes.

➤ L'activité antiphagocytaire

La plupart des bactéries virulentes ont une activité antiphagocytaire soit par l'action de produits de sécrétion, soit par des propriétés de certains constituants de leur paroi (protéine A de *S. aureus*). La capsule inhibe aussi la phagocytose et certaines bactéries ont la propriété de se multiplier dans les phagocytes et de les détruire.

2.3.2. Pouvoir toxique

- **Les toxines**

Les toxines sont des molécules synthétisées par un organisme et capables de perturber le fonctionnement de certaines cellules, à distance du foyer d'infection.

Les toxines sont également plus ou moins immunogènes : elles sont capables d'induire une réponse immunitaire.

Cette définition exclut les substances allergisantes non toxiques pour un organisme et certains produits toxiques mais non antigéniques du métabolisme.

- **Classification des toxines**

La classification des toxines est basée principalement sur deux critères :

- La localisation de la toxine en phase exponentielle de croissance : certaines ne sont libérées qu'après la lyse de la bactérie (endotoxine), d'autres sont totalement ou partiellement libérées au cours de la vie du germe (exotoxine)
- La nature chimique : protéique ou glucidolipidoprotéique

- **Les endotoxines**

Elles se trouvent sur la face externe de la membrane externe des bactéries Gram (-). Elles sont libérées suite à la lyse des bactéries.

Les endotoxines sont de nature lipidique. Elles correspondent au lipide A du lipopolysaccharide (LPS). Ceci leur confère des propriétés caractéristiques des lipides :

- Elles sont peu sensibles à la chaleur. On ne peut donc pas les inactiver par chauffage.
- Elles sont peu immunogènes : Il n'y a quasiment pas d'anticorps produits contre les endotoxines. On ne peut pas concevoir de vaccins contre elles.

Les endotoxines provoquent un choc toxique, (ou choc endotoxinique ou choc septique) responsable de la mort du patient dans 50% des cas.

Le lipopolysaccharide constitue la structure superficielle de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il est démontré que le lipopolysaccharide injecté à lui seul chez un animal provoque un choc septique de la même façon que l'injection d'entérobactéries entières vivantes ou tuées, ou d'extraits bruts de paroi bactérienne. Le lipopolysaccharide est une

macromolécule complexe comportant trois régions unies par des liaisons covalentes, une chaîne latérale (polysaccharides O), un noyau central et le lipide A.

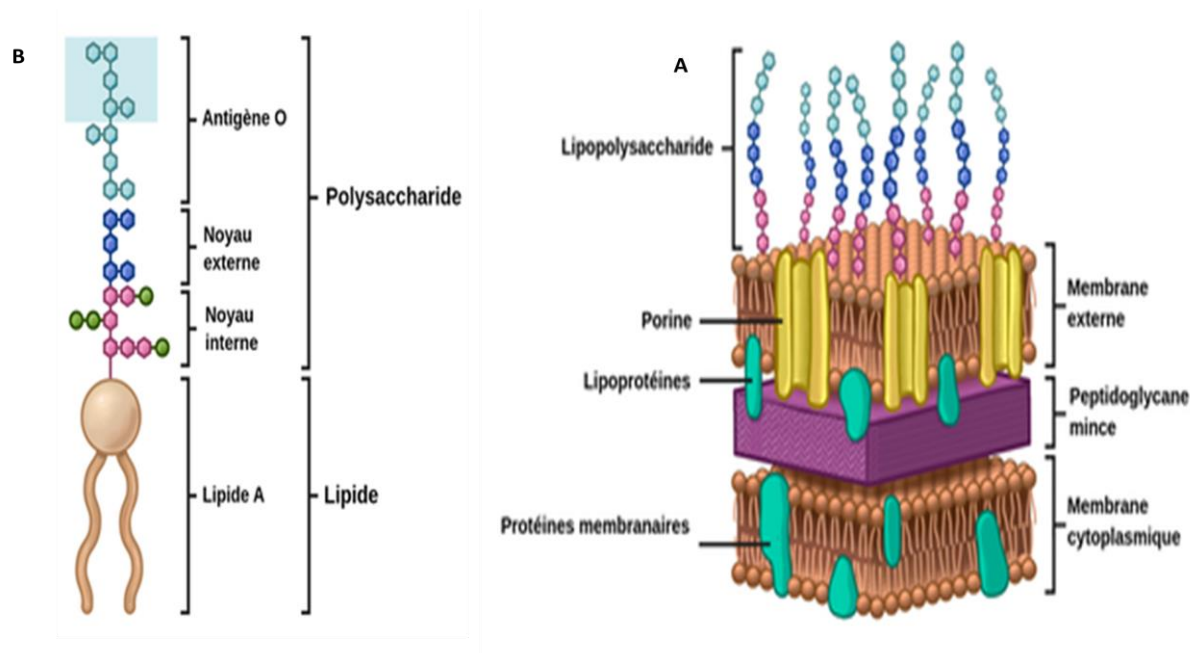


Figure 2 : Structure de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (A) et l'endotoxine (B)

- **Les exotoxines**

Les exotoxines sont de nature protéique, ceci a plusieurs conséquences sur leur fonctionnement. Elles sont codées par des gènes et donc transmissibles si les gènes sont portés par des plasmides ou des phages.

Elles sont thermosensibles facilement dénaturées par la chaleur et perdent ainsi leur activité toxique. Elles sont très immunogènes: leur présence dans l'organisme provoque la synthèse d'anticorps anti-toxines, capables de bloquer leur activité toxique.

Ces deux propriétés sont exploitées en vaccination: il est possible de produire des toxines inactives (= anatoxines) par traitement thermique ou chimique. Les anatoxines ne présentent plus de pouvoir toxique, mais elles restent immunogènes et sont donc capables d'induire une réponse immunitaire protectrice (production d'antitoxines).

Elles ont une activité toxique bien supérieure à tous les poisons chimiques et végétaux connus. Ex: un milligramme de toxine botulique ou tétanique suffirait à tuer mille tonnes de

matière vivante. 100 gr de ces toxines suffiraient pour supprimer toute vie humaine sur terre. Elles sont 15000 fois plus actives que la substance chimique la plus toxique : l'aconitine.

Remarque : sur le plan physiologique, l'effet toxique de l'endotoxine nécessite une multiplication importante de la bactérie, alors que l'exotoxine, active à très faible dose, agit même si cette multiplication n'a pas eu lieu.

- **La spécificité d'action des exotoxines**

Les exotoxines n'agissent pas sur toutes les cellules. Car elles doivent se fixer pour agir et seules les cellules possédant des récepteurs y sont sensibles.

Chaque toxine provoque des symptômes particuliers dus à l'affinité des toxines protéiques pour des structures cellulaires différentes.

- Les neurotoxines se fixent sur des récepteurs du système nerveux,
- La toxine botulique se fixe au niveau de la plaque motrice,
- La toxine cholérique se fixe sur les gongliosides de la membrane des entérocytes,
- D'autres toxines ont une grande affinité pour les membranes cellulaires et sont lytiques. Ces toxines sont soit des enzymes qui dégradent des composés de la membrane des cellules comme les collagénases, les hyaluronidases et les phospholipases soit des cytotoxines qui forment des pores dans la membrane cellulaire en insérant une protéine transmembranaire qui va perturber les échanges ioniques entre les milieux externes et internes.

3.2. Manifestations cliniques d'une maladie toxi-infectieuse

On distingue trois étapes dans une maladie toxi-infectieuse :

- **La période d'incubation :** se situe de la contamination à l'expression des premiers signes cliniques. Elle correspond au temps nécessaire à la multiplication des bactéries ou/et à la sécrétion de leurs toxines en quantité suffisante.
- **La période d'invasion :** pendant cette période les premiers signes cliniques apparaissent ; ces signes ne sont généralement pas spécifiques.
- **La période d'état :** c'est la période où les signes cliniques sont souvent évocateurs et permettent le diagnostic.

II- Maladies transmissibles par les aliments

1. Maladies d'origine bactériennes

Les infections intestinales se traduisent le plus souvent par des diarrhées. On distingue deux mécanismes physiopathologiques des diarrhées: un mécanisme toxinique causant des diarrhées hydriques et un mécanisme entéro-invasif causant des diarrhées inflammatoires.

1.1. Bactéries causants des diarrhées hydriques ou hydroélectrolytiques (Syndrome cholériforme) : Mécanisme toxinique

Le syndrome cholériforme se manifeste par une diarrhée sécrétoire, aqueuse avec des selles abondantes, profuses, « eau de riz », des vomissements, parfois des douleurs abdominales, une déshydratation qui s'installe très rapidement et absence de fièvre.

Les bactéries entérotoxigènes (ou entérotoxiques) à l'origine de ces diarrhées, se fixe à la surface de l'épithélium intestinal grâce à des facteurs d'attachement et produisent une entérotoxine qui stimule l'hypersécrétion d'eau et d'électrolytes sans causer de destruction de l'épithélium digestif. Ces bactéries ne franchissent pas l'épithélium et ne déclenchent pas de réaction inflammatoire. Il n'y a donc pas de granulocytes neutrophiles dans les selles.

Les principaux représentants sont : *Vibrio cholerae*, *E. coli* entérotoxigène (ETEC), *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), *E. coli* entéroagréatifs, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*.

(Définition de diarrhée sécrétoire: c'est une diarrhée non invasive, non inflammatoire, sans fièvre, aqueuse, volumineuse)

1.1.1. *Vibrio cholerae*

Le choléra est une affection strictement humaine, a transmission essentiellement interhumaine par les vomissements, les selles des malades, les eaux et les aliments contaminés. Non traitée, cette maladie peut s'accompagner d'une mortalité pouvant dépasser 50% des cas.

Quelques heures à 5 jours après la contamination, le patient présente brutalement des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et une diarrhée très rapidement aqueuse, afécale, incolore d'aspect d'eau de riz.



Figure 3 : Selles d'aspect d'eau de riz (à gauche) causées par *Vibrio cholerae*

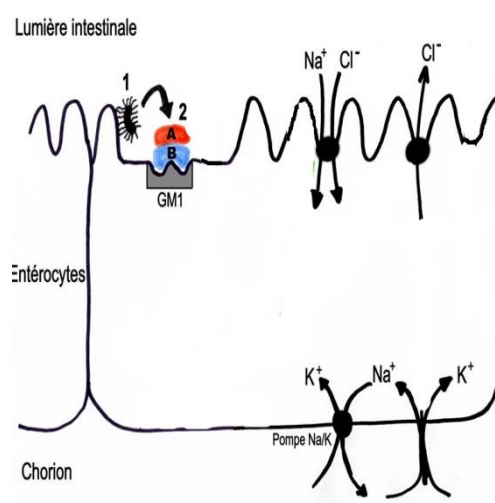
Les selles sont très fréquentes entraînant une perte hydrique qui peut atteindre 10 à 15 litres par jour. Il n'y a pas de fièvre. Rapidement, s'installe un état de déshydratation globale avec collapsus

Vibrio cholerae agit principalement par la production, au niveau de l'entérocyte, de deux entérotoxines (toxines LT thermolabile et ST thermostable). La dose infectante est de 10^8 à 10^9 bactéries ; cette dose peut être moins importante dans les cas où l'acidité gastrique est diminuée : vieillards, nourrissons, sujets en état de dénutrition.

Les bactéries ayant résisté à l'acidité gastrique se multiplient dans la lumière intestinale. Ensuite elles sécrètent des enzymes leur permettant de traverser la couche de mucus tapissant la muqueuse intestinale.

Les adhésines fimbrillaires reconnaissent des récepteurs spécifiques présents à la surface des entérocytes. Ainsi elles permettent aux bactéries d'adhérer à la surface de l'épithélium

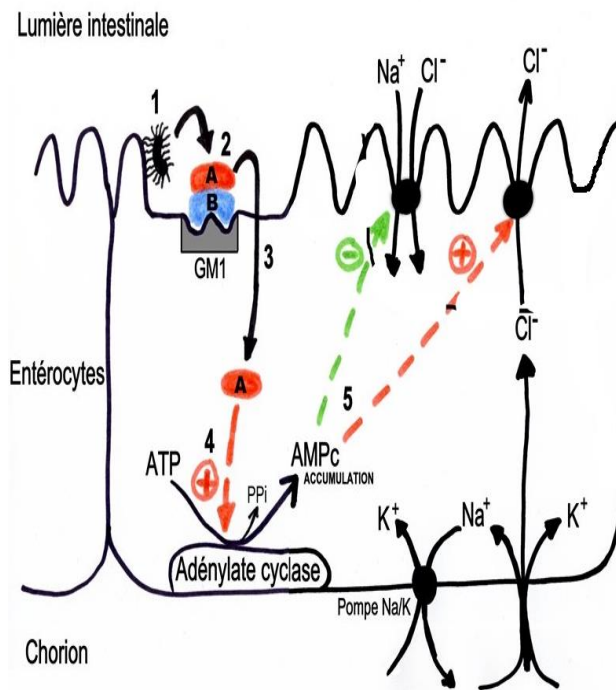
Vibrio cholerae libère alors la toxine cholérique de type A-B. La toxine se fixe par sa sous-unité B sur un récepteur spécifique présent à la surface des entérocytes (ganglioside GM1).



La fixation de la sous-unité B permet la translocation de la sous-unité A dans le cytoplasme de la cellule.

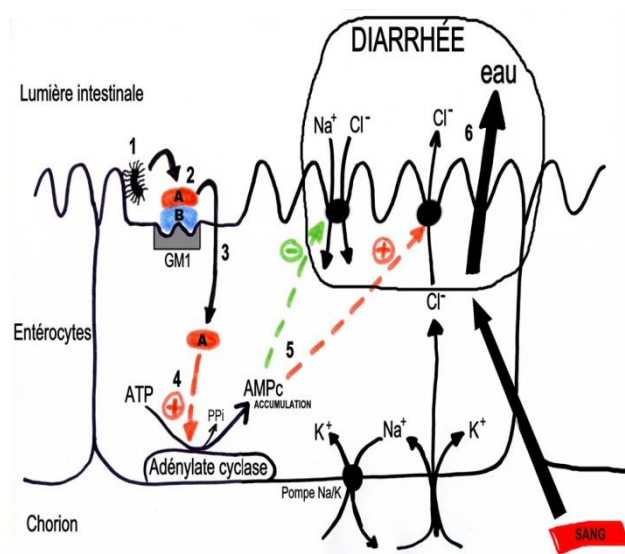
La sous-unité A conduit à la stimulation de l'adénylate-cyclase ce qui entraîne une accumulation importante d'AMPC.

