

Développement d'une méthode alternative de quantification de *Pseudomonas* par PCR quantitative dans les produits carnés

Contexte et objectifs

Les *Pseudomonas* sont les principales bactéries psychrotrophes retrouvées sur les carcasses après refroidissement. La réfrigération permet leur multiplication et la production d'enzymes protéolytiques et lipolytiques responsables d'altérations (rancissement, putréfaction). *Pseudomonas* est principalement utilisée comme indicateur d'altération des viandes fraîches ou d'un défaut de conditionnement.

La FCD impose des critères microbiologiques relatifs aux *Pseudomonas* pour certains produits à la distribution, dont les pièces de découpe réfrigérées porcines, les viandes piécées de porc ou les saucisses à cuire. La méthode de référence NF EN ISO 13720 relative au dénombrement de *Pseudomonas* dans les viandes et produits à base de viande repose sur l'utilisation de la gélose sélective CFC (cétrimide, fucidine, céphaloridine). Sa sélectivité est toutefois controversée ; des essais antérieurs réalisés par l'IFIP ayant montré que jusqu'à 40% des colonies caractéristiques isolées sur CFC sont en fait des entérobactéries, surévaluant ainsi la concentration réelle de *Pseudomonas* dans les produits analysés.

Cette étude visait à développer une méthode de dénombrement des *Pseudomonas*, alternative à la norme NF EN ISO

13720 par PCR quantitative, afin de proposer aux professionnels une méthode plus robuste. Ses performances ont été confrontées à celles de la norme NF EN ISO 13720 et celles de la méthode RHAPSODY Agar® validée en 2015 par l'AFNOR (validation NF) pour le dénombrement des *Pseudomonas* dans les produits carnés et les produits laitiers.

Résultats

Cette étude a permis la mise au point d'une méthode de PCRq, basée sur la technologie SYBRGreen et utilisant les amorces P94F et P649R, pour la quantification absolue de *Pseudomonas spp.* dans les produits carnés. Elle présentait une inclusivité de 100% vis-à-vis de *Pseudomonas spp.* et une exclusivité acceptable de 92%. Elle était relativement sensible puisqu'elle permettait une quantification jusqu'à un nombre de copies d'ADN théorique de 1,73 Log₁₀ copies d'ADN cibles/μL (équivalent à 54 copies d'ADN cibles/μL). Les essais réalisés à partir de dilutions de cultures pures de *Pseudomonas spp.*, et des matrices artificiellement ou naturellement contaminées ont montré que la PCRq permettait une quantification fiable de *Pseudomonas spp.*, avec toutefois un nombre de copies d'ADN cibles systématiquement supérieur aux effectifs énumérés sur géloses CFC et

Financier

INAPORC

Contact

bastien.fremaux@ifip.asso.fr

Valorisation

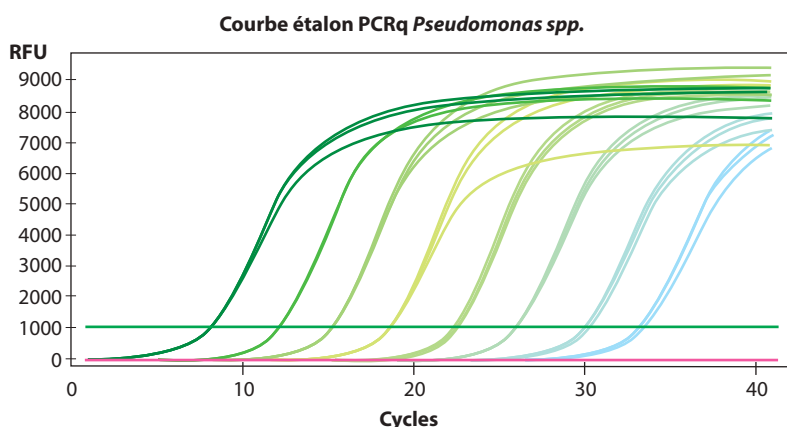
Publications

- Rapport de fin d'étude

Rhapsody®. Ceci peut résulter de l'amplification d'ADNs issus de cellules mortes ou VNC. Une autre hypothèse résiderait dans le fait qu'une UFC aurait pour origine un amas de plusieurs cellules. Afin de mieux comprendre l'origine de cette surestimation, il serait intéressant de traiter en amont les échantillons à l'aide d'un marqueur de viabilité (type propidium monoazide) afin de ne quantifier par PCRq que les cellules viables.

Perspectives

La réaction de PCRq mise au point dans la présente étude pourra être implémentée dans les protocoles d'analyses (hors analyses officielles qui nécessitent des méthodes validées AFNOR) pour la quantification des *Pseudomonas spp.* dans les produits carnés. Elle pourrait également être utilisée comme méthode de confirmation (plus fiable qu'un simple test oxydase préconisé par la norme) des isolats récupérés sur gélose CFC via la méthode normalisée.



Cinétique de la réaction d'amplification de l'insert de 578 pb pour les dilutions 10⁻¹ à 10⁻⁸ de l'extrait plasmidique (courbes respectives de la gauche vers la droite).