



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
Département de Biologie



**Licence Sciences & Techniques (LST)
Biotechnologie Hygiène & Sécurité Alimentaire**

BHSA

PROJET DE FIN D'ETUDES

**Evaluation de la qualité hygiénique
des salades prêtes à consommer dans
la ville de Fès**

Présenté par :

◆ LACHHAB LEILA

Encadré par :

◆ Dr EL OUALI LALAMI

◆ Dr BERRADA Sanae

◆ Pr OUHMIDOU

LRDEHM

LRDEHM

FST

Soutenu Le 15 Juin 2013 devant le jury composé de:

- Dr EL OUALI LALAMI

- Dr BERRADA Sanae

- Pr OUHMIDOU

- Pr SEFRIQUI

**Stage effectué au Laboratoire Régionale de Diagnostic Epidémiologique et
d'Hygiène du Milieu de Fès**

Année Universitaire 2012 / 2013

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES FES – SAISS

☒ B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☒ Ligne Directe : 212 (0)5 35 61 16 86 – Standard : 212 (0)5 35 60 82 14

Site web: <http://www.fst-usmba.ac.ma>

Résumé

La surveillance de la qualité microbiologique des Salades est une nécessité afin de garantir leur conformité et prévenir ainsi la survenue de toxi-infections alimentaires. L'objectif de ce travail est l'évaluation de la qualité microbiologique des salades crues et cuites commercialisées dans la ville de Fès.

Notre étude s'est déroulée entre le 08 Avril et 08 Juin de l'année 2013, et a porté sur 35 échantillons. Nous avons procédé au dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, coliformes totaux, coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus* et anaérobies sulfito-réducteurs ainsi que la recherche de *Salmonella spp.*

La totalité des échantillons des salades analysés ont été non conformes à la réglementation nationale. Sur les 24 échantillons de salades, 69% ont été classés impropres à la consommation. Les Anaérobies sulfitoréducteur et *Salmonella* n'a pas été détectée dans les salades étudiées.

Les salades crues (19 échantillons) représentant NC de 73,68% contre 62,5% au niveau des salades cuites (16 échantillons).

Des mesures préventives doivent être mises en place afin d'améliorer la qualité hygiénique des salades commercialisées.

Mots clés :

Qualité microbiologique, Qualité hygiénique, Conformité, TIA, TIAC, Salade crues, Salade cuites, Contamination ...

Sommaire

PRESENTATION DE MILIEU D'ETUDE

LISTE DES ABRIVIATIONS

GLOSSAIRE

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

GENERALE.....1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Les salades	2
1- Définition	2
2- Qualité des salades	2
3- Type des salades consommées.....	2
4- Indicateurs de non-conformité microbiologique des salades à base des légumes et de fruits crus.....	2
A- Germes totaux ou la flore mésophile aérobie totale	3
B- Coliformes totaux.....	3
C- Coliformes fécaux.....	4
D- Staphylococcus aureus coagulase positive	4
E- Anaérobies sulfitoréducteur.....	5
F- Salmonelles.....	5
5- Effet des microorganismes sur la qualité et la sécurité des légumes.....	6
6- Localisation des microorganismes sur les légumes.....	6
7- Facteurs de croissance et de survie des microorganismes.....	6
7.1- les microorganismes épiphytes.....	6

7.2- mécanismes de défense des végétaux	6
8- Relation entre la qualité et la pauvreté	7
9- Qualité hygiénique des produits alimentaires Marocains	8
10- Mesures à réduction de la charge microbienne	8
10.1- Cuisson.....	8
10.2- Réfrigération.....	8
10.3- Désinfection.....	8
II- Les risques liés aux consommations des salades.....	9
1- Les intoxications alimentaires	9
2- Les toxi-infections alimentaires collectives(TIAC)	9
2.1- Aliments incriminés.....	9
2.2- Facteurs contribuant à la survenu de la TIAC.....	9
2.3- Les épidémies récentes d'infections gastro-intestinales résultant de la consommation des salades	10
3- La situation épidémiologique.....	10
3.1- Dans certains pays.....	10
3.2- Au Maroc.....	10
III- Normes de validation des salades	11
MATERIEL ET METHODES.....	12
RESULTATS.....	24
DISCUSSION.....	28
CONCLUSION ET RECOMMANDATION.....	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUES	31
ANNEXES	

INTRODUCTION

Les salades prêtes à être consommées sont des préparations obtenues à base de légumes, de végétaux crus ou cuits, et de fruits frais. Leur consommation a augmenté dans le monde entier (**Delphine DESBORDES, 2003**).

Une mauvaise qualité hygiène des salades résultante principalement d'un défaut d'hygiène et du non respect des bonnes pratiques, est à l'origine d'un nombre important d'intoxication alimentaire. Ce nombre a atteint **20%** en 2007 (**BELOMARIA et al, 2007**).

Le contrôle de l'innocuité et de la qualité des denrées alimentaires (aliments, eaux) fait partie intégrante des programmes nationaux de développement. Les systèmes nationaux de contrôles de ces denrées visent à protéger la santé et le bien-être des consommateurs, à faciliter le commerce des produits alimentaires, à protéger les intérêts des producteurs, à prévenir les risques d'ordre chimique et biologique découlant de la contamination, du frelatage ou d'une mauvaise manutention des aliments, et au maintien de la qualité de vie (**BEUCHAT LR, 2002**).

Devant le risque sanitaire lié à la consommation des aliments, le suivi de leur qualité hygiénique est effectué quotidiennement par le Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès (LRDEHM), du Ministère de la santé.