L'augmentation intracellulaire d'AMPC aboutit à une perturbation des transporteurs ioniques membranaires qui vont laisser passer massivement des ions chlorures (Cl^-) dans la lumière intestinale et inhibent l'absorption couplée des ions Na^+ et Cl^- . Au final, le contenu du tube digestif devient hypertonique par rapport au cytoplasme des entérocytes.



Selon les lois de l'osmose, l'eau passe du cytoplasme des entérocytes dans la lumière intestinale. L'eau perdue par le cytoplasme est aussitôt compensée par de l'eau provenant du chorum et du sang. La volémie puis la pression artérielle chute.

La diarrhée résulte donc d'une hypersécrétion d'eau. La muqueuse intestinale reste intacte, le microorganisme n'a pas franchi l'épithélium intestinal, il n'y a donc pas de réaction inflammatoire.



On appelle toxine cytotonique, les toxines qui perturbent le métabolisme hydrominérale des cellules. La toxine cholérique est une toxine cytotonique.

1.1.2. *Escherichia coli* entérotoxiques (ETEC)

Transmis par l'eau et les aliments contaminés, ils sont responsables de la turista (diarrhée du voyageur) et représentent la principale cause de diarrhée dans les pays en voie de développement.

Les ETEC sont des pathovars d'*Escherichia coli* qui ont acquis des gènes plasmidiques leur conférant un pouvoir entéropathogène. Ces gènes codent pour des adhésines et des entérotoxines cytotoniques (toxines thermolabile LT et thermostable ST) dites « cholera like ». La structure et le mode d'action de ces toxines sont très proches de celles de la toxine cholérique. Le mécanisme physiopathologique présente de nombreuses similitudes avec celui du choléra

Les symptômes sont ceux d'une diarrhée aqueuse sans glaires ni sang, peu ou pas fébrile, pouvant s'accompagner de vomissements. Elle est spontanément résolutive en 2 à 5 jours.

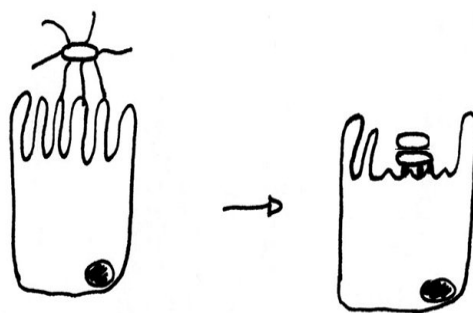
Habituellement bénigne, elle peut cependant entraîner une déshydratation sévère chez le jeune nourrisson.

1.1.3. *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC)

Ces bactéries sont principalement à l'origine des diarrhées infantiles dans les crèches et les maternités, favorisées par le manque d'hygiène. La diarrhée est aqueuse, non purulente, non sanguinolente, avec un mucus abondant. Elle s'accompagne fréquemment de fièvre et de vomissements.

L'infection par ECEP se caractérise par la formation de lésions d'attachement/effacement dans les régions touchées de l'intestin. Dans un premier temps, les EPEC adhèrent aux microvillosités des entérocytes. Ces souches possèdent un facteur d'adhésion leur permettant de s'agréger les unes aux autres sous formes d'amas de briques à la surface de l'épithélium intestinal, on parle d'attachement. Cet attachement met en jeu une protéine de la membrane externe appelée intimine.

Les EPEC injectent alors dans l'entérocyte différentes molécules responsables d'un réarrangement du cytosquelette qui conduit à un effacement des microvillosités. La disparition des microvillosités entraîne une diminution de la surface d'échange entre l'entérocyte et la lumière intestinale.



La diarrhée s'explique par un défaut de réabsorption de l'eau. Les EPEC sécrètent également une entérotoxine thermostable qui perturbe le métabolisme hydrominéral des entérocytes.

1.1.4. *Staphylococcus*

Les staphylocoques se développent dans les aliments où ils produisent des toxines. L'intoxication alimentaire staphylococcique n'est donc pas due à l'ingestion de bactéries, mais plutôt à l'ingestion de toxines.

Ces entérotoxines sont thermostables (résistent 3 heures à 100°C et 10 à 30 minutes à 120°C) et résistent aux enzymes digestives et à l'acidité gastrique. Elles possèdent des propriétés essentiellement émétiques qui induisent des vomissements et une hypermotilité intestinale. Les symptômes apparaissent brutalement (délai d'incubation inférieur à 2 heures) : nausées, douleurs abdominales et surtout vomissements violents et répétés souvent accompagnés de diarrhée. Il n'y a généralement pas de fièvre.

Les aliments en cause sont: viandes, poissons, plats cuisinés divers, crèmes glacées et pâtisseries, des aliments à faible A_w : salaisons, laits concentrés, laits en poudre.

La contamination de l'aliment résulte en général de la manipulation d'aliments par les porteurs sains, ou par des personnes atteintes d'une rhinopharyngite à staphylocoques, ou de lésions cutanées suppurées (furoncles).

La toxine staphylococcique est une entérotoxine qui peut avoir un impact sur le système nerveux autonome, en particulier sur le système nerveux entérique situé dans la paroi du tube digestif. Le système nerveux entérique est souvent considéré comme le "cerveau de l'intestin" et joue un rôle crucial dans la régulation des fonctions intestinales.

Cette toxine peut induire une libération massive de neurotransmetteurs, déclenchant des signaux nerveux qui perturbent le fonctionnement normal du système digestif et provoquent les symptômes gastro-intestinaux tels que les nausées, les vomissements, les crampes abdominales et la diarrhée.

1.1.5. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus sécrète deux toxines :

- une toxine émétique thermostable, responsable de vomissements ;
- une toxine diarrhéigène thermolabile.

Il existe des souches émétiques et des souches diarrhéigènes, les deux types pouvant coexister dans un même aliment. Une intoxication à *Bacillus cereus* peut donc se manifester sous deux formes :

- **Le syndrome diarrhéique**

Les symptômes apparaissent 8 à 16 heures après l'ingestion du plat contaminé. Ils associent crampes intestinales et diarrhée aqueuses sans fièvre. Le syndrome diarrhéique est lié à l'élaboration d'une entérotoxine thermolabile produite soit dans l'aliment contaminé, soit in vivo dans l'intestin grêle. Cette toxine est normalement détruite pendant la cuisson des aliments, mais les spores peuvent résister. La germination débutera alors au cours du refroidissement de l'aliment.

La toxine diarrhéique peut modifier la perméabilité de la muqueuse intestinale en altérant la structure des jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Cela peut conduire à une augmentation de la perméabilité intestinale, permettant à l'eau et aux électrolytes de traverser plus facilement la barrière intestinale. Cela se traduit par des selles liquides et des symptômes de diarrhée.

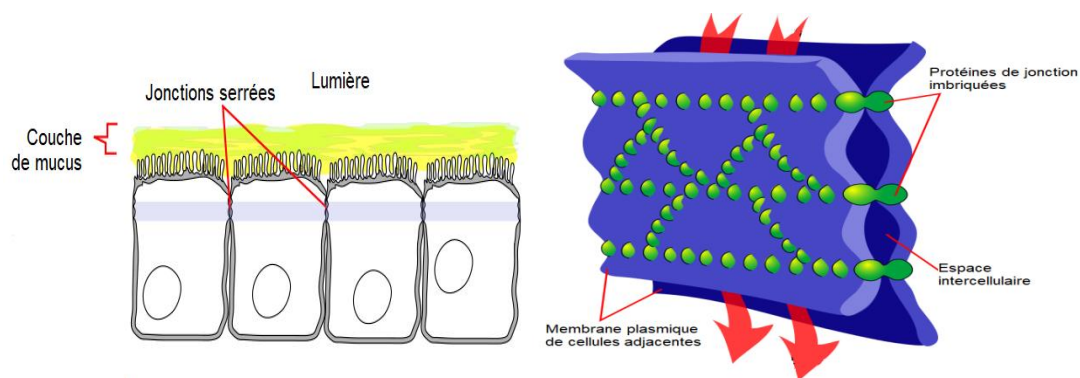


Figure 4 : Les jonctions serrées entre les cellules épithéliales

- **Le syndrome émétique**

Les maladies à symptômes émétiques sont causées par l'ingestion de la toxine produite dans l'aliment

Le syndrome émétique est caractérisé par une incubation courte de 1 à 5 heures avec la présence de nausées, de vomissements comparables à ceux provoqués par les staphylocoques entérotoxiques, et de douleurs abdominales.

La toxine émétique de *B. cereus* agit directement sur le tractus gastro-intestinal en activant des récepteurs spécifiques dans la muqueuse intestinale. Cela entraîne une stimulation du centre du vomissement dans le cerveau, provoquant des nausées et des vomissements. Elle peut également affecter les cellules musculaires lisses de l'intestin, contribuant ainsi aux contractions intestinales.

Le riz préparé dans les restaurants orientaux est le principal aliment responsable des formes émétiques. En effet, *Bacillus cereus* se développe bien dans les aliments riches en polysaccharides, il peut contaminer le riz après sa cuisson et se multiplier lorsque l'aliment est laissé plusieurs heures à la température ambiante. Les traitements thermiques ultérieurs (grillade) sélectionnent la toxine émétique qui est thermostable.

1.1.6. *Clostridium perfringens*

L'ingestion d'un grand nombre de *C. perfringens* qui dépasse 10^6 microorganismes/g permet son implantation dans l'intestin grêle, il s'y multiplie puis au cours de la sporulation produit l'entérotoxine. La structure de cette toxine comprend deux zones : une zone hydrophile qui permet à la toxine de se fixer sur la membrane de l'entérocyte, et une partie hydrophobe qui stimule la sécrétion hydrominérale.

Certains types de toxines produites par *C. perfringens* peuvent former des canaux ioniques dans la membrane cellulaire, modifiant ainsi la perméabilité membranaire et provoquant des perturbations dans l'équilibre ionique.

Les symptômes apparaissent généralement 6 à 8 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé. Ils se traduisent surtout par de douleurs abdominales et d'une diarrhée abondante et aqueuse. Généralement, on n'observe pas de vomissements ni de fièvre.

La cause la plus fréquente de ce type d'intoxication est une cuisson lente et insuffisante des viandes et les aliments préparés en grande quantité.

1.2. Bactéries causant des diarrhées inflammatoires (diarrhées invasives) : Mécanisme entéro-invasif

Les bactéries entéropathogènes invasives envahissent les cellules épithéliales, vont s'y multiplier jusqu'à leur destruction et déclenchent une réaction inflammatoire. Par conséquent, les selles contiennent de nombreux granulocytes neutrophiles. Ce mécanisme invasif se manifeste presque toujours par un syndrome fébrile, des selles afécales, nombreuses, glaireuses, sanglantes, quelquefois mucopurulentes, des douleurs abdominales, des épreintes, un ténesme avec faux besoins. Ce tableau clinique est celui d'un syndrome dysentérique. Les *Shigella*, les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) et entéro-hémorragiques (EHEC) appartiennent à ce groupe.

À l'opposé, les bactéries de type *Salmonella* et *Yersinia* sont responsables d'une atteinte du tissu sous muqueux sans destruction de la muqueuse. Elles la traversent, vont se multiplier dans les macrophages situés dans le tissu lymphoïde sous muqueux et mésentérique, et provoquent une réaction inflammatoire. Une diffusion systémique est un risque majeur notamment pour les patients immunodéficients. C'est le syndrome gastro-entéritique qui se manifeste par un tableau de diarrhée décrite comme banale, associée à des douleurs abdominales, des vomissements. La fièvre peut être absente.

(Définition d'une diarrhée inflammatoire: c'est une diarrhée invasive avec présence de fièvre, douleurs abdominales, ténesme, mucus/sang)

1.2.1. *Shigella*

La physiopathologie de *Shigella* repose sur sa capacité à envahir la muqueuse intestinale, entraînant une dysenterie bacillaire ou shigellose. Les bactéries franchissent d'abord le mucus protecteur recouvrant l'épithélium intestinal pour atteindre principalement les cellules M. Ces cellules spécialisées facilitent la translocation des bactéries vers les tissus sous-jacents en formant des vésicules d'endocytose. Une fois à ce niveau, *Shigella* interagit avec les macrophages présents, mais elle échappe rapidement à leur destruction en induisant leur apoptose. Après l'élimination des macrophages, les bactéries envahissent les cellules épithéliales adjacentes par le pôle basolatéral.

Par ailleurs, *Shigella* peut également cibler directement les entérocytes, en particulier lorsque la barrière épithéliale est compromise. Une fois adhérees, les bactéries induisent la formation de vésicules d'endocytose qui emprisonnent les bactéries, bien que les entérocytes

soient dépourvus de propriétés phagocytaires. Ces vésicules sont rapidement détruites, libérant les bactéries dans le cytoplasme où elles se multiplient.

À l'intérieur des cellules épithéliales, *Shigella* manipule le cytosquelette d'actine. Cela lui permet de se propulser dans le cytoplasme et de se propager vers les cellules voisines, entraînant une propagation horizontale efficace de l'infection.

La destruction des entérocytes est amplifiée par la production de la toxine shiga (notamment par *S. dysenteriae*), une protéine cytolytique qui inhibe la synthèse des protéines et provoque la mort cellulaire. Cette destruction provoque une réponse inflammatoire intense, caractérisée par l'infiltration de neutrophiles dans le chorion et la formation de micro-abcès et d'ulcérations de la muqueuse.

L'inflammation générée par cette destruction tissulaire conduit à une diarrhée sanglante et douloureuse, accompagnée de fièvre et de ténésme. La réaction inflammatoire limite généralement la dissémination systémique de *Shigella*. Ainsi, dans la majorité des cas, les bactéries restent confinées à l'intestin : Coproculture positive, hémoculture négative.

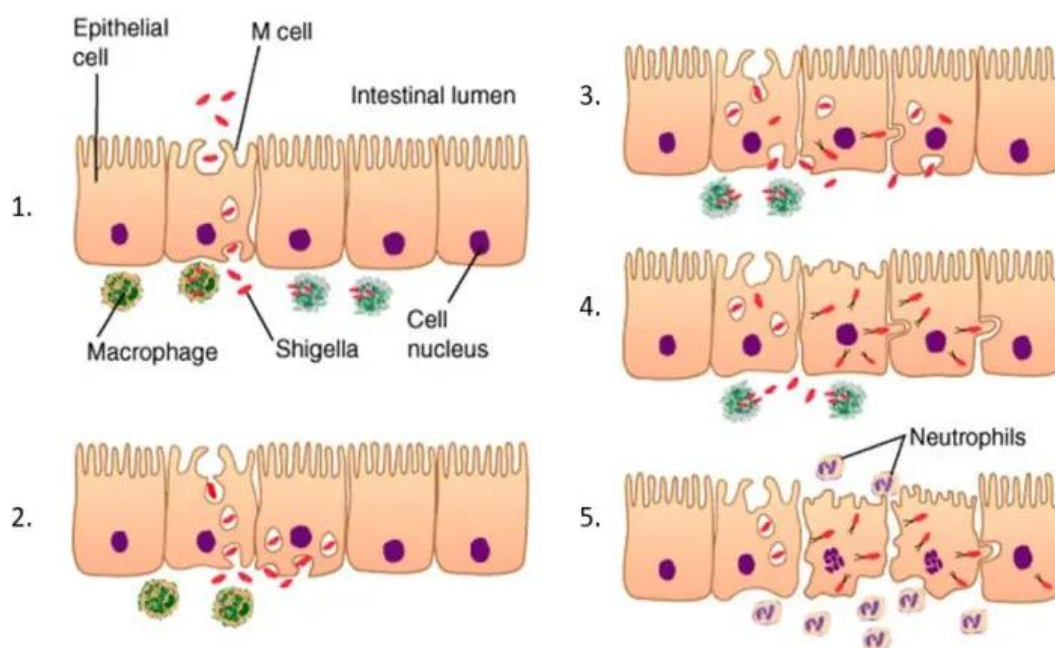


Figure 5 : Entrée et dissémination de *Shigella*

La contamination est réalisée par l'eau et les aliments contaminés par les selles de porteurs sains. Les aliments à suspecter sont ceux qui sont manipulés sans chauffage et dont le pH est compris entre 6,5 et 7,5. Le réservoir étant strictement humain. La dose infectante est très faible, de l'ordre de 10 à 100 bactéries.

Shigella dysenteriae est responsable de la dysenterie bacillaire se manifestant après 48 à 72h par l'émission de selles afécales, glaireuses et sanglantes. La maladie s'accompagne de fièvre, ténésme et de fortes douleurs abdominales. C'est la forme la plus sévère des shigelloses.

1.2.2. *Escherichia coli* entéro-invasifs (EIEC)

Ce sont des souches possédant des facteurs de virulence voisins de ceux identifiés chez les *Shigella* (à l'exception de la toxine de Shiga). Elles sont responsables, comme les *Shigella*, de diarrhées sanglantes et purulentes, d'aspect dysentérique, avec fièvre. La dose minimale infectante est voisine de 10^8 bactéries. La durée d'incubation est souvent courte. On estime généralement que les symptômes commencent à se manifester entre 6 et 72 heures après l'exposition initiale à la bactérie.

1.2.3. *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)

Elles sont responsables d'une diarrhée sanglante, non purulente et non fébrile qui apparaît après une période d'incubation de 3 à 8 jours

Les bactéries EHEC adhèrent à la muqueuse intestinale et produisent des protéines appelées adhésines intimines qui favorisent la formation de lésions caractéristiques sur la muqueuse intestinale connues sous le nom d'attachement/Effacement. Ces lésions entraînent l'effacement des microvillosités, perturbant ainsi la surface absorbante des cellules épithéliales.

Leur pouvoir pathogène est aussi caractérisé par leur capacité à sécréter une toxine *Shigella-like* (encore appelé vérotoxine). Cette toxine cause des lésions au niveau de l'endothélium capillaire ce qui conduit à la formation des caillots (microthromboses) au niveau des reins et parfois d'autres organes : cerveau, cœur, foie, pancréas. Par conséquent, cette toxine peut entraîner chez les jeunes enfants et les personnes âgées des complications graves telles que le syndrome hémolytique (anémie hémolytique) et urémique (insuffisance rénale). C'est la première cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant avant 3 ans.

1.2.4. *Salmonella*

Bien qu'il existe plus de 2 500 sérotypes de *Salmonella*, tous présumés pathogènes pour l'homme, on distingue souvent 2 groupes selon la physiopathologie et du tableau clinique:

- les sérotypes typhi et paratyphi A, B et C qui sont à l'origine de maladies infectieuses appelées fièvres typhoïdes ou paratyphoïdes.

- tous les autres sérotypes non typhiques responsables des toxi-infections alimentaires et gastro-entérites. Dans ce cas, *Salmonella enteritidis* est l'espèce la plus fréquemment impliquée

La dose infectante avec des espèces de *Salmonella typhi*, et *paratyphi* est de quelques cellules seulement.

La consommation de l'aliment dans lequel le nombre de *Salmonella* non typhique aura atteint au moins 10^6 germes par gramme entraînera une toxi-infection

Toutes les variétés d'aliments sont susceptibles d'être contaminées par ces microorganismes. Les aliments les plus souvent mis en cause dans les salmonelloses sont les volailles (40 %), les viandes et plus particulièrement les viandes hachées (10 %), le lait et les produits laitiers (15 %), les œufs (5 %), les crèmes glacées et pâtisseries (5 %)...

➤ **La fièvre typhoïde**

L'invasion de la muqueuse intestinale par les *Salmonella* requiert l'adhésion des bactéries sur les entérocytes. Après adhésion, on note le gonflement des microvillosités, une vacuole d'endocytose se forme, les *Salmonella* s'y multiplient. La vacuole migre vers la membrane latérobasale et est expulsée de la cellule. Les bactéries accèdent à la lamina propria et sont prises en charge par les macrophages où elles se multiplient sans occasionner de lésions : C'est la phase d'incubation asymptomatique qui dure de une à deux semaines.

Une partie des germes va se disséminer dans le sang du malade et va créer une septicémie. L'installation de cette septicémie entraîne la fièvre, la splénomégalie et les localisations secondaires. L'autre partie des germes va être détruite localement dans les ganglions libérant l'endotoxine : c'est la phase d'invasion.

L'endotoxine va imprégner les terminaisons nerveuses du système neurovégétatif abdominal puis diffuse dans tout l'organisme et se fixe sur les centres nerveux diencéphaliques et sur d'autres organes, dont le myocarde : c'est la phase d'état. La libération maximale de l'endotoxine à cette phase détermine la symptomatologie.

La phase initiale associe une fièvre progressivement croissante, des céphalées, asthénie, insomnie, vertiges, des douleurs abdominales avec constipation. À partir de la 2^{ème} semaine, apparaît la diarrhée, associée à une fièvre élevée en plateau (39°C à 40°C), une obnubilation (tuphos), une splénomégalie, parfois des taches rosées lenticulaires.

À partir de la 3^{ème} semaine, des complications endotoxiques sont annoncées par une tachycardie, collapsus cardiovasculaire, myocardite, hémorragies ou perforations intestinales et des localisations secondaires.

➤ **Les salmonelloses non typhiques**

Les *Salmonella* non-typhi sont capables d'envahir les cellules de l'épithélium intestinal par le processus d'endocytose. Après franchissement de la muqueuse digestive, les salmonelles peuvent se multiplier dans les ganglions mésentériques et entraînent une diarrhée par production d'une entérotoxine. La diffusion hématogène est rare.

Salmonella non typhiques donnent une symptomatologie beaucoup moins grave que les fièvres typhoïdes. Les signes cliniques apparaissent généralement 24 à 48 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé. Des céphalées, frissons, douleurs abdominales sont rapidement associés à de la fièvre et de la diarrhée, parfois des vomissements. La guérison est de règle général en quelques jours.

Cependant, chez les sujets immunodéprimés, les vieillards et les enfants, la maladie peut se compliquer par une septicémie et des atteintes extradigestives (Ostéo-articulaires, Abscesses de la rate, atteintes pleuropulmonaire, méningée, artérielles (anévrismes), Insuffisance rénale aiguë).

1.3. Bactéries sécrétant des neurotoxines : Le botulisme

Le développement de la bactérie *C. botulinum* dans les aliments est possible lorsque les conditions de milieu suivantes sont réunies :

- un potentiel d'oxydoréduction peu élevé. Cette condition est réalisée dans les conserves
- un pH supérieur à 4,5 ;
- une température supérieure à + 10°C et inférieure à 48°C.

Dans les conserves mal stérilisées, les spores survivent et germent pour donner des formes végétatives viables du fait des conditions d'anaérobiose existantes.

Un abattage mal conduit aboutit à la production de viandes à pH élevé et à faible teneur en oxygène, ou exsudatives et retenant mal le sel. *C. botulinum* se retrouvera donc viable au cœur du muscle et s'y développera, du fait de conditions d'anaérobiose et de pH favorables et de la faible teneur en sel et en nitrites (destinés à inhiber sa croissance). Il y produira sa toxine botulinique qui, ingérée avec l'aliment, résiste à l'action des enzymes protéolytiques du tube

digestif, passe dans le sang et atteint, par cette voie, ses récepteurs au niveau des jonctions neuromusculaires. Les toxines botuliques bloquent le couplage entre la sécrétion d'acétylcholine et l'excitation du muscle en inhibant la libération d'acétylcholine à partir des vésicules de stockage. Elles provoquent, de ce fait, la paralysie des muscles concernés.

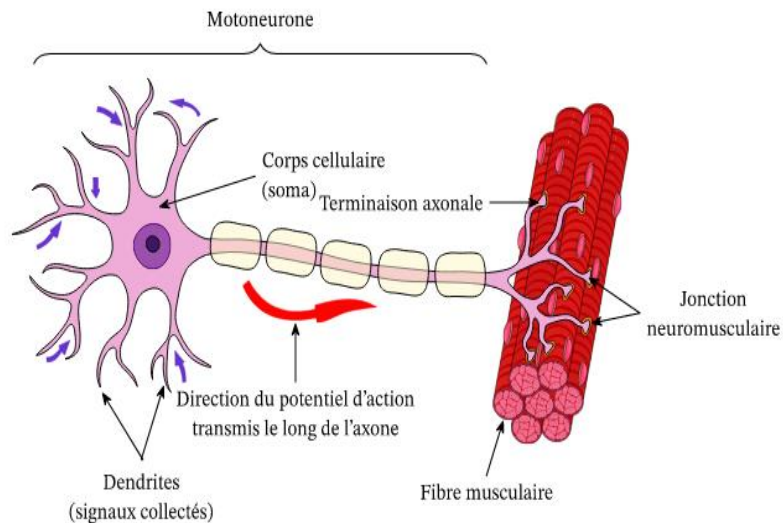


Figure 6 : Jonction neuromusculaire

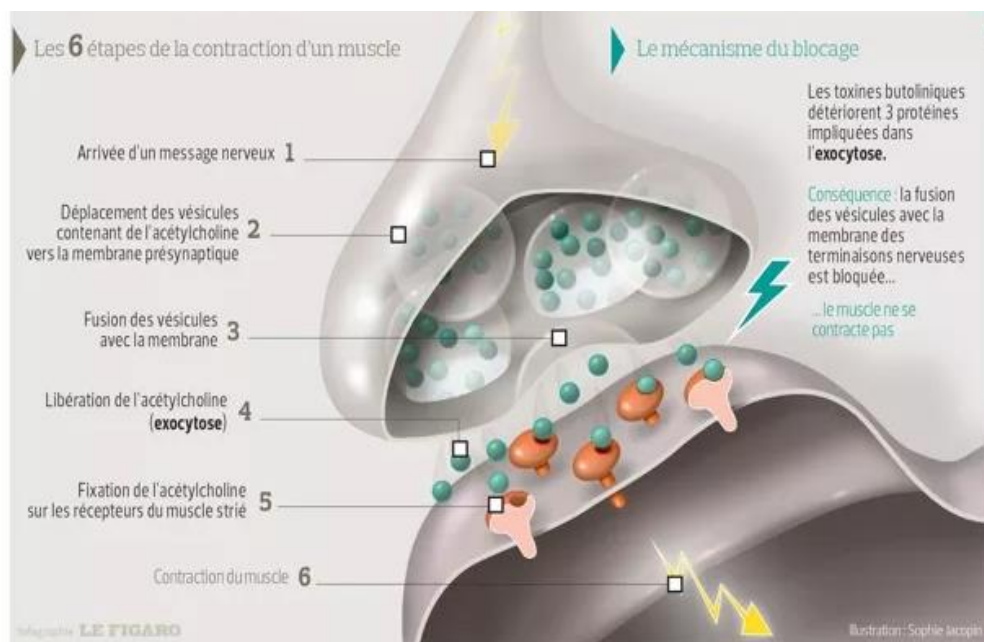


Figure 7 : Inhibition de la libération de l'acétylcholine par la toxine botulique

La période d'incubation est très variable, en général de deux à vingt-quatre heures. Apparaissent d'abord une paralysie des muscles de l'accommodation avec diplopie (vision double), des difficultés à la déglutition, la sécheresse de la bouche. Dans les formes graves, les paralysies atteignent les muscles respiratoires.

2. Maladies parasitaires

Le parasitisme est un type d'association entre deux espèces différentes: le parasite et son hôte. Un parasite est un être vivant qui, pendant une partie ou la totalité de son existence, vit aux dépens d'un autre organisme vivant appelé hôte.

2.1. Différents types d'hôtes

- **Hôte définitif**

C'est l'être vivant qui héberge la forme adulte ou sexuée du parasite.

- **Hôte intermédiaire**

Il héberge la forme larvaire ou non sexuée du parasite. C'est un organisme vivant chez lequel l'agent pathogène doit séjourner un certain temps soit pour se multiplier soit pour subir une maturation qui l'amène à sa forme infestante pour l'hôte définitif.

- **Hôte réservoir**

C'est l'animal qui héberge le même parasite que l'homme et qui permet au parasite de se maintenir dans la nature, en dehors de l'organisme humain.

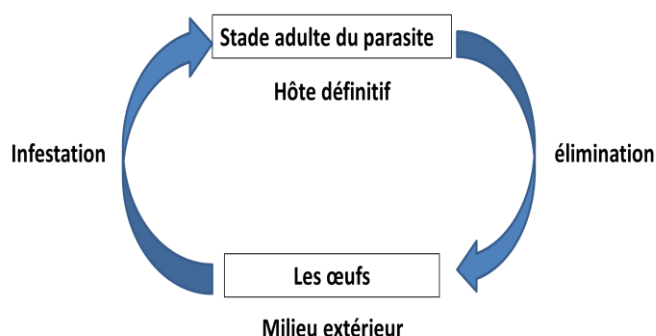
2.2. Le cycle biologique

Toute espèce parasite passe par différents stades de développement durant sa vie et chaque stade correspond à une morphologie particulière (larvaire ou adulte) et dépend à un hôte déterminé. L'ensemble de ces stades donne un cycle biologique.