En raison des conséquences graves d'une mauvaise qualité hygiénique des salades, et dans le cadre de notre projet de fin d'études, nous avons réalisé au sein du LRDEHM, une étude intitulée :

« Evaluation de la qualité hygiénique des salades prêtes à consommer Dans la ville de Fès »

Les objectifs de cette étude étaient :

- **D'évaluer la qualité hygiénique ou bactériologique des salades cuites et crues,**
- **Déterminer les principaux germes en cause,**
- **Comparer entre la qualité hygiénique des salades crues et celle des salades cuites.**

Ce travail comporte une revue bibliographique, suivie par matériels et méthode, résultats et discussion et enfin une conclusion et des recommandations.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Les salades

1- Définition

Les salades désignent d'une part un plat de crudités ou d'aliments froids assaisonnés d'une sauce froide, et d'autre part toute série de variétés de légumes verts à feuilles aux noms et aux saveurs différents (**DELPHINE DESBORDES, 2003**).

2- Qualité des salades

La qualité microbiologique des salades découpées couvre un vaste champ d'étude qui concerne les sources de contamination des produits végétaux (engrais animaux, eaux de lavage, instruments de découpe...), les maladies des végétaux, les contaminations des produits transformés, les conditions de prolifération des microorganismes, les méthodes d'analyse, les traitements des aliments, les aspects réglementaires liés aux traitements (**HAMILTON-MILLER J.M. SHAH S, 2001**).

3- Types des salades consommés

Les salades constituent une part essentielle du régime alimentaire humain. Au cours des vingt dernières années, la recherche en nutrition humaine a prouvé qu'un régime équilibré riche en fruits et légumes, garantit une bonne santé et peut réduire les risques de certaines maladies. Par conséquent, elles présentent l'un des secteurs agroalimentaires qui connaît la plus forte croissance. (**MENG J. DOYLE M.P, 2002**).

Parmi les nombreuses diversités de salades consommées dans les restaurants ou dans les maisons, on peut citer :

- Les salades à bases des légumes crus,
- Les salades à bases des fruits,
- Les salades des grains germés,
- Les salades à bases des légumes cuits, (**DELPHINE DESBORDES, 2003**).

4- Indicateurs de la non-conformité microbiologique des salades à base des légumes et de fruits crus

La contamination des végétaux peut avoir lieu dès le stade de la culture, par l'environnement ou l'eau d'irrigation souillée ou par la faune domestique ou sauvage, mais également par la main d'œuvre, lors des manipulations pendant ou après la récolte (cueillette, conditionnement). La contamination par l'environnement, par une eau d'irrigation souillée par exemple, peut concerner toute forme de culture maraîchère de légumes (salades, épinards, herbes aromatiques, tomates, poivrons, melons, etc.)(**FROST et al, 1995**) ou de petits fruits cultivés très près du sol (framboises, myrtilles par exemple) (**BASSETT ET et al, 2008**).

Etant classées parmi les produits culinaires crus, les salades sont analysées selon la norme Marocaine qui est intégrée de la norme ISO (**BULLETTIN OFFICIEL, 2004**). Les indicateurs de leur non-conformité microbiologique sont:

A- Les germes totaux ou la flore mésophile aérobie totale

Les germes aérobies mésophiles comprennent l'ensemble des bactéries, des levures et des moisissures que l'on rencontre dans l'environnement des denrées alimentaires.

En raison de la grande diversité des conditions accompagnant la culture et la durée de vie des légumes après la récolte, le nombre de germes aérobies mésophiles varie fortement en fonction des échantillons de produits. Les plus fortes concentrations ont été trouvées sur des pousses de salades et

les plus faibles sur les feuilles intérieures des choux. Les variations sont considérables entre les échantillons d'un même légume (FAIN ALFRED ,1996).

Si la présence de la flore mésophile aérobie totale est tolérable s'elle ne dépasse pas le seuil d'acceptabilité .Son dénombrement élevé signifie qu'une contamination ou de fausses manipulations ou une réfrigération déficiente ont eu lieu, et peut provoquer une altération rapide du produit et diminuer le délai de sa conservation (BULLETTIN OFFICIEL, 2004).

La recherche de la flore mésophile aérobie totale est d'un grand intérêt, son dénombrement permet notamment:

- D'estimer la charge microbienne initiale des matières crues avant transformation ;
- D'évaluer la qualité hygiénique et marchande du produit fini ;
- De contrôler la propreté de l'équipement et des manipulations ;
- De vérifier les déficiences au cours des opérations ;

De prendre des mesures préventives pour améliorer l'hygiène de la fabrication (CHRISTIAN STEPHAN SECKE, 2007).

B- Les Coliformes totaux

Ils sont définis comme étant des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, Gram négatif, non sporulées, en forme de bâtonnets, mobiles ou non. Ils possèdent un métabolisme de type respiratoire et fermentaire et sont capables de fermenter le lactose en produisant de l'acide et du CO₂ à 35°C. Ils sont oxydases négatives et réduisent les nitrates en nitrites sous conditions anaérobieuse. Les coliformes totaux incluent, entres autres, les genres suivants : *Escherichia*, *Entérobactérie* et *Klebsiella*. Le groupe des coliformes renferme plusieurs espèces de bactéries qui fermentent le lactose .Habituellement, la présence de coliformes totaux dans les aliments indique un traitement thermique inefficace ou une contamination subséquente au traitement. Les coliformes ne sont généralement pas pathogènes. Ils peuvent aussi démontrer un mauvais nettoyage et une mauvaise désinfection. (HILBORN E.D et al, 1999).