Le stade larvaire est hébergé par un hôte intermédiaire et le stade adulte par un hôte définitif. Le nombre d'hôte intermédiaire est fonction du nombre des stades larvaires du parasite et quelque soit le cycle biologique du parasite, on a un seul hôte définitif.

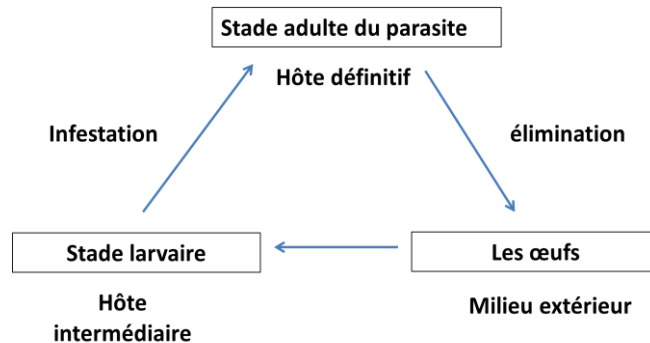
- **Cycle monoxène**

Un seul hôte définitive qui héberge le stade adulte et aucun hôte intermédiaire.



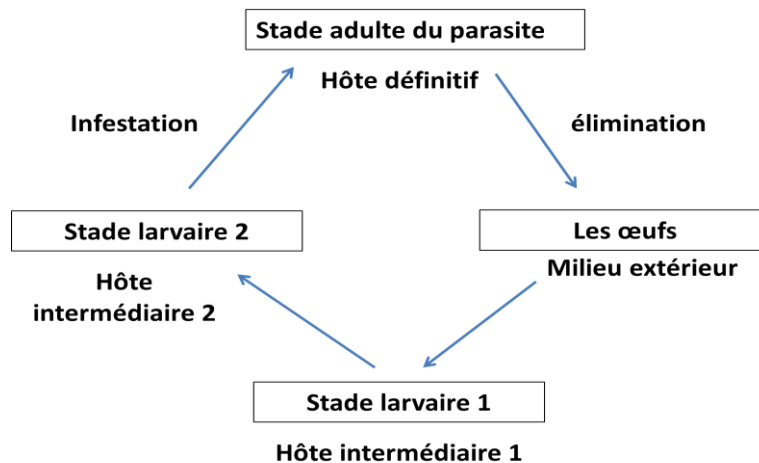
- **Cycle dixène**

Un seul hôte définitive qui héberge le stade adulte et un hôte intermédiaire qui héberge le stade larvaire.



- **Cycle hétéroxène**

Un seul hôte définitive qui héberge le stade adulte et plusieurs hôtes intermédiaires hébergeant les différents stades larvaires.



2.3. Les parasites protozoaires

2.3.1. Amibiase

L'amibiase est une affection parasitaire due à un protozoaire *Entamoeba histolytica*, parasite strict de l'homme.

Entamoeba histolytica se présente sous 3 formes différentes :

Deux formes végétatives:

- ❖ La forme végétative *histolytica* ou *Entamoeba histolytica histolytica*
- ❖ La forme végétative *minuta* ou *Entamoeba histolytica minuta*

Une forme kystique: On distingue des kystes à 1 noyau, 2 noyaux et 4 noyaux qui est le kyste mur et la forme infestante de l'amibe.

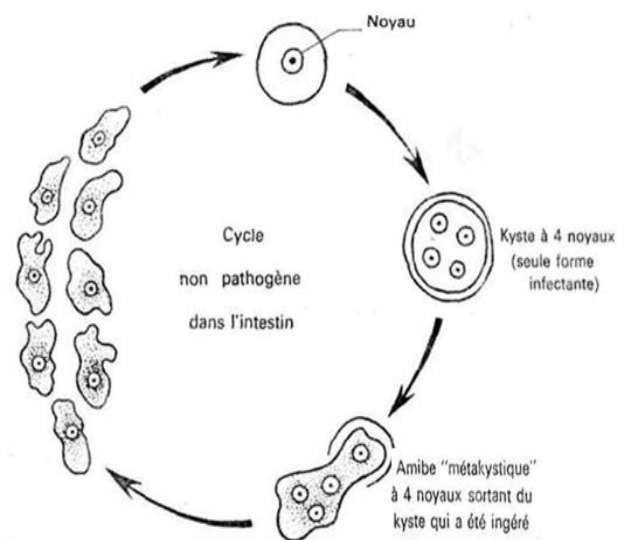
Le cycle évolutif comporte 2 parties : le cycle non pathogène: forme *minuta* et le cycle pathogène: forme *histolytica*

- **Cycle non pathogène**

Au niveau du tube digestif, les formes végétatives minuta vivent dans la lumière colique et après un temps de multiplication, l'amibe va se transformer en kyste à 4 noyaux. Les kystes sont rejetées passivement avec les selles du malade dans le milieu extérieur.

La contamination de l'homme se fera par ingestion de formes kystiques mures à 4 noyaux en même temps que les aliments souillés (légumes, fruits mal lavés, eau de boisson contaminée...). Au niveau de l'estomac, les sucs digestifs brisent la coque du kyste qui devient alors une amibe métakystique. Après une division nucléaire, l'amibe métakystique devient une amibe à 8 noyaux puis la division cytoplasmique permet à chaque noyau de s'entourer d'un fragment de cytoplasme. La cellule éclate et libère 8 amœbules qui

vont se transformer en forme végétative minuta qui donne des formes kystique à 1, 2 puis 4 noyaux.



- **Cycle pathogène**

Lors d'un affaiblissement du système immunitaire, ou d'un déséquilibre de la flore intestinale, les formes végétatives minuta se transforment au niveau du colon en forme végétative *histolytica*. Les formes végétatives minuta vont grossir, acquérir un pouvoir hémolytique et lytique pouvant pénétrer dans la paroi colique et créer des ulcérations.

Elles perforent le colon et diffusent par voie sanguine jusqu'au foie (hépatite amibienne, abcès amibien), poumon, le cerveau, la rate, les muscles, les voies urinaires

Ces formes végétatives histolytica après un temps de multiplication sous forme hémaphophage vont redonner des formes végétatives minuta à la suite d'un traitement ou spontanément. Seules les formes végétatives minuta peuvent donner des kystes.

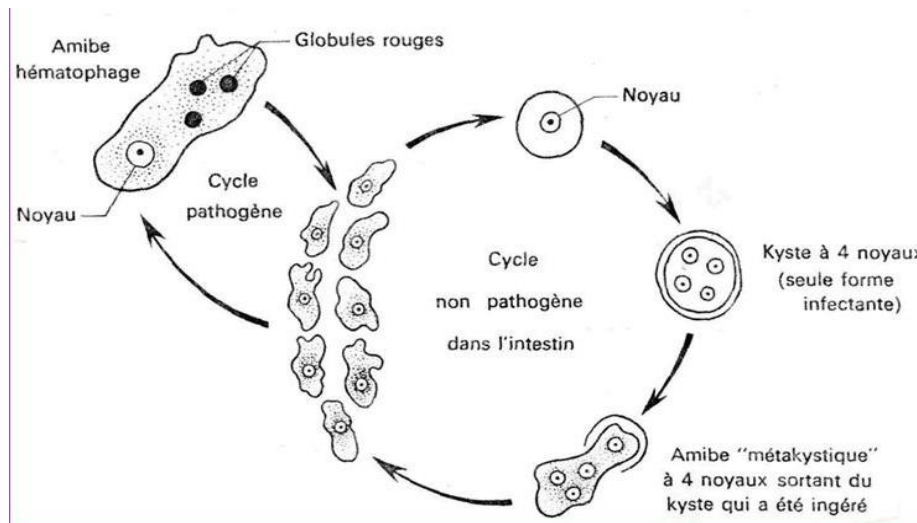


Figure 8 : Cycle évolutif d' *Entamoeba histolytica*

- **Signes Clinique**

- **Amibiase intestinale** : syndrome dysentérique avec diarrhée afécale, mucosanglante, douleurs abdominales. Il n'y a généralement pas de fièvre.
- **hépatite amibienne**: altération de l'état général, fièvre, hépatomégalie, douleur à l'hypocondre droit.

2.3.2. *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis est un protozoaire flagellé qui colonise l'intestin (duodénum). Le parasite se présente sous deux formes : la forme végétative, ou trophozoïte, qui est responsable de la maladie, et la forme kystique qui est responsable de la survie dans le milieu extérieur et la contamination.

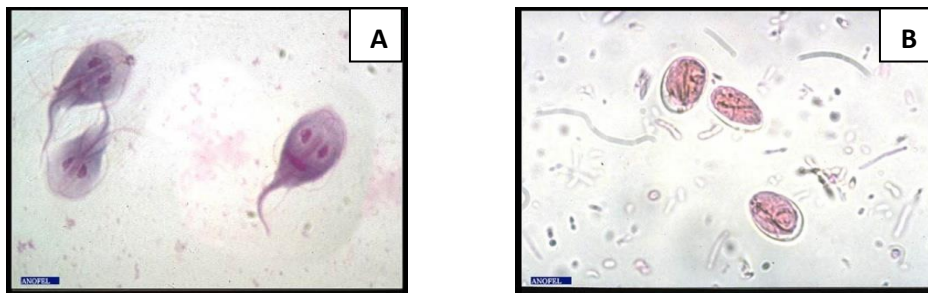


Figure 9 : La forme végétative (trophozoïte) (A) et la forme kystique (B) de *Giardia intestinalis*

- **Cycle Evolutif**

L'homme se contamine essentiellement par ingestion de kystes à partir de l'eau de boisson, moins souvent par les aliments souillés. Les kystes se transforment en trophozoïtes dans le duodénum sous l'action des sucs digestifs et du pH.

Ils se multiplient par scissiparité puis redonnent des kystes avant d'être éliminés dans les selles. Un malade peut excréter jusqu'à 10^8 à 10^{10} kystes par jour, pendant l'épisode diarrhéique. Après guérison, il peut encore excréter des kystes pendant 3 à 4 semaines.

Les trophozoïtes se multiplient rapidement, sont mobiles grâce à leurs flagelles et se fixent sur les entérocytes. Cette fixation s'accompagne d'altération des entérocytes, d'atrophie villositaire et d'une destruction de la bordure en brosse. Les *Giardia* sécrètent également des enzymes protéolytiques.

Les trophozoïtes utilisent les nutriments pour leur métabolisme et captent les acides biliaires, favorisant la malabsorption des graisses et de certaines vitamines liposolubles, telles que la vitamine B12.

- **Signes cliniques**

- une diarrhée modérée,
- des douleurs abdominales hautes, épigastriques,
- des nausées
- Une perte de poids,
- des selles malodorantes et décolorées
- La fièvre ou la présence de sang ou de mucus dans les selles sont rares.

2.4. Les parasites métazoaires

Les helminthes (vers) constituent la majorité des parasites métazoaires transmis par l'alimentation. La classification la plus simple des helminthes est comme suit :

- Vers ronds = **Nématodes**
- Vers plats = **Plathelminthe** qui sont divisés en :
 - ✓ Plathelminthe segmenté = **Cestodes**
 - ✓ Plathelminthe non segmentés = **Trématodes**

2.4.1. Les Nématodes : Ascaridiose

L'ascaridiose est une parasitose intestinale causée par un ver rond strictement humain, *Ascaris lumbricoides*. Les adultes vivent dans l'intestin, ils peuvent migrer facilement pouvant se retrouver dans différents organes.



Figure 10 : *Ascaris lumbricoides*

- **Le cycle évolutif**

Les femelles fécondées pondent des œufs dans l'intestin. Les œufs sont éliminés dans le milieu extérieur avec les selles. Les œufs effectuent leur maturation dans le milieu extérieur. Cette maturation aboutit à la formation des œufs embryonnés.

Les œufs embryonnés sont ingérés par l'hôte définitif avec de l'eau de boisson, des légumes ou des aliments souillés. La coque de l'œuf est dissoute par les sucs digestifs, la larve libérée traverse la paroi intestinale, gagne le foie puis le cœur droit, l'artère et les capillaires pulmonaires puis traverse la paroi de l'alvéole pulmonaire, remonte l'arbre bronchique jusqu'au pharynx où habituellement elle est déglutie en direction du tube digestif.

La larve gagne l'intestin où elle devient adulte et les femelles commencent à pondre les œufs qui seront rejetés dans le milieu extérieur.

Un œuf ne devient infestant qu'après un séjour de quelques semaines dans le milieu extérieur.

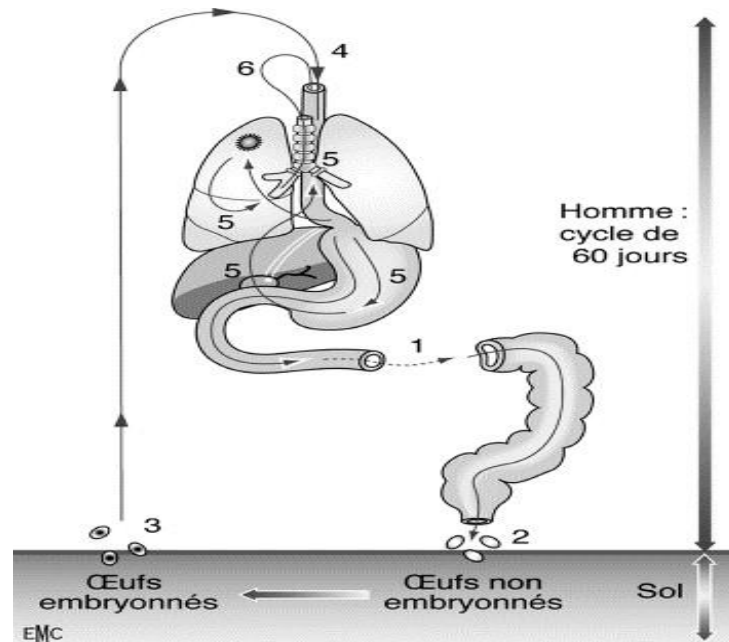


Figure 11 : Cycle évolutif d'*Ascaris lumbricoides*

- **Signes cliniques**

Dans la majorité des cas, la maladie touche l'enfant de moins de 15 ans.

Dans un premier temps, la maladie envahit le foie, les poumons et l'œsophage. L'enfant présente alors un syndrome allergique :

- une fièvre modérée ;
- une toux sèche ;
- une gêne respiratoire (dyspnée) ;
- une asthénie et une altération de l'état général.

Par la suite, lorsque les vers deviennent adultes dans l'intestin grêle, l'enfant peut présenter une perte de poids et souffre de symptômes digestifs :

- des crampes abdominales ;
- des nausées et vomissements ;
- des diarrhées.

Les complications sont rares:

- occlusion ou perforation intestinale ;
- colique hépatique ;
- appendicite ;
- pancréatite

2.4.2. Les Trématodes : Distomatoses (*Fasciola hepatica*)

Les distomatoses sont dues à la présence dans l'organisme de vers trématodes hermaphrodites : les douves.

Fasciola hepatica , communément appelée grande douve du foie, est un helminthe plat en forme de petite feuille, mesurant 2 à 3 cm de long sur environ 1 cm dans sa plus grande largeur. Il possède à son extrémité antérieure deux ventouses qui lui permettent de s'attacher à l'épithélium des voies biliaires.

Le parasite adulte colonise les voies biliaires intra et extra-hépatiques de l'hôte définitif (nombreux mammifères, en particulier mouton, bœuf, accidentellement l'homme).



Figure 12 : Adultes de *Fasciola hepatica*

• Cycle Evolutif

La douve adulte va pondre des œufs. Ces œufs sont rejetés avec les selles. En milieu aquatique, l'œuf s'embryonne et libère la larve, le miracidium.

Le miracidium nage à la recherche de son 1^{er} hôte intermédiaire, un mollusque. Lorsque le miracidium rencontre son HI, il pénètre dans l'organisme du mollusque, migre vers la cavité pulmonaire où il se multiplie donnant des milliers de sporocystes. Chaque sporocyste donne naissance par bourgeonnement à une 3^{ème} forme larvaire : la rédie.

La rédie gagne l'hépatopancréas du mollusque et à ce niveau chaque rédie donne naissance à une 4^{ème} forme larvaire : la cercaire

Les cercaires quittent l'organisme du mollusque et nagent à la recherche de leur 2^{ème} HI (généralement un végétal). Lorsque la rencontre à lieu, la cercaire perd sa queue et s'entoure d'une paroi épaisse et s'enkyste sous forme de métacercaires, forme infestante de la douve.

L'Homme se contamine par ingestion de ces métacercaires vivantes avec le végétal. Après ingestion, les sucs digestifs lysent la coque, et libèrent la douvule qui gagne le foie et les voies biliaires. La douvule traverse le parenchyme hépatique en y créant des lésions avant de s'installer dans les voies biliaires où elle devient adulte 3 mois après la contamination.



Figure 13 : Adultes de *Fasciola hepatica* dans les voies biliaires d'un foie de bovin

- **Signes cliniques**

Les douvules créent des lésions au cours de leur cheminement dans le parenchyme hépatique ; on note :

- Des douleurs à l'hypochondre droit
- Hépatomégalie
- Diarrhée ou de constipation

Les douves adultes sont situées dans la lumière des canaux biliaires qui sont alors dilatés avec une paroi épaisse et dure. Ces douves constituent un obstacle à l'écoulement de la bile.

Elles peuvent libérer des substances toxiques allergisantes qui entraîneront des troubles à distance (cutanées, respiratoires, nerveuses).

2.4.3. Les Cestodes : Taeniasis

Tænia saginata est un ver plat de la classe des cestodes responsables du téniasis humain, évoluant sous deux stades :

- Adulte chez l'hôte définitif
- Larvaire chez l'hôte intermédiaire.

Il vit dans l'intestin grêle de l'Homme, généralement en un seul exemplaire.

Il se présente sous la forme d'un long ruban segmenté de 4 à 10 mètres, de couleur blanc jaunâtre, mince à son extrémité antérieure, et qui s'élargit graduellement en allant vers l'extrémité postérieure.



Figure 14 : *Tænia saginata*

Le ver adulte est constitué de trois parties :

- **Le scolex (« tête »)**, qui a l'aspect d'un petit renflement de 1 à 2 mm de diamètre, pourvu de quatre ventouses



Figure 15 : Le scolex de *Taenia saginata*

- **le cou**, partie amincie, qui réunit le scolex au reste du corps qui se termine par le strobile.
- **Le strobile** représente la chaîne de segments ou anneaux, dénommés «proglottis». Les premiers anneaux sont courts et ceux qui sont mûrs sont plus longs que larges et se détachent isolément. Doués de mouvements de reptation, ces anneaux mûrs sortent activement du sphincter anal en dehors de la défécation. Les proglottis âgés et mûrs, vers la fin du strobile, peuvent contenir entre 50000 à 80000 œufs embryonnés ou «embryophores».
- **Cycle évolutif**

A maturité, les proglottis se détachent un à un du strobile. Cinq à 10 anneaux mobiles sont expulsés chaque jour de façon spontanée (rarement avec les selles).

Dans le milieu extérieur, les anneaux sont lysés et libèrent les œufs qui sont très résistants dans le milieu extérieur. Les œufs ingérés par les bovins qui sont les hôtes intermédiaires, éclosent dans le tube digestif, libérant les embryons hexacanthés (oncosphères) (larves pourvues de 6 crochets).

Les embryons libérés traversent la muqueuse intestinale à l'aide de leurs crochets et de sécrétions lytiques. Ils migrent via la voie sanguine et lymphatique vers les muscles squelettiques et le cœur où ils se transforment en larves cysticerques.

L'homme se contaminera alors en mangeant de la viande contaminée peu cuite ou crue. Une fois ingérés, le scolex est libéré, puis le ténia se développe dans l'intestin grêle et en trois mois, les anneaux mûrs passent activement le sphincter anal.

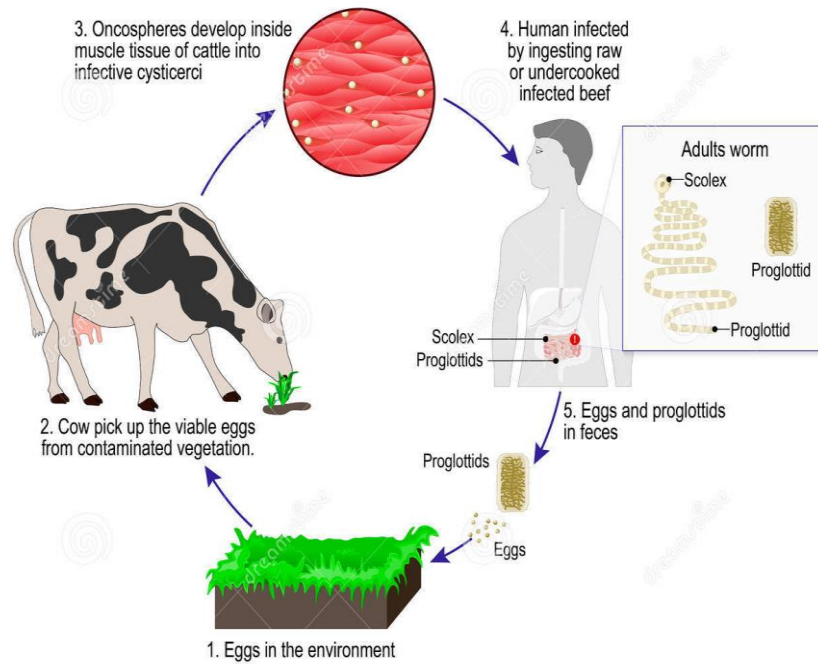


Figure 16 : Cycle évolutif de *Taenia saginata*

- **Signes cliniques**

La majorité des cas sont asymptomatiques. L'infection est le plus souvent constatée par la présence de proglottis dans les selles et parfois par une sensation d'inconfort péri-anal lors de l'émission des proglottis.

Le ténia peut toutefois provoquer :

- des douleurs abdominales
- des nausées
- amaigrissement
- Perte de l'appétit
- des éruptions cutanées
- de la fatigue

2.4.4. Les Cestodes : Echinococcoses ou l'hydatidose

L'hydatidose est due au développement chez l'homme de la forme larvaire d'un petit ténia: *Echinococcus granulosus*, vivant à l'état adulte dans le tube digestif du chien.

Echinococcus granulosus est un petit ténia, mesurant 2 à 6 mm. Son scolex porte 4 ventouses et est muni d'un rostre armé d'une double couronne de crochets. Le cou est très court et le strobile est constitué de 3 anneaux dont seul le dernier contient des centaines d'œufs.

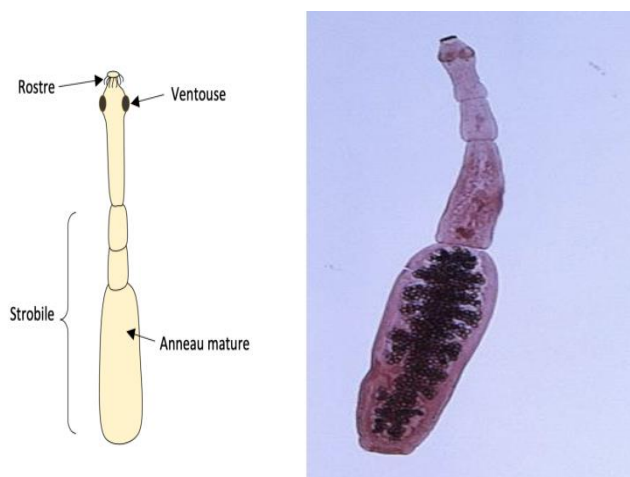


Figure 17 : *Echinococcus granulosus*

- **Cycle Evolutif**

Les adultes vivent dans l'intestin grêle du chien. Le dernier anneau mûr libère les œufs qui souillent le sol et les végétaux.

Les œufs sont ingérés par les mammifères herbivores (le mouton surtout, le bœuf, chèvres...). L'embryon hexacanthé est libéré dans le tube digestif de l'hôte intermédiaire, il traverse la paroi intestinale et va se développer dans le foie ou le poumon (ou autre organe) pour donner un kyste hydatique qui renferme des centaines de milliers de protoscolex. Ces protoscolex donneront de futures têtes de ténia (scolex)

L'hôte définitif (chien) se contamine par ingestion de l'hydatide présente dans divers organes de l'hôte intermédiaire et chaque scolex du kyste hydatique dévoré donne naissance à un ténia adulte dans son intestin grêle.

L'homme constitue dans ce cycle une impasse parasitaire et ne représente qu'un hôte intermédiaire accidentel.

Comme pour l'herbivore, il se contamine par ingestion d'œufs soit au contact du chien infesté avec des œufs sur son pelage soit par l'intermédiaire d'aliments souillés par les matières fécales du chien infesté (fruits, légumes, eau).

L'embryon hexacanthé est libéré dans le tube digestif, traverse la paroi intestinale et va se développer dans le foie ou le poumon ou dans n'importe quel autre point de l'organisme pour donner un kyste hydatique

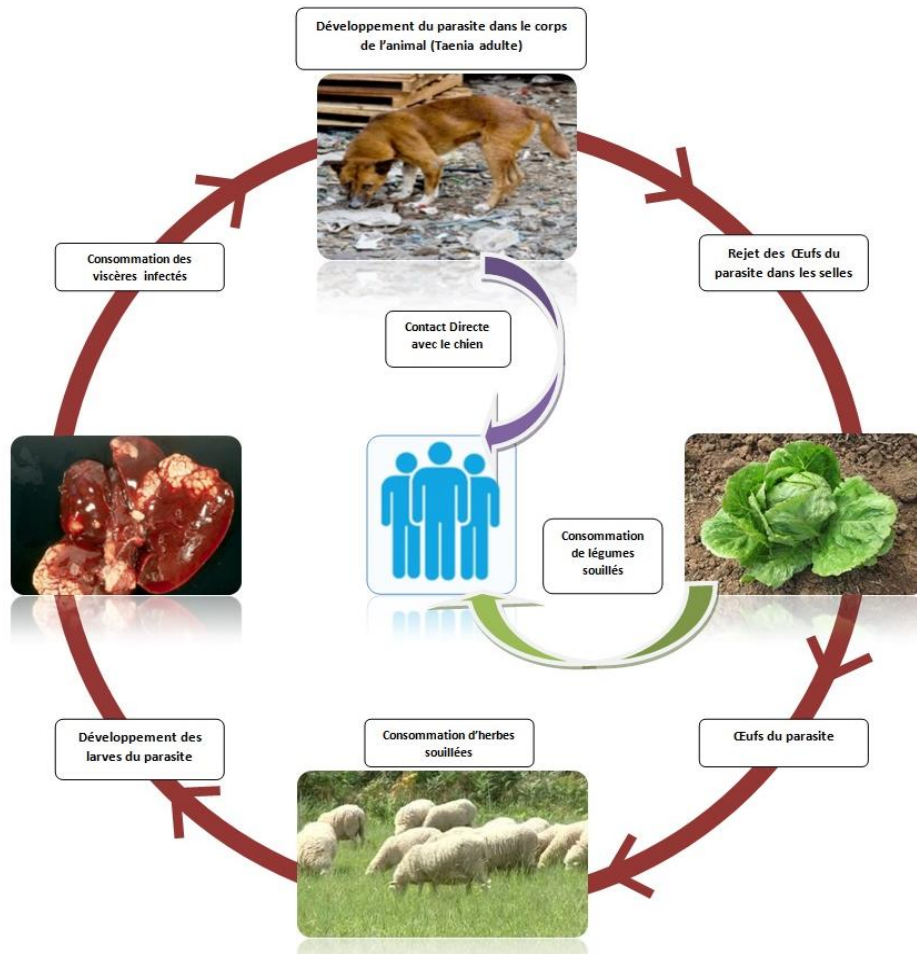


Figure 18 : Cycle évolutif d'*Echinococcus granulosus*



Figures 19: Kystes hydatiques

- **Signes cliniques**

Les kystes du foie peuvent se manifester par des douleurs abdominales et un ictère en cas d'obstruction des canaux biliaires.

La rupture du kyste dans la voie biliaire ou dans les poumons peut entraîner de la fièvre, une urticaire ou une grave réaction anaphylactique.

Les kystes pulmonaires peuvent se rompre en provoquant une toux, des douleurs thoraciques et une hémoptysie.

Urticaire: Maladie dermatologique caractérisée par l'apparition de plaques rouges en relief accompagnée de démangeaisons et d'une sensation de brûlure

Le choc anaphylactique: est une réaction allergique immédiate, grave et généralisée qui affecte l'organisme dans son ensemble après contact avec un aliment, un médicament ou après une piqûre d'insecte.

L'hémoptysie: est un rejet du sang en provenance des voies respiratoires

III- Les analyses Microbiologiques

1- Préparation de l'échantillon

Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera homogénéisé (échantillon liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile (échantillon solide)

Pour les produits liquides, (ou semi-liquides) une agitation manuelle vigoureuse en présence de billes de verre permet d'obtenir une homogénéité satisfaisante.

Pour les produits solides, diverses techniques de broyage sont utilisables :

- Broyage manuel au mortier en présence de sable stérile ou de billes de verre
- Broyage mécanique avec un broyeur du type STOMACHER. Cet appareil permet de disperser l'aliment dans le diluant en utilisant des sacs en plastiques stériles à usage unique.

Au cours de la préparation des échantillons (et des dilutions), un diluant doit être ajouté. Les diluants les plus utilisés durant le contrôle microbiologique des aliments et leur composition sont illustrés dans le tableau

Les milieux tryptone-sel et eau peptonée tamponnée permettent, dans des conditions particulières (température, temps), de réaliser une revivification.

Tableau 1: composition des différents diluants (Tous les diluants sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes)

Tryptone sel	Ringer (solution mère)	Eau physiologique	Eau peptonée tamponnée
tryptone 1 g NaCl 8,5 g eau D 1000 ml pH = 7	NaCl 9 g KCl 0,42 g CaCl 0,48 g NaHCO ₃ 0,2 g Eau D 1000 ml	NaCl 9 g Eau D 1000 ml	bacto peptone 20 g NaCl 5 g Na HPO 9 g K H PO 1,5 g Eau D 1000 ml pH = 7,2

2- Revivification

La présence de cellules endommagées dans l'échantillon peut entraîner des variations dans les numérations et porter à croire qu'il n'y a pas ou peu de germes et donc pas de risque pour le consommateur. Ceci est particulièrement important quand il s'agit de déterminer si des micro-organismes pathogènes sont présents ou non.

La revivification peut être réalisée dès la première étape de l'analyse au cours de laquelle le produit est additionné de diluant. Il suffit alors de choisir un diluant de composition favorable et d'incuber le tout à la température optimale de croissance du germe à rechercher pendant un temps qui variera en fonction du type d'analyse réalisé :

- Dans le cas où la numération des germes doit être réalisée, la durée d'incubation ne permettant pas la multiplication des cellules.
- Dans les épreuves du type présence ou absence, la revivification est obtenue par un pré-enrichissement dans un milieu favorable. La durée d'incubation peut être relativement longue (supérieure au temps de latence + temps de doublement) car la multiplication des germes à rechercher est dans ce cas très souhaitable.

3- Techniques générales de numération et/ou de recherche des bactéries responsables des altérations de la qualité des aliments

3.1. Flore totale aérobie mésophile

Le dénombrement des germes totaux concerne surtout les bactéries aérobies mésophiles revivifiables après 72 h d'incubation à 30°C dans un milieu de culture.

- 1 ml de la suspension mère et de ses dilutions est ensemencé dans la masse du milieu gélosé de numération (PCA).
- Faire des mouvements circulaires en forme de 8 pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose
- Après solidification, il est recommandé de couler à la surface du milieu ensemencé une mince couche de gélose blanche (4 ml de gélose à 1,5 %).
- La lecture se fait après 72 heures d'incubation à 30°C.
- Les colonies se présentent sous forme lenticulaires en masse

3.2. La flore fongique : les levures et moisissures

Les levures et moisissures sont des microorganismes qui, après ensemencement en surface sur un milieu inhibiteur pour les bactéries aérobies (gélose OGA : Oxytétracycline-Glucose-Agar), forment des colonies après une incubation à 20°C pendant 5 jours.

- A partir des dilutions porter aseptiquement 4 gouttes par dilution sur la boîte d'OGA puis les étaler à l'aide d'un râteau stérile.
- Faire de la même façon une boîte « témoin diluant » à l'aide de 4 gouttes du diluant utilisé et une boîte « témoin milieu » incubée telle quelle.
- L'incubation de ces boîtes se fait à température ambiante, couvercle en haut, pendant 5 jours.
- La première lecture doit se faire à partir de la 48^{ème} heure d'incubation ; elle consiste d'abord en la lecture des deux boîtes témoins car si l'une d'entre elles présente des levures ou des moisissures, l'analyse est à refaire. Dans le cas échéant dénombrer les colonies de levures à part et les colonies de moisissures à part.

3.3. Les coliformes

La colimétrie, c'est à dire la numération des coliformes, peut être réalisée soit en milieu liquide, soit en milieu solide (par ensemencement dans la gélose ou après filtration).

3.3.1. Dénombrement en milieu solide

- Préparer la solution mère et les dilutions
- A partir des dilutions, ensemencer en masse le milieu VRBL (gélose bilié au cristal violet et au rouge neutre).
- Faire des mouvements circulaires en forme de 8 pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose
- les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 à 48h à :
 - 37°C pour la première série : recherche des coliformes totaux
 - 44°C pour la deuxième série : recherche des coliformes fécaux
- Après incubation, les coliformes totaux et fécaux apparaissent en masse sous forme de petites colonies de couleur rouge foncé de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm, fluorescentes.

- Identification d'*E. coli* : un milieu EMB est inoculé à partir des cultures positives sur milieu VRBL (isolement par la méthode des cadrans). Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies lactose + sont identifiées par la méthode classique (Kligler, citrate, mannitol-mobilité, urée-indole, Clark et Lubs). On considère comme *E. coli* toute souche glucose+ lactose + donnant les caractères : indole+, RM+, VP-, citrate-, Gaz+, mannitol+ et uréase-.

3.3.2. Dénombrement en milieu liquide

Cette technique fait appel à deux tests consécutifs :

- ✓ le test de présomption pour le dénombrement des coliformes totaux
- ✓ le test de confirmation (test de Mac Kenzie) pour le dénombrement des coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

❖ Test de présomption

Préparer dans un portoir une série de tube contenant le milieu sélectif BLBVB (bouillon lactosé bilé au vert brillant : Le vert brillant inhibe les germes Gram+ et la bile inhibe la plupart des germes qui ne sont pas d'origine intestinale) à raison de trois tubes pour chaque dilution. Les tubes sont préalablement munis d'une cloche de Durham

- A partir de chaque dilution, porter aseptiquement 1ml dans chacun des trois tubes correspondant à la même dilution
- Chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham
- Incuber à 37°C pendant 24 à 48h
- Lecture : sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois un dégagement gazeux et un trouble microbien
- La lecture finale s'effectue en se référant à la table de Mac Grady

Exemple

Dilution	Test de présomption			Nombre caractéristique
	Tube 1	Tube 2	Tube 3	
10^{-1}	+	+	+	3
10^{-2}	+	+	-	2
10^{-3}	-	-	+	1

Le nombre caractéristique est 321, ce qui correspond sur la table de Mac Grady au nombre de 15.

On considère alors qu'il y a 15 coliformes par ml à la dilution 10^{-1}

On a 150 coliformes totaux par ml dans l'échantillon (si l'échantillon est liquide)

On a 15×10^2 coliformes totaux par gr d'échantillon (si l'échantillon est solide)

❖ Test de confirmation ou test de Mac Kenzie

➤ Les tubes trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage dans :

- un tube de BLBVB muni d'une cloche de Durham
 - un tube d'eau peptonée exempte d'indole
- Incuber à 44°C pendant 24h
- Lecture : sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :
- Trouble avec dégagement gazeux (sur milieu BLBVB)
 - Production d'indole mis en évidence par addition de réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée (formation d'un anneau rouge).
- La lecture finale s'effectue également en se référant à la table de Mac Grady

Exemple

Dilution	Test de présomption	Nombre caractéristique	Test de confirmation		Nombre caractéristique
			VBL ou BLBVB	E.P.E.I	
10 ⁻¹	+	3	+	+	2
	+		+	+	
	+		+	-	
10 ⁻²	+	2	+	-	1
	+		+	+	
	-				
10 ⁻³	-	1			1
	-				
	+		+	+	

Le nombre caractéristique est 211 ce qui correspond sur la table de Mac Grady à 2.0 coliformes fécaux à la dilution 10⁻¹

On a 20 coliformes fécaux par ml dans l'échantillon (si l'échantillon est liquide)

On a 200 coliformes fécaux par gr d'échantillon (si l'échantillon est solide)

Remarque

Etant donné que les coliformes fécaux font partie des coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de coliformes fécaux que de coliformes totaux.

3.3.3. Colimétrie de l'eau (en utilisant le milieu BCPL : Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromocrésol)

❖ Test de présomption

- A partir de l'eau à analysée, porter aseptiquement :
 - 50ml dans un flacon contenant 50ml de milieu BCPL D/C
 - 5 fois 10ml dans 5 tubes contenant 10ml de milieu BCPL D/C
 - 5 fois 1ml dans 5 tubes contenant 10ml de milieu BCPL S/C
- Chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham
- Incuber à 37°C pendant 24 à 48h
- Lecture : sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :
 - Trouble microbien avec virage du milieu au jaune
 - Dégagement gazeux

- La lecture finale s'effectue en se référant à la table de Mac Grady

Exemple

	Test de présomption	Nombre caractéristique
1 X 50ml	+	1
5 X 10ml	+ + + - -	3
5 X 1ml	+ + - - -	2

Le nombre caractéristique est 132 ce qui correspond sur la table de Mac Grady à 14

On considère alors qu'il y a 14 coliformes totaux dans 100ml d'eau à analyser

❖ Test de confirmation ou test de Mac Kenzie

➤ Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans des tubes contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham.

- L'incubation se fait à 44°C pendant 24 heures.
- Lecture : seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :
 - Un dégagement gazeux
 - Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après addition de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs.
- La lecture finale s'effectue en se référant à la table de Mac Grady

3.3.4. Méthode par filtration sur membrane

La filtration est effectuée sur membrane d'ester de cellulose de porosité 0,22 μ ou 0,45 μ susceptible de retenir les bactéries. La technique est la suivante :

- Stériliser l'entonnoir et la plaque poreuse à l'aide d'un bec-bunsen ;
- Mettre de façon aseptique une membrane filtrante en utilisant une pince stérile;
- Verser aseptiquement un volume de d'eau à analyser ;
- Actionner la pompe à vide pour absorber l'eau à travers la membrane ;
- Retirer la membrane et la placer immédiatement et aseptiquement sur la surface de la Gélose TTC au Tergitol
- Incuber la 1ère boîte à 37°C, 2ème boîte à 44°C pendant 24 à 48h
- Lecture : Dénombrer les colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentées en jaune orangé ou en jaune (lac +) ;

3.4. Les streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux sont recherchés et dénombrés en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable

Cette technique fait appel à deux tests :

- Test de présomption : pour la recherche des Streptocoques sur milieu Rothe
- Test de confirmation : pour la confirmation et le dénombrement des streptocoques sur milieu EVA Lytski

❖ Test de présomption

- Préparer dans un portoir une série de tube contenant le milieu Rothe à raison de trois tubes pour chaque dilution
- A partir de chaque dilution, porter aseptiquement 1ml dans chacun des trois tubes correspondant à la même dilution
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum
- Incuber à 37°C pendant 24 à 48h
- Lecture : sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien
- Aucun dénombrement ne se fait à ce niveau

❖ **Test de confirmation ou test de Mac Kenzie**

- Tous les tubes de Rothe trouvés positifs feront l'objet d'un repiquage dans le milieu EVA Lytski
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum
- Incuber à 37°C pendant 24 à 48h
- Lecture : sont considérés comme positifs les tubes présentant :
 - un trouble microbien
 - une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube

Exemple

Dilution	Test de présomption Milieu Rothe	Test de confirmation Milieu EVA	Nombre caractéristique
10 ⁻¹	+	+	1
	-		
	+	-	
10 ⁻²	+	-	0
	+	-	
	-		
10 ⁻³	-		1
	-		
	+	+	

Le nombre caractéristique est 101, ce qui correspond à 0,7 sur la table de Mac Grady.

On considère qu'il y a 0,7 streptocoques fécaux à la dilution 10⁻¹

On a 7 streptocoques fécaux par ml dans l'échantillon (si l'échantillon est liquide)

On a 70 streptocoques fécaux par gr d'échantillon (si l'échantillon est solide)

❖ **Isolement de streptocoques**

L'isolement à partir des tubes d'Eva positifs sur milieu Barnes puis leur incubation à 37°C pendant 24h à 48h permet d'avoir quelques indications sur les espèces de Streptocoques du groupe D :

- *S. faecalis* : colonie à centre rouge, auréole blanche
- *S. faecium* : colonie blanche ou rosée
- *S. durans* : colonie blanche
- *S. bovis* : très petite colonie rosée
- *S. lactis* : colonie rouge très foncé.

3.5. Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridium* sulfito-réducteurs)

➤ On utilise le milieu VF (Viande-Foie) additionné d'une ampoule d'alun de fer et une ampoule de sulfite de sodium

➤ Les tubes contenant les dilutions seront soumis à un chauffage à 80°C pendant 10min puis un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet dans le but d'éliminer les formes végétatives et de garder que les formes sporulées.

➤ A partir de ces dilutions, porter aseptiquement 1ml de chaque dilution (5ml pour l'eau) en double dans deux tubes à vis stériles de 16mm de diamètre, puis ajouter environ 15ml de gélose VF dans chaque tube.

➤ Mélanger doucement le milieu et l'inoculum

➤ Laisser solidifier sur paillasse puis incuber à 37°C

➤ Lecture : Faire une première lecture 16 h après incubation, puis après 24h et une dernière après 48 h.

➤ Dénombrer toute colonie noire de 0,5 mm de diamètre, ayant poussé en masse.

3.6. *Clostridium perfringens*

Parmi les milieux de numération, le milieu TSN (Milieu trypticase - sulfite – néomycine) et le milieu TSC (Milieu tryptose - sulfite – cyclosérine) sont les plus utilisés. Ces milieux sont rendus sélectifs par l'addition d'antibiotiques la néomycine et la polymyxine B ou la D cyclosérine.

➤ A partir de la dilution 10^{-1} , porter aseptiquement 1ml en double dans deux tubes à vis stériles de 16mm de diamètre, puis ajouter environ 15ml de milieu TSN ou TSC dans chaque tube.

- Mélanger doucement le milieu et l'inoculum
- Laisser solidifier sur paillasse puis incuber à 46°C
- Dénombrer les colonies noires
- On peut confirmer l'espèce par une identification biochimique
- Les bacilles immobiles anaérobies stricts, Gram +, qui donnent des colonies noires en milieu TSN ou TSC, lécithinase +, réduisant les nitrates en nitrites, lactose+, gélatinase+ sont considérés comme *C. perfringens*.

3.7. *Vibrio cholerae*

❖ Enrichissement et isolement

La première étape est l'enrichissement qui consiste en une succession de cultures en eau peptonée hypersalée alcaline (EPSA) ou en eau peptonée alcaline (EPA), qui ont pour objectif de sélectionner le vibron cholérique par son aptitude à se multiplier en milieu alcalin et salé plus rapidement que les autres germes.

Dès qu'un tube d'EPSA ou d'EPA est trouble après 7 à 8 heures d'incubation à 37°C, la culture est isolée sur une gélose nutritive alcaline (GNA) et sur une gélose sélective thiosulfate-citrate-bile-saccharose (TCBS).

Pour le repiquage et l'isolement à partir des tubes d'enrichissement, il faut prélever délicatement sous la surface de l'eau peptonée, sans agiter le tube car ces germes sont aérobies préférentiels et forment des voiles à la surface des milieux de culture liquides.

Le milieu sélectif TCBS différencie *V. cholerae* des autres bactéries par sa capacité à se développer sur ce milieu et à fermenter le saccharose, ce qui entraîne un virage de l'indicateur coloré du milieu du vert au jaune après 18 à 24 heures de croissance à 37°C. Les colonies

suspectes sont larges (2 à 4 mm de diamètre), brillantes, légèrement aplaties et de couleur jaune. Les colonies suspectes doivent être repiquées sur gélose nutritive alcaline avant d'effectuer des tests supplémentaires.

❖ Tests biochimiques

V. cholerae est une bactérie aéro-anaérobie, oxydase+, ADH-, LDC+, ODC+, indole+, uréase -H₂S-, ONPG+. Cette bactérie fermente sans production de gaz le mannose, le mannitol, le saccharose mais ne fermente pas l'arabinose et le lactose. Elle produit une lécithinase, une lipase et une amylase.

❖ Agglutination avec les sérums anti-O1 et anti-O139

- Déposer sur une première lame une goutte d'eau physiologique stérile et à côté une goutte de sérum anti-O1
- Prélever à l'anse de platine quelques colonies et les déposer sur la lame à côté de chacune des gouttes d'eau physiologique et de sérum anti-O1
- Avec l'anse de platine, mélanger doucement et progressivement les bactéries dans chacune des gouttes. Commencer par la goutte d'eau physiologique, continuer par le sérum anti-O1. La suspension doit être bien homogène. Agiter doucement par un mouvement tournant.
- L'agglutination doit apparaître rapidement - en moins de 2 min. - et être fine et régulière.
- Si la souche n'est pas auto-agglutinable et n'agglutine pas avec le sérum anti-O1, rechercher l'agglutination avec le sérum anti-O139 en déposant sur une seconde lame une goutte de sérum anti-O139.

3.8. *Staphylococcus aureus*

3.8.1. Numération sur milieu de Baird Parker

- Au moment de l'emploi, faire fondre un flacon contenant 225ml de gélose Baird Parker, le refroidir à 45°C, puis ajouter 15 ml d'une solution de jaune d'œuf au tellurite de potassium.
- Mélanger soigneusement puis répartir le milieu en boîtes de Petri.
- Laisser solidifier sur paillasse
- Ensemencer en surface à partir de la solution mère ou de ses dilutions

- Incuber 24 à 48h à 37°C

➤ *S. aureus* donne des colonies noires, brillantes, convexes, de 1,5 mm de diamètre, entourées d'un halo clair (protéolyse) de 2 à 5 mm de diamètre. Des zones opaques peuvent apparaître plus tardivement dans le halo clair ; elles sont dues à l'activité lipolytique et lécithinolytique du germe.

3.8.2. Méthode d'enrichissement au milieu Giolliti Cantonii

➤ Au moment de l'emploi, ouvrir aseptiquement un flacon contenant le milieu de Giolliti Cantonii pour y ajouter 15 ml d'une solution de tellurite de potassium

➤ A partir des dilutions, porter aseptiquement 1 ml par dilution dans un tube à vis stérile et ajouter 15 ml du milieu d'enrichissement et bien mélanger le milieu et l'inoculum

- Incuber à 37°C pendant 24 à 48h

- Lecture : Les tubes ayant virés au noir seront considérés comme positifs

➤ Pour confirmer l'identification de *S. aureus*, ces tubes feront l'objet d'un isolement sur milieu Chapman

- Les boîtes de Champanensemencées seront incubées à 37°C pendant 24 à 48h

➤ Les colonies suspectes sont de taille moyenne, lisses, brillantes, pigmentées en jaune et pourvues d'une catalase, coagulase et ADNase

➤ Expression des résultats : si le tube a noirci mais à l'isolement sur Chapman, il n'y a pas de colonies caractéristiques ; ce tube est considéré comme négatif

➤ si par exemple à la dilution 10^{-1} , le tube a noirci et à l'isolement sur Chapman, il y a des colonies caractéristiques, le nombre de *S. aureus* correspond à l'inverse de la dilution.

3.9. Bacillus

- Le milieu sélectif utilisé est le milieu de Mossel

➤ Dans chaque flacon de 90 mL de milieu de base, ajouter stérilement 10 mL d'émulsion stérile de jaune d'œuf et 1ml Polymyxine B

- Inoculer 0,1 ml de la suspension mère et de ses dilutions sur la surface du milieu.

- Incuber 48 h à 30°C.

- Il est possible de compter séparément les formes végétatives et les spores. Pour cela traiter la suspension mère à 80°C pendant 10 minutes
- *B. cereus* donne des colonies rouges plates, entourées d'un halo de précipité blanchâtre due à l'activité lécithinolytique

3.10. Méthodologie d'isolement et d'identification des *Salmonella*

La recherche des *Salmonella* dans un prélèvement alimentaire implique la réalisation successive d'un pré-enrichissement sur milieu liquide non sélectif (eau peptonée tamponnée) et d'un enrichissement sur deux milieux liquides sélectifs : bouillon au vert malachite et au chlorure de magnésium (bouillon Rappaport Vassiliadis) et bouillon au sélénite-cystine.

❖ Pré-enrichissement

- Broyer 25g de produits à analyser dans 225ml d'eau peptonée tamponnée
- Incuber à 37°C pendant 18h

❖ Enrichissement

L'enrichissement se fait à partir du milieu de pré-enrichissement de façon suivante :

- 0,1ml en double pour les tubes de Rappaport Vassiliadis (répartis à raison de 10ml par tube).
- 10ml en double pour les flacons de Sélénite Cystéine (répartis à raison de 100ml par flacon)
- Incuber un tube de Rappaport et un flacon de Sélénite Cystéine 24h à 37°C
- Incuber les deux autres 24h à 42°C

❖ Isolement

Les cultures obtenues sur les milieux d'enrichissement sont ensuite inoculées à deux milieux sélectifs gélosés.

Le premier milieu d'isolement est le milieu au vert brillant et au rouge de phénol. La sélectivité de ce milieu est assurée par une forte concentration en vert brillant. Les *Salmonella* donnent des colonies rouges (ou roses) entourées d'une zone rouge après 24h d'incubation à 37°C.

Le deuxième milieu d'isolement peut être : milieu Hektoen, Mc Conkey, XLD, DCL, SS

❖ **Identification biochimique**

Les colonies suspectes feront l'objet d'une identification biochimique

On ensemence : gélose ordinaire, TSI, ONPG, LDC, urée indol, Clark et Lubs

Les Salmonelles sont des bactéries non exigeantes glucose +, lactose-, saccharose-, β -galactosidase-, uréase-, indole- LDC+, VP-, RM+

❖ **Identification antigénique**

Elle est réalisée par une technique d'agglutination directe sur lame

- A partir d'une colonie, transférer un inoculum à deux endroits sur une lame
- sur l'un deux ajouter une goutte d'eau physiologique et bien mélanger
- si cette suspension est bien homogène et non auto-agglutinante, ajouter l'antisérum au deuxième inoculum et bien mélanger
- observer la présence d'agglutination
- L'identification du sérotype est réalisée en se reportant au tableau de Kauffmann et White qui donne la formule antigénique des sérotypes répertoriés.

Remarque

Toutes ces techniques de recherche et de dénombrement des germes sont applicables aux différents types d'aliments, avec quelques différences concernant le choix du diluant ou du milieu de culture en fonction de la nature de l'aliment ou du germe. Il est important de toujours se référer au Journal Officiel Algérien, qui précise en détail toutes les techniques à utiliser pour chaque type d'aliment, garantissant ainsi le respect des normes et des méthodes officielles en vigueur.

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

❖ Milieu PCA

Peptone..... 6g
Extrait de levure..... 3g
Agar.....15g
Eau distillée.....1L

❖ Milieu OGA (Oxytétracycline-Glucose-Agar)

Extrait de levure.....5g
Glucose20g
Agar.....12g
Eau distillée.....1L

Liquéfier le milieu stérile vers 45-50°C et ajouter 10 ml d'une solution stérile contenant 100mg d'oxytétracycline par litre de gélose fondue. Agiter en tournant doucement pour bien mélanger.

❖ Milieu VRBL (gélose bilié au cristal violet et au rouge neutre).

Peptone pepsique de viande..... 7g
Extrait autolytique de levure.....3g
Lactose.....10g
Sels biliaires 1,5g
Chlorure de sodium.....5g
Rouge neutre.....30mg
Cristal violet.....2mg
Agar agar12g
Eau distillée.....1L

pH 7,4.

La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaires assure l'inhibition des bactéries à Gram positif. La fermentation du lactose se traduit par une acidification, révélée par le virage au rouge de l'indicateur pH (rouge neutre), et par la précipitation d'acides biliaires autour des colonies.

❖ **Milieu EMB**

Peptone	10g
Lactose	10g
Eosine	0,4g
Bleu de méthylène.....	0,065g
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Agar	15g
Eau distillée.....	1L

Ce milieu contient l'éosine et le bleu de méthylène qui inhibent la majeure partie de la flore Gram+ (sauf Streptocoques D). L'éosine et le bleu de méthylène sont des indicateurs redox donnant l'aspect métallique aux colonies de bactéries lactose positif.

Bien que les Entérobactéries lactose - puissent s'y développer, la culture des Entérobactéries lactose + y est favorisée.

Le milieu contient un critère de différenciation, le lactose.

- lactose + : colonies violet foncé d'aspect métallique
- lactose - : colonies grisâtres ou incolores

❖ **Composition du milieu BLBVB**

Peptone.....	10g
Bile.....	20g
Lactose.....	10g
Vert brillant.....	0,013g
pH 7,2	

Ce milieu contient un critère de différenciation : le lactose dont la fermentation est révélée par la présence de gaz s'accumulant dans la cloche. Il contient 2 inhibiteurs des bactéries Gram+ : la bile et le vert brillant.

❖ **Milieu BCPL : Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromocrésol**

Peptone5g

Extrait de viande3g

Lactose.....5g

Pourpre de bromocrésol.....25,0 mg

pH 6,7

La fermentation du lactose est révélée, en présence de pourpre de bromocrésol, par le virage du bleu violacé au jaune et par la présence de gaz s'accumulant dans la cloche

❖ **Milieu Schubert**

Tryptone.....10g

Tryptophane.....0,2g

Acide glutamique.....0,2g

Mannitol.....7,5g

Sulfate de magnésium.....7,5g

Sulfate d'ammonium.....0,4g

Citrate de sodium.....0,5g

NaCl.....2g

Phosphate disodique.....4g

pH 7,6

Ce milieu permet de mettre en évidence deux caractères :

- la fermentation du mannitol qui se traduit par une turbidité associée à la production de gaz
- production d'indole mise en évidence par la formation d'un anneau rouge après l'ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs

❖ **Gélose TTC au Tergitol**

Peptone10g

Extrait de levure..... 6g

Extrait de viande5g

Lactose20g

Bleu de bromothymol0,05g

Agar15g

pH 7,2

Ajouter aseptiquement une solution stérile contenant 25 mg de T.T.C. (triphényl-2,3,5-tétrazolium) et 5 ml d'une solution stérile de Tergitol® 7 à 0,2% par litre de base. Bien homogénéiser. Ne pas re-chauffer après addition du TTC.

Le Tergitol 7 permet de sélectionner les coliformes et inhibe aussi l'envahissement par *Proteus* et le TTC montre le pouvoir réducteur des bactéries

L'utilisation du lactose est révélée par le virage du bleu de bromothymol

- colonie rose-rouge : réduction du TTC
- colonie jaune : absence de réduction du TTC
- halo bleu-vert : lactose –
- halo jaune : lactose +

❖ **Milieu de ROTHE**

Peptone20g

Glucose5g

NaCl5g

KH₂PO₄..... 2,7g

K₂HPO₄2,7g

Azide de sodium0,2g

Eau distillée1L

pH = 6,8.

Ce milieu contient de l'azide de sodium (NaN_3) qui inhibe la plupart des microorganismes. Ce milieu est peu favorable à la croissance des Streptocoques fécaux et la plupart des autres bactéries n'y cultivent pas. Le milieu de ROTHE est cependant moins sélectif que le milieu de LITZKY, ce qui le fait utiliser en premier, les germes "adaptés" à l'effet inhibiteur de l'azide étant ensuite à même de s'adapter à la présence d'éthyl violet.

L'addition d'éthyl violet au milieu de Rothe le rend sélectif des seuls streptocoques fécaux.

Le milieu de LITZKY utilisé est en fait de milieu de Rothe additionné de 0,5 mg d'éthyl violet par litre.

❖ **Milieu Barnes**

Peptone10 g

Extrait de viande10 g

Glucose10 g

Agar15 g

Eau distillée1L

pH = 6

Après stérilisation à 120°C pendant 15 minutes, ajouter 1 ml d'acétate de thallium à 5 % et 1ml de chlorure de triphényltétrazolium à 1 %

L'acétate de thallium inhibe les germes Gram- sauf *Proteus hauseri* . *Micrococcus* et *Lactobacillus* peuvent cultiver sur ce milieu. L'apparition d'une coloration rouge indique que le TTC est réduit en formazan.

❖ **Milieu TSN (Milieu trypticase - sulfite – néomycine)**

Peptone de caséine15g

Extrait de levure10g

Sulfite de sodium1g

Citrate de fer ammoniacal0,5g

Sulfate de polymyxine B50mg

Sulfate de néomycine20mg

Agar13,5g

Eau distillée1L

pH = 7,2.

❖ **Milieu TSC (Milieu tryptose - sulfite – cyclosérine)**

Tryptone15g

Extrait de levure..... 5g

Peptone papainique de soja5g

Citrate ferrique ammoniacal1g

Métabisulfite de sodium1g

D cyclosérine..... 0,4 g

Agar20g

Eau distillée1L

pH = 7,6.

L'addition de 8 ml de jaune d'œuf dilué au 1/2 par de l'eau physiologique pour 100 ml de milieu permet de visualiser l'activité lécithinase du germe (halo opaque). Dans ce cas le produit et ses dilutions sont étalés à raison de 100 µl par boîte à la surface d'un milieu préalablement coulé en boîte de Pétri et incubé en anaérobiose (jarre).

❖ **Milieu thiosulfate-citrate-bile-saccharose (TCBS).**

Peptone de caséine5g

Peptone de viande5g

Citrate de sodium ,,10g

Citrate de fer III ,,1g

Bile de bœuf desséchée ,,8g

Thiosulfate de sodium ,,10g

NaCl ,,10g

Saccharose ,,20g

Bleu de bromothymol ,,0,04g

Bleu de thymol0,04g

Agar14g

Eau distillée (qsp)1000mL

pH 8,6

La forte concentration en bile et en citrate, associée à un pH élevé (pH = 8,6) permet l'élimination de nombreuses bactéries. La croissance des Entérobactéries et des Enterococcus n'est cependant que ralentie.

La présence de saccharose et de deux indicateurs de pH (le bleu de bromothymol et le bleu de thymol) permet de connaître le caractère saccharose des bactéries.

- colonies jaunes : saccharose +
- colonies vertes ou bleues : saccharose –

Le thiosulfate de sodium est une source de soufre à partir de laquelle certaines bactéries forment du sulfure d'hydrogène (H_2S). Ce dernier réagit avec les ions ferriques pour former un précipité noir de sulfure de fer.

- colonies à centre noir : H_2S +
- colonies sans centre noir : H_2S –

❖ Milieu de Baird Parker

Tryptone..... 10g

Sodium pyruvate..... 10.g

Glycine..... 12g

Extrait de viande..... 5g

Chlorure de lithium..... 5g

Extrait de levure..... 1g

Agar.....17g

pH 7.2

Après stérilisation, laisser refroidir à 50°C et ajouter 50 ml d'émulsion stérile de jaune d'œuf au Tellurite. En option, on peut ajouter une solution stérile de sulfaméthazine à 0,05 g/l pour

éviter l'envahissement de *Proteus*. Une fois préparé, le milieu ne doit pas être réchauffé ni stérilisé à nouveau.

Ce milieu permet une bonne différenciation des souches à coagulase positive. La croissance des bactéries associées est généralement supprimée par la concentration élevée en lithium, glycine et pyruvate. Le pyruvate et la glycine améliorent et stimulent la croissance des staphylocoques.

La présence de tellurite et de jaune d'œuf, qui doivent être ajoutés au milieu après stérilisation, permet la différenciation des colonies de staphylocoques présumées pathogènes. Il existe une forte corrélation entre le test de la coagulase et la présence d'une lécithinase staphylococcique. Des études montrent que près de 100% des staphylocoques à coagulase positive sont capables de réduire la tellurite, qui produit des colonies noires, alors que d'autres staphylocoques ne peuvent pas toujours le faire.

Les critères de lectures sont les suivants :

- Réduction des tellurites donnant des colonies noires
- lipoprotéinase : on observe une clarification de la gélose autour de la strie d'ensemencement.
- lécithinase : l'action de la lécithinase libère de la choline soluble et un diglycéride peu soluble qui précipite dans le milieu provoquant un trouble dont les limites n'excèdent pas celles de la zone transparente précédente.

❖ **Milieu Giolliti Cantonii**

Tryptone.....10g
Extrait de viande de bœuf.....5g
Extrait de levure.....5g
Chlorure de lithium.....5g
Mannitol.....20g
Chlorure de sodium.....5g
Glycocolle.....1,2g
Pyruvate de sodium.....3g
pH 6,9

Après stérilisation, refroidir rapidement et ajouter stérilement 0,3 ml de solution de tellurite de potassium à 3,5 %

❖ **Milieu Chapman**

Peptones10g
Extrait de viande de bœuf1g
D-mannitol10g
Chlorure de sodium75g
Rouge de phénol0,025g
Agar15g

pH 7,4

Le pouvoir sélectif de ce milieu repose sur sa concentration très élevée en NaCl (75 g/L). Il sélectionne donc les bactéries halotolérantes comme les *Staphylococcus*.

La présence de mannitol et de rouge de phénol permet de connaître le caractère mannitol des bactéries.

- le milieu devient jaune : mannitol +
- le milieu reste rouge : mannitol –

❖ **Milieu Mossel**

Tryptone 10g
Extrait de viande 1g
D-mannitol..... 10g
Chlorure de sodium..... 10g
Rouge de phénol..... 25mg
Agar agar..... 13,5g

pH 7,2

Après autoclavage, dans chaque flacon de 90 mL de milieu de base, ajouter stérilement 10 mL d'émulsion stérile de jaune d'œuf et 1ml Polymyxine B

❖ **Bouillon Rappaport Vassiliadis**

Tryptone4,54g

Chlorure de magnésium anhydre13,4g

Chlorure de sodium7,2g

Phosphate monopotassique1,45g

Oxalate de vert de malachite0,036g

pH 5,2

Ce milieu montre une sélectivité plus élevée envers *Salmonella* et produit de meilleurs rendements que d'autres milieux similaires, en particulier après un enrichissement préalable et à une température d'incubation de $41 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. La malachite verte, le pH bas et le chlorure de magnésium inhibent la croissance des micro-organismes normalement présents dans l'intestin mais n'affectent pas la prolifération de la plupart des *Salmonella*.

❖ **Bouillon au sélénite-cystine**

Tryptone5g

Lactose4g

Sélénite acide de sodium4g

Phosphate disodique10g

L-cystine0,01g

pH 7,0

Le principe de ce milieu repose sur l'aptitude des *Salmonella* à se développer en présence de sélénite, ce dernier inhibe la plupart des autres bactéries.

❖ **Milieu au vert brillant et au rouge de phénol**

Extrait de boeuf	5 g
Peptone	10 g
Extrait de levure	3 g
Phosphate Disodium	1 g
Phosphate Monosodium	0,6 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
Rouge de phénol	0,09g
Vert Brillant	4,7 mg
Agar	12 g
pH 6,9	

❖ **Milieu Hektoen**

Peptone pepsique de viande	12g
Extrait autolytique de levure.....	3g
Lactose.....	12g
Saccharose	12g
Salicine.....	2g
Sels biliaires	9g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium	5g
Citrate ferrique ammoniacal.....	1,5g
Bleu de bromothymol	65mg
Fuchsine acide	0,1g
Agar agar bactériologique.....	13,5g

pH 7,4 - 7,7.

Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu. Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur saumon, les autres donnant des colonies bleues ou vertes. Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en saumon les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les microorganismes lactose-négatif. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies.

❖ **Milieu Mc Conkey**

Peptone pancréatique de gélatine	17g
Tryptone	1,5g
Peptone pepsique de viande	1,5g
Lactose.....	10g
Sels biliaires	1,5g
Chlorure de sodium.....	5g
Rouge neutre	30mg
Cristal violet.....	1mg
Agar	13,5g

pH 7,1

Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram+, les sels biliaires et le cristal violet.

Le milieu contient un critère de différenciation, le lactose dont l'utilisation est révélée par l'indicateur coloré du milieu, le rouge neutre. Il vire au rouge en milieu acide

Colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur du à la précipitation des sels biliaires: lactose+

Colonies jaunes ou incolores : lactose-

❖ **Milieu XLD** (Xylose-Lysine-Désoxycholate)

Extrait autolytique de levure.....	3g
L-Lysine.....	5g
Lactose.....	7,5g
Saccharose.....	7,5g
Xylose.....	3,5g
Désoxycholate de sodium.....	2,5g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium	6,8g
Citrate ferrique ammoniacal.....	0,8g
Rouge de phénol.....	80mg
Agar.....	13,5g
pH 7,4	

Ce milieu permet une orientation de l'identification des entérobactéries basée sur 3 critères : fermentation des sucres, décarboxylation de la lysine et production d'H₂S.

On différencie les *Salmonella* des germes non-pathogènes fermentant le xylose par incorporation de lysine dans le milieu. Les *Salmonella* fermentent le xylose et décarboxylent la lysine avec alcalinisation du pH. Les colonies qui se développent sont de couleur rouge en présence de l'indicateur, le rouge de phénol.

Le taux d'acide élevé produit par la fermentation du lactose et du saccharose empêche l'alcalinisation du milieu par les coliformes lysine +

En milieu alcalin et par réduction du citrate ferrique ammoniacal, les germes pathogènes producteurs de sulfure d'hydrogène se manifestent par un noircissement qui est dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies. Les germes non pathogènes qui ne décarboxylent pas la lysine produisent une acidification résultant des fermentations des sucres. L'abaissement de pH s'oppose au noircissement des colonies.

❖ **Milieu DCL (désoxycholate, citrate, lactose)**

Peptone5 g
Extrait de viande5 g
Citrate de sodium8,5 g
Thiosulfate de sodium5,4 g
Citrate ferrique1 g
Désoxycholate de sodium5 g
Lactose10 g
Rouge neutre20 mg
Agar16 g
pH = 7,3.

❖ **Milieu SS (*Salmonella Shigella*)**

Peptone5 g
Extrait de viande5 g
Sels biliaires8,5 g
Citrate de sodium10 g
Thiosulfate de sodium8,5 g
Citrate de fer1 g
Lactose10 g
Rouge neutre25 mg
Vert brillant0,33 mg
Agar..... 15 g
pH = 7

Tables de Mac Grady

NUMBER OF TUBES GIVING POSITIVE REACTION OUT OF			MPN INDEX per 100 ml
3 X 10ml	3 X 1ml	3 X 0,1ml	
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100

Number of tubes giving a positive reaction for a 5-tube set			MPN (per 100 ml)
10 ml	1 ml	0.1 ml	
0	0	0	<2
0	1	0	2
0	2	0	4
1	0	0	2
1	0	1	4
1	1	0	4
1	1	1	6
2	0	0	5
2	0	1	7
2	1	0	7
2	1	1	9
2	2	0	9
2	3	0	12
3	0	0	8
3	0	1	11
3	1	0	11
3	1	1	14
3	2	0	14
3	2	1	17
3	3	0	17
4	0	0	13
4	0	1	17
4	1	0	17
4	1	1	21
4	1	2	26
4	2	0	22
4	2	1	26
4	3	0	27
4	3	1	33
4	4	0	34
5	0	0	23
5	0	1	31
5	0	2	43
5	1	0	33
5	1	1	46
5	1	2	63
5	2	0	49
5	2	1	70
5	2	2	94
5	3	0	79
5	3	1	110
5	3	2	140
5	3	3	180

1 X 50 ml	5 X 10 ml	5 X 1 ml	Nombre caractéristique	Limites de confiance	
				Inférieure	Supérieure
0	0	0	<1		
0	0	1	1	<0,5	4
0	0	2	2	<0,5	6
0	1	0	1	<0,5	4
0	1	1	2	<0,5	6
0	1	2	3	<0,5	8
0	2	0	2	<0,5	6
0	2	1	3	<0,5	8
0	2	2	4	<0,5	11
0	3	0	3	<0,5	8
0	3	1	5	<0,5	13
0	4	0	5	<0,5	13
1	0	0	1	<0,5	4
1	0	1	3	<0,5	8
1	0	2	4	<0,5	11
1	0	3	6	<0,5	15
1	1	0	3	<0,5	8
1	1	1	5	<0,5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	<0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	59
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	100
1	4	5	43	15	120
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	100
1	5	2	54	18	140
1	5	3	92	27	220
1	5	4	160	39	450
1	5	5	>240		

2tubes par dilution		3tubes par dilution					
Nombre caractéristique	Nombrede cellules	Nombre caractéristique	Nombrede cellules	Nombre caractéristique	Nombrede cellules	Nombre caractéristique	Nombrede cellules
000	0.0	000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.5	001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.5	010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.9	011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.9	020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.6	100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	1.2	101	0.7	221	3.0	321	15.0
110	1.3	102	1.1	222	3.5	322	20.0
111	2.0	110	0.7	223	4.0	323	30.0
120	2.0	111	1.1	230	3.0	330	25.0
121	3.0	120	1.1	231	3.5	331	45.0
200	2.5	121	1.5	232	4.0	332	110.0
201	5.0	130	1.6	300	2.5	333	140.0
210	6.0	200	0.9	301	4.0		
211	13.0						
212	20.0						
220	25.0						
221	70.0						
222	110.0						

5tubespar dilution							
Nombre caractéristique	Nombrede cellules	Nombre caractéristique	Nombrede cellules	Nombre caractéristique	Nombrede cellules	Nombre caractéristique	Nombrede cellules
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	0.8	322	2.0	502	4.0	550	25.0
131	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0
202	0.9	350	2.5	512	6.0	555	180.0

Références bibliographiques

- Anonyme 2014 : Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie, polycopie national, 411p. France.
- Anonyme 2015-2016 ; Cours de Parasitologie et de Mycologie Générales– UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques. Cote d’Ivoire.
- Bonnefoy C., Leyral G., Bourdais V. 2002 : Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Biosciences et techniques Edition doin.
- Catsaras M.V. 2001 : Mécanismes d'action des toxines bactériennes et hygiène des denrées alimentaires *Bull. Acad. Vét. de France*, 2001, 154, 291-296
- Cuq J.L. Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique. Polytech Département Sciences et Technologies des Industries Alimentaires. Montpellier, 119p.
- De Truchis P., De Truchis A. 2007 : Diarrhées aiguës infectieuses *Presse Med.* 36: 695–705
- Dubois-Brissonnet F., Laurent Guillier L.2020 : Les maladies microbiennes d’origine alimentaire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55 (1), pp.30-38.
- Gillet P., Potters I., Jacobs J. 2000 : Parasitologie humaine tropicale. Prince Leopold Institute of Tropical Medicine
- Guiraud J.P. 2003 : Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod : 651p.
- Guy L., Elisabeth V. 2001 : Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires. 3^{ème} édition Paris. Biosciences et techniques : Sciences des aliments. 280p.
- Kaper J.B., Nataro J.P. et Mobley T. 2004 : Pathogenic *Escherichia coli*. Microbiology volume 2.
- Yapo et collaborateurs 2016 : Maladies infectieuses tropicales. Editions Alinéa Plus. 976p