Les coliformes sont des marqueurs de qualité hygiénique générale. Des indicateurs la Contamination fécales.

Selon la norme Marocaine, les coliformes totaux ne doivent pas dépasse un seuil d'acceptabilité de 10⁴ UFC/ml ou par g (BULLETTIN OFFICIEL, 2004).

C- Coliformes fécaux

Parmi les coliformes totaux, il existe un sous-groupe de bactéries, les coliformes fécaux ou coliformes thermo tolérants qui sont définis comme étant des microorganismes en forme de bâtonnets, ne formant pas de spores, à Gram négatif, oxydase négative, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de croître en présence de sels biliaries, ou autres agents de surface ayant des propriétés inhibitrices de croissance analogues et capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures à la température de 44 °C (GOUIRAND,2003).

Les Coliformes fécaux sont plus spécifiques de contaminations fécales (mauvais lavage des mains, viandes contaminées lors de l'abattage) ou de contaminations telluriques (végétaux terreux) (GOUIRAND, 2003).

➤ *E. coli*

Bactérie présente dans le tube digestif des animaux supérieurs et de l'Homme, elle se trouve aussi dans les eaux d'égouts, dans toutes les eaux naturelles et les sols récemment contaminés par les matières fécales (VARNAM ET EVANS, 1996).

Sa présence dans un aliment prêt à manger est un signe d'une présence potentielle de pathogènes entériques dans cet aliment, et de ce fait rend ce dernier à risque pour la consommation humaine. Il représente des conditions hygiéniques faibles ou un traitement thermique insuffisant. Il ne devrait pas

être détecté dans un aliment prêt à consommer même si une tolérance est permise (**BULLETIN OFFICIEL, 2004**).

Les principales recommandations associées à la présence d'*E. Coli* dans les aliments et l'eau impliquent d'une part la détection de sources potentielles de contamination fécale, et d'autre part l'application de mesures d'hygiène accrues au niveau des manipulateurs (lavage des mains), appareils, instruments et locaux (**CH. VERNOZY-ROZAND, 2005**)

Il faut cependant noter qu'*Escherichia coli* est souvent moins résistant que les microorganismes pathogènes tels que *Salmonella*, *Norovirus*, aussi bien dans l'environnement extérieur que dans certains aliments crus ou traités (aliments déshydratés, congelés, ionisés). Ainsi, l'absence d'*E. Coli* n'est pas une assurance absolue de l'absence de micro-organismes entériques pathogènes (**VERNOZY-ROZAND, 2005**).

D- *Staphylococcus aureus* coagulase positive

Microorganisme Gram positif halophile, formant des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de culture sélectif (Chapman, Baird Parker) et donnant une réaction fortement positive à la coagulase.

Le principal habitat de la muqueuse nasale, la bouche, la gorge et la peau d'individus sains. Cette bactérie peut être disséminée facilement dans l'environnement et peut ainsi contaminer les aliments (**Y LE LOIR, 2010**).

Les *Staphylococcus aureus* coagulase positive souvent recherchés ne sont pas forcément entérotoxigènes, et seuls les *S. aureus* coagulase positive capables de produire une entérotoxine qui causent les intoxications alimentaires (**SIGNS et al, 2011**).

Des souches de *S. aureus* d'origine variée (animale, humaine ou environnementale) peuvent contaminer les aliments crus. Cependant, étant thermosensibles, elles sont généralement détruites au cours de la pasteurisation ou de la cuisson des aliments. En revanche, la présence de *S. aureus* coagulase positive dans les aliments chauffés et manipulés après cuisson est plutôt un indice de contamination humaine et possiblement de mauvaises pratiques sur le plan des manipulations et de l'hygiène des manipulateurs (défaut d'hygiène) (**Y LE LOIR, 2010**).

L'interprétation varie en fonction du risque et d'une situation hors contrôle sur le plan des bonnes pratiques de fabrication. C'est pourquoi elle est inférieure à la dose infectante, qui est de l'ordre de 10^5 UFC/g (**Y LE LOIR, 2010**).

E- Anaérobies sulfitoréducteurs

Les anaérobies sulfitoréducteur représentent un groupe de germes dont *Clostridium perfringens* fait partie. D'autres germes comme les *Bacillus*, les entérobactéries font aussi partie de ce groupe.

On recherche les anaérobies sulfitoréducteurs dans les salades afin de mesurer la probabilité de présence de *Clostridium perfringens*.

Germe pathogène, *Clostridium perfringens* est un bacille Gram positif, sporulé et anaérobie strict. C'est une bactérie très répandue dans le sol et la poussière, à partir desquels elle est disséminée dans l'environnement. Elle est rencontrée assez fréquemment dans le tube digestif des humains et de plusieurs animaux (EFSA, 2004- 2009).

Les spores de *Clostridium perfringens* résistent à la déshydratation et aux traitements thermiques modérés maintenus à une température située entre 15 et 50°C. Sa température optimale de croissance est relativement élevée (43-45 °C). Une fois que les conditions sont redevenues favorables, ces spores évoluent en formes végétatives susceptibles de se multiplier (**AFSSA, 2009**).

F- Les salmonelles

Bacille Gram négatif, aéro-anaérobie, lactose-, ONPG-, appartenant à la famille *Entérobactériaceae*.

Les salmonelles sont des bactéries logées dans les intestins des animaux. Les aliments ou les milieux contaminés par des déchets animaux peuvent les abriter. On trouve également celles-ci dans les œufs crus en coquilles. Les viandes crues ou insuffisamment cuites de volaille crue est l'aliment le plus fréquemment contaminé par *Salmonella*. Parmi les autres aliments susceptibles de contenir ces bactéries, citons le lait non pasteurisé et les œufs. Les fruits et les légumes peuvent aussi contenir ces bactéries s'ils ont été au contact d'un sol contaminé par des déchets animaux.

Les salmonelles les plus couramment rencontrées dans les intoxications alimentaires sont dans l'ordre : *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*.

Les salmonelles sont sensibles à la chaleur et leur présence résulte donc d'une contamination après cuisson (VARNAM ET EVANS, 1996).

L'absence de *Salmonella* doit être notée au sein de tous les aliments y compris les salades (GOUIRAND, 2003).

5- Effet des microorganismes sur la qualité et la sécurité des légumes

Il existe une grande variété d'agents d'altération capables ou non de se développer au cours du stockage, s'attaquer à une large gamme de produits. L'importance relative des microorganismes d'altération varie selon les pays et les climats.

La présence de microorganismes pathogènes sur les légumes peut être à l'origine d'intoxications alimentaires. Les légumes présentent en effet des conditions idéales à la survie et à la croissance de ces germes, ce qui indique la nécessité de pratiques hygiéniques pendant la culture et la préparation des produits. Les cas de *Salmonella*, *E. coli* O157 :H7, et de virus transmis par des fruits frais ou peu transformés viennent renforcer ce constat (HILBORN E.D *et al*, 1999).

6- Localisation des microorganismes sur les légumes

Pour des végétaux à feuilles organisées en « tête » (salades, choux...), il existe un gradient décroissant de contamination microbienne de l'extérieur vers l'intérieur avec très peu de microorganismes au cœur des légumes. Sur les feuilles d'endives et les épinards, les bactéries ne sont pas dispersées sur la cuticule mais apparaissent sous forme de micro colonies emballées dans une matrice fibreuse.

Des bactéries ont été isolées à partir de tissus internes de concombres, tomates (au cœur de la tige), haricots verts, petits pois, pommes de terre (NGUYEN *et al*, 1999).

7- Facteurs de croissance et de survie des microorganismes

7.1- Les microorganismes épiphytes

Ce sont des micro-organismes qui se développent à la surface des légumes. De nombreux se développent pendant le stockage, même en conditions réfrigérées, ce qui concorde avec la forte

proportion de microorganismes psychotropes trouvés dans plusieurs études (**NGUYEN-THE C. CARLIN F, 1999**).

7.2- Mécanismes de défense des végétaux

Il existe à la fois des barrières contre les infections et des barrières induites en réponse aux infections.

- Les enveloppes sont les premières barrières contre les microorganismes (cuticules, épidermes.)
- La présence de composés antimicrobiens préformés (composés phénoliques) favorise la résistance des légumes aux infections
- La survie ou la croissance de microorganismes pathogènes à la surface des légumes crus dépend essentiellement de la présence d'humidité, du pH, de la température et de l'exposition à la lumière (**NGUYEN-THE C. CARLIN F, 1999**).

Bien que le pH de nombreux légumes soit favorable à la croissance des bactéries pathogènes, certains comme les tomates possèdent une gamme de pH (3.9 à 4.4) qui empêche ou retarde la croissance des bactéries pathogènes. Les levures et les moisissures ont un avantage compétitif sur les bactéries parce qu'elles sont capables de pousser dans les gammes de pH les plus faibles caractéristiques de nombreux produits (2.2-5.0). Toutefois, certaines moisissures et levures utilisent les acides organiques, ce qui provoque une baisse de l'acidité et une augmentation du pH, permettant le développement de *C. botulique* et la production de toxines (**BEUCHAT LR, 2002**).

L'infiltration de pathogènes à l'intérieur des fissures, crevasses, et espaces intercellulaires des fruits et légumes a été démontrée par de nombreux chercheurs. L'infiltration de tomates par *Salmonella* et *Erwinia carotovora*, ainsi que celle de laitue, de pommes et d'oranges par *E. coli* O157:H7 ont été décrites. Une fois installées dans ces niches écologiques les cellules peuvent survivre et proliférer jusqu'à atteindre de fortes proportions au moment de la consommation du produit contaminé. L'infiltration de pathogènes à l'intérieur des tissus des fruits et légumes dépend de la température, de la durée, de la pression et de la nature hydrophobe de la surface du produit. (**BEUCHAT. LR, 2002**).

8- Relation entre la qualité et la pauvreté

Les recherches en santé publique axées sur la qualité de l'alimentation ont montré que les populations pauvres ont moins accès à des produits de haute qualité (sur le plan nutritionnel), Ce qui se traduit notamment par une alimentation de qualité moins bonne et donc une augmentation de la prévalence des maladies chroniques (**KORO et al, 2010; BAKER et al, 2006**).

La relation entre la qualité des légumes et la pauvreté a été démontrée dans plusieurs pays.

Ont montré à travers une étude menée en Philadelphie (USA) sur le risque sanitaire des aliments disponibles pour les populations de différentes races et niveaux de revenu, que les populations à faible statut socioéconomique (SSE) ont moins accès aux supermarchés que les populations à statut socioéconomique élevé. Les aliments ont été échantillonnés et testés dans différents secteurs pour la température, la flore totale aérobie mésophile, les coliformes totaux, les coliformes fécaux, *Escherichia coli*, *Staphylococcie aureus* et *Listeria monocytogenes*. Les résultats ont indiqué que la dans les légumes prêts à consommer, le niveau de contamination par les coliformes fécaux était de 100% dans les communautés pauvres (afro-américaine), 71,4% chez les communautés asiatiques et 45,5% pour les communautés blanches (**SIGNS et al, 2011**).

A Los Angeles (USA), l'accès à des produits frais et autres aliments sains varie entre les quartiers pauvres et riches. Selon ces derniers, les populations vivant dans les quartiers pauvres, sont plus exposées à des risques de consommation non seulement de fruits et de légumes en quantité insuffisante mais aussi à une offre de produits moins frais (**ALGERT et al, 2006**).

ZENK et al, en 2006 stipulent que la santé peut être améliorée grâce à de meilleures habitudes alimentaires des communautés à faible revenu (**ZENK et al, 2006**).

Une étude similaire a été faite en Afrique par **NKERE et al, 2011** sur la qualité bactériologique des aliments (grains, igname, manioc, fufou, riz, etc.) et l'eau vendue par les fournisseurs et dans les restaurants à Nsukka, Enugu State, Nigeria. Elle a montré que le niveau de contamination par les coliformes (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) dans les échantillons d'aliments analysés ne respectait pas les seuils microbiologiques (qui sont de 10^4 UFC / g) (**ZENK et al, 2006**).

9- Qualité hygiénique des produits alimentaires Marocains

La qualité hygiénique des produits alimentaires Marocains et la détermination des agents infectieux impliqués dans des cas de toxi-infections alimentaires ont été étudiées par Ouahid Malika. La flore mésophile aérobie totale se présentait avec des taux importants (jusqu'à 10^{10} UFC/g) particulièrement dans les crudités (salades, viande hachée, saucisses). La contamination d'origine fécale était importante. Les coliformes sont le groupe le plus représenté, ils étaient retrouvés dans presque tous les échantillons examinés et représentent la cause principale de leur non conformité selon les normes françaises. Les salmonelles ont été isolées dans 218 échantillons parmi les 610 analysés. L'étude de 17 cas de T.I.A. a mis en évidence que les Salmonelles comme étant l'agent responsable le plus fréquent (35,2% des cas identifiés), suivies de *St. aureus* (17,6%), de *C. perfringens* (11,7%), d'*E. coli* (5,8%) et de la flore totale (5,8%). Les aliments les plus souvent incriminés sont les produits carnés (**EFSA-Q-2004-2009**).

10- Mesures à réduction de la charge microbienne

10.1- Cuisson

La cuisson des aliments est un excellent moyen pour réduire leur charge microbienne. Cependant, une cuisson incomplète n'est pas suffisante pour éliminer d'éventuelles bactéries pathogènes, notamment les *E. coli* et les salmonelles qui pourraient s'y trouver. Les jeunes enfants et les personnes immunodéprimées sont plus susceptibles que les adultes de contracter une infection (**AFSSA, 2007**).

10.2- Réfrigération

La réfrigération réduisant de nombreuses espèces bactériennes, en arrêtant la croissance, est un bon moyen de conservation des aliments qui est d'autant plus efficace que la température est basse. Il est donc recommandé aux consommateurs de vérifier que la température est d'au plus 4°C dans la zone la plus froide de leur réfrigérateur. Cette zone est obligatoirement indiquée par une signalétique dans les réfrigérateurs commercialisés depuis 2002 (**CARPENTIER et al, 2007**).

10.3- Désinfection

Plusieurs molécules (hypochlorite de sodium, ozone, acide peracétique par exemple) sont susceptibles d'être utilisées comme auxiliaire technologique pour la désinfection des végétaux (**FUKUYAMA et al, 2009**) et paraissent efficaces. Ces usages d'auxiliaires technologiques sont soumis à autorisation et certains d'entre eux ont fait l'objet d'avis de l'Afssa. Ainsi, pour l'hypochlorite de sodium (eau de javel), le chlore, à une concentration de 50 mg/l (pH = 6.5), permet d'obtenir 2,4 réductions décimales d'*E. Coli* 0157 :H7 durant une immersion de 60 ou 90 secondes. Le chlore est efficace sur Norovirus lors du lavage désinfection des salades (80 mg/l) si les virus sont en suspension dans l'eau (**FUKUYAMA et al, 2009**).

II- Les risques liés aux consommations des salades

1- Les intoxications alimentaire

Les intoxications résultent de l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment. Il s'agit essentiellement des intoxications botuliniques, staphylococciques et à *Bacillus cereus*. Les microorganismes synthétisent ces toxines de nature protéique au cours de la phase exponentielle de croissance (*C. botulinum*) ou en fin de cette phase (*S. aureus*).

Dans le cas de l'intoxication botulinique, le risque pour la santé du consommateur étant extrêmement grand, aucune norme ne peut permettre de contrôler l'innocuité du produit. Dans ce cas, il faut donc adopter des conditions de fabrication - conservation qui garantissent de façon absolue la qualité sanitaire du produit (AMAT-ROSE J.M, 1997).

2- Les toxi-infections alimentaires collectives(TIAC)

Sont fréquentes et parfois graves. Elles représentent un véritable problème de santé publique et sont de ce fait, incluses parmi les maladies transmissibles à déclaration obligatoire. Un foyer de TIAC est défini par l'apparition d'au moins deux cas d'une symptomatologie, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Trois agents pathogènes semblent ainsi être la plupart du temps mis en cause lors de T.I.A.C : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*. Il convient de modérer leur importance respective, car de nombreux foyers ne sont pas déclarés, surtout ceux dont la pathologie reste bénigne. Les aliments qui apparaissent le plus à risque sont les œufs, les poissons, crustacés et les viandes en général. (BELOMARIA *et al*, 2007).

- Dans une étude réalisée dans la région du Gharb Chr arda Bni Hssen (région occidentale du Maroc), ce sont les fruits et légumes ainsi que le lait et ses produits dérivés qui étaient les principales causes des toxi-infections collectives. En effet c'est une région située sur le bassin de Sebou reconnu pour sa pollution en amont et sa répercussion sur l'agriculture en aval ce qui explique la prédominance d'une contamination d'origine hydrique (fruits et légumes) au profit de la contamination des aliments d'origine animale. (BELOMARIA *et al*, 2007).

2.1- Aliments incriminés

L'aliment causal des TIAC notifiées a été identifié ou suspecté épidémiologiquement dans 86% des TIAC notifiées (31/36). Les aliments les plus fréquents en cause étaient les **légumes et les fruits (20%)**, le lait et les produits laitiers (17%), la volaille et les œufs (9%), les escargots (7%), les poissons (7%), le couscous (6%), les viandes (4%), la pâtisserie (4%) et l'eau de boisson (2%) (BELOMARIA *et a*, 2007).

2.2- Facteurs contribuant à la survenue de la TIAC

Dans les 36 cas des TIAC notifiées survenu dans la Région du Gharb Chr arda Bni-Hssen, 38% sont dus à des matières premières contaminées, 22 % à la contamination par l'environnement du personnel et 22% à la contamination par l'environnement de l'équipement, 6 % est du au non respect des températures réglementaires, 6 % est du au délai important entre préparation et consommation, 6 % sont dus à une erreur dans la préparation et la consommation.

La contamination des salades et des cressons par des cercaires a pu conduire à des épisodes de distomatose chez l'Homme (douve du foie, lié au développement de *Fasciola hepatica*), après ingestion de ces végétaux crus (HAMILTON-MILLER *et al*, 2011).

2.3-Les épidémies récentes d'infections gastro-intestinales résultant de la consommation des salades

Les salades préparées prêts à consommer sont généralement perçus par les consommateurs comme des aliments sains et sans risque. Cependant, durant ces dernières années, ces produits ont été impliqués dans la transmission de microorganismes infectieux, dont certains posent de sérieux problèmes de santé publique (**CASTRO-ROSAS et al, 2010**).

Une étude de l'Agence britannique de protection de la santé (Heath Protection Agency) décrit les épidémies de maladies intestinales infectieuses associées à la consommation de salades préparées, rapportées en Angleterre et au Pays de Galles entre 1992 et 2006 : au total, au cours de 82 épidémies, 3434 personnes ont été infectées dont 66 hospitalisées et une personne décédée (**FAIN ALFRED, 1996**).

Les contaminations croisées, c'est à dire le transfert de microbes pathogènes d'aliments contaminés vers d'autres aliments, ainsi que la manipulation et le stockage inapproprié des produits sont souvent impliqués dans la transmission de ces infections. (**FAIN ALFRED, 1996**).

3- La situation épidémiologique

3-1- Dans certains pays

- **Aux Etats-Unis, sur 76 millions d'intoxications alimentaires (26.000 pour 100.000 Habitants), 325.000 personnes ont été hospitalisées (111 pour 100.000 habitants) et 5.000 personnes sont mortes (1,7 pour 100.000 habitants) (OMS, 2000).**

- Au Royaume-Uni, en l'an 2000, le nombre d'intoxications s'est élevé à 2 millions (près de 3.400 pour 100.000 habitants), les bactéries impliquées furent: *Campylobacter jejuni* (77,3%), *Salmonella* (20,9%), *Escherichia Coli* O 157 : H7 (1,4%) et toutes les autres (<0,1%) (**OMS, 2000**).

- En France, sur les 250.000 à 750.000 intoxications alimentaires par année (400 à 1210 pour 100.000 habitants) 70.000 on fait l'objet d'une consultation aux urgences (113 pour 100.000 habitants), 15.000 personnes ont été hospitalisées (24 pour 100.000 habitants) et 400 personnes en sont mortes (65 pour 100.000 habitants) (**HAEGHEBAERT, 1997**).

3-2- Au Maroc

Une augmentation progressive au cours des dix dernières années a été constatée. En effet le nombre de cas et des épisodes de TIAC de 1996 à 2001 a doublés. Les TIAC représentent, au Maroc, 11% des intoxications. Plus de 90% des TIAC sont d'origine bactérienne confirmée ou probable. Environ 7% des cas sont d'origine chimique: Contamination des aliments par des pesticides surtout. Près de 1% des cas : TIAC d'origine végétale (**Addad**). Le reste étant d'origine indéterminée (1,5%) (**BENKADDOUR, 2002**).

La contamination des aliments peut provenir des matières premières ou des préparateurs.

Les TIAC sont sous-déclarées au Maroc comme dans autant de pays du Monde. Vu que la population marocaine ne connaît pas les risques des TIAC, celles-ci ne sont déclarées qu'en face d'aggravation. Ainsi on peut estimer 10 cas pour chaque déclaration (**BENLARABI et al, 2006**).

Les interprétations sont fixées en fonction du risque et de la situation hors contrôle sur le plan des bonnes pratiques de fabrication. C'est pourquoi elles sont inférieures à la dose infectante, qui est de l'ordre de 10^5 UFC/g (**BENKADDOUR, 2002**).

III- Normes de validation des salades

Les *normes* sont des spécifications microbiologiques adoptées par la législation qui s'adressent au produit fini et fixent les limites acceptables de présence de microorganismes donnés dans des produits bien définis.

Il existe actuellement de nombreux organismes nationaux ou internationaux (OMS, FAO, ISO....) qui se préoccupent de l'établissement de critères de qualité microbiologique de nos aliments.

-Le Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu(LRDEHM) suivre en générales les normes marocaine intégré de la norme ISO.

Tableau1 : Critères microbiologiques pour les salades crues et cuites

(NM B ON°52/4/P727/2004 pour les salades crues et NM M.S.MMA/P71 pour les Salades cuites)*

Seuil	Les paramètres recherchés					
	GT	CT	CF	<i>St. aureus</i>	ASR	<i>Salmonella</i>
M =	3.10^6	10^4	10^2	10^3	3.10^2	Abs

* : Selon l'arrêté conjoint n°624-04 Safar 1425(8 Avril 2004) publié au bulletin officiel N : 5214-30 rabbi 1-1425 (20.5.2004) relative aux critères microbiologiques d'usage pour les aliments.

M: seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants.

Si la valeur est \leq M: Conforme

Si la valeur est $>$ M : Non conforme

Matériel & Méthodes

1- Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude prospective réalisée sur une durée de 2 mois allant du 08 avril au 08 juin 2013. Elle a concerné l'étude de la qualité microbiologique des salades prêtes à être consommées.

2- Lieu de prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés dans différents restaurants de la région de Fès et de l'aéroport Fès saïs.

Le nombre de prélèvements réalisés était de 35 échantillons des salades prêtes à être consommées.

3- Lieu d'étude

Les prélèvements réalisés ont été analysés au laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de Fès (LRDEHM) au niveau de l'unité d'hygiène alimentaire.

4- Prélèvements, acheminement, transport et réception des échantillons au laboratoire

Les prélèvements ont été effectués aseptiquement dans des sachets stériles par les techniciens d'hygiène du milieu dépendant du Ministère de la santé, selon la norme (NM03.7.059).

Les échantillons prélevés ont été acheminés immédiatement au LRDEHM, dans une glacière maintenue à une température de $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Un contrôle qualité des échantillons reçus est fait systématiquement au laboratoire avant d'être analysés, il englobait :

- La mesure de la T° de la glacière,
- L'identification des échantillons,
- L'heure de prélèvement,
- Le délai de transport,
- La conformité du prélèvement, etc.,...

Les échantillons ne répondant pas aux conditions et consignes de prélèvement et d'acheminement ne sont pas analysés. Toute non-conformité détectée est enregistrée puis mentionnée au responsable du prélèvement afin que des actions d'amélioration puissent avoir lieu.

5- Analyse de la qualité bactériologique des salades

A- Matériel, équipements et consommables utilisés

Le matériel nécessaire pour le contrôle de la qualité bactériologique des salades comprend :

- **Matériel de stérilisation:** autoclave ($121\pm 3^{\circ}\text{C}$) et four pasteur ($175\pm 5^{\circ}\text{C}$) ;
- **Matériel de prélèvement:** ciseaux, pinces et spatule ;
- **Matériel d'homogénéisation:** Stomacher et vortex ;
- **Matériel d'incubation:** Etuves ($30\pm 1^{\circ}\text{C}$, $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) ;
- **Matériel pour préparation et conservation de milieux de culture :** balance, bain-marie, réfrigérateur réglé à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$;
- **Matériel de mesure:** pipettes stériles, pro pipette et balance analytique;
- **Milieux de culture :** PCA, EPT, DL, BP, SPS, RP, HK, BHI, DNase et Kligler ;
- **Réactifs et API :** réactifs pour test catalase, plasma de lapin, urée, Kovacs, disques oxydase, disque ONPG, API E ;
- **Divers :** Éthanol 70 % pour flambage, becs bunsen, boîtes de pétries, compteur des colonies, tubes et flacons stériles, anses,...

N.B : - La composition, la préparation et les contrôles qualités des milieux de culture sont décrits en annexe (**annexe1**)

- Un contrôle qualité interne est réalisé aux consommables utilisés (boîtes de pétri, verrerie, pipettes,..), aux équipements (étuves, réfrigérateur, autoclaves, balances,...), aux milieux de cultures préparés (**annexe 2**).

B- Méthode d'interprétation

L'analyse des salades été réalisée selon les normes en vigueur :

- Norme microbiologique B-ON°52/4/P727/2004 pour les salades crues

- Norme microbiologique M.S.MMA/P71 pour les salades cuites

Les microorganismes dénombrés ou recherchés étaient essentiellement :

- La flore mésophile aérobie totale (FMAT),
- Les coliformes totaux (CT),
- Les coliformes fécaux (CF),
- Les germes anaérobies sulfite-réducteurs (ASR),
- Les *Staphylococcus aureus*,
- Les *Salmonella*.

I- Préparation des échantillons d'aliments pour analyse microbiologique

1- Solution mère

La préparation de la solution mère consiste à peser aseptiquement dans un sachet stérile 25 g de l'échantillon, le mélanger ensuite avec une quantité neuf fois égale à celle de l'eau peptonée tamponnée (soit 225ml) et enfin souder le sachet en flambant son bord légèrement à la chaleur.

N.B: Il est important de prélever au minimum à 4 ou 5 endroits dans l'échantillon afin d'obtenir la représentativité.

2- Dilutions décimales subséquentes

❖ Principe

La préparation de dilutions décimales a lieu si nécessaire, en vue de réduire le nombre de microorganismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur éventuel développement (cas des tubes) ou effectuer le dénombrement des colonies (cas des boîtes de pétri).

❖ Protocole

Transvaser, à l'aide d'une pipette stérile 1ml de la SM dans un tube de 9 ml de l'eau physiologique stérile. Mélanger le tout avec un agitateur mécanique (vortex).

Cette opération est répétée sur les dilutions décimales allant de 10^{-2} à 10^{-4} , en utilisant à chaque dilution une nouvelle pipette stérile.

3- Broyage et homogénéisation

L'utilisation d'un homogénéisateur de type péristaltique (Stomacher) est préconisée. Les microorganismes seront délogés de l'échantillon par de forts jets de liquide et par l'écrasement de l'aliment. Habituellement, l'aliment devrait être homogénéisé pour une période d'une minute et demie jusqu'à 2 minutes.

4- Ensemencement

Les échantillons sont ensemencés en profondeur ou en surface selon les flores recherchées et ceci en respectant les normes préconisées pour chaque germe recherché. Le tableau 2 montre un résumé des méthodes d'analyses utilisées ainsi que leur interprétation.

Tableau 2 : Résumé des méthodes d'analyse bactériologique utilisées

Paramètre microbiologique	Volume d'inoculum	Milieu d'ensemencement	Méthode d'ensemencement	Condition d'incubation
FMAT	1ml	PCA	En profondeur	30±1°C/ 24h

CT	1ml	DL	En profondeur	30±1°C/ 24h
CF	1ml	DL	En profondeur	44±0,5°C/24h
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1ml	Baird Parker	Par étalement	37±1°C/24h
ASR	1ml	SPS	Transfert dans un tube de 20ml	37±1°C/24h
<i>Salmonella</i> (*)	0,1ml de la culture de PE	Rappaport	Transfert dans un tube de 10ml	44±0,5°C/24h
	50µl	Hektoen	Epuisement du bouillon sur le milieu HK	37±1°C/24h

N.B : (*) signifie qu'un 1^{er} enrichissement des *Salmonella* est réalisé en incubant la solution mère préalablement préparée 37±1°C/24h±3h.

5- Dénombrement et identification des germes

5-a- Dénombrement des germes totaux (FMAT)

Le dénombrement des germes totaux inclut toutes les cellules végétatives et les spores de bactéries, les levures et les moisissures qui peuvent pousser à une température donnée sur ou dans un milieu de culture donné.

Des micro-organismes strictement mésophiles ont une température optimale de 30-37°C. Leur dénombrement est déterminé sur un milieu Plate Count Agar (PCA), milieu nutritif sans inhibiteurs dans le but de favoriser le développement à 30°C/24h de tous les germes.

Près de la flamme, on transfère 1ml de SM dans les boîtes de pétrie stériles à l'aide d'une pipette stérile, on répète l'opération avec d'autres dilutions. On coule dans chaque boîte de pétri environ 15ml de PCA préalablement préparé, fondu et refroidi à l'étuve à une T° de 45±1°C, mélanger soigneusement l'inoculum, laisser solidifier puis incubé à 30±1°C pendant 21h±3h.

Après l'incubation, on compte les colonies pour chaque boîte, les résultats sont exprimés en UFC/ml ou par g. (NM 08.0.102).



Gélose PCA avant incubation

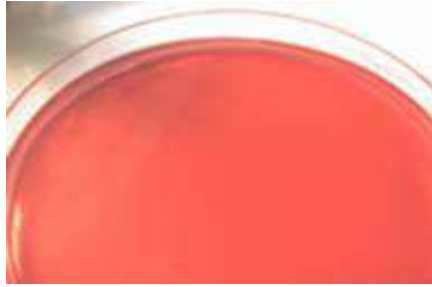


Gélose PCA après l'incubation

5-b- Dénombrement des coliformes totaux(CT)

On transfère dans une boîte de pétri stérile 1ml de la SM à l'aide de pipette stérile, puis on coule dans la boîte du milieu DL préalablement refroidie. On mélange soigneusement l'inoculum, puis on incubé à 30°±1°C pendant 21h±3h après solidification.

Après incubation à 30±1°C, l'apparition de colonies rouges brique sur un milieu de culture lactosé sélectif et différentiel avec production d'acide indique la présence de coliformes totaux (NM 08.0.115).



Milieu DL avant incubation



Milieu DL après incubation

5-c- Dénombrement des coliformes fécaux(CF)

Après transfert dans une boîte de pétri de 1ml de la SM à l'aide de pipette stérile et y avoir coulé du milieu DL préalablement refroidie, On mélange soigneusement l'inoculum et on incube après solidification à $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant $21\text{h}\pm 3\text{h}$ puisque les coliformes fécaux sont des bactéries thermo tolérantes.

Après incubation à $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, l'apparition de colonies rouges brique sur un milieu de culture lactosé sélectif et différentiel avec production d'acide indique la présence de coliformes fécaux (NM 08.0.124(2004)).

5-d- Dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Toujours près de la flamme, on transfère à l'aide d'une pipette stérile 0,1 ml de la suspension mère (dilution 10^{-1}) à la surface de boîte de milieu sélectif gélosé (BP). Répéter l'opération avec la dilution 10^{-2} et les dilutions suivantes si nécessaire.

Étaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé (BP) puis incuber à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 24 à 48 h $\pm 3\text{h}$.

α -Lecture

Après incubation, les colonies caractéristiques sont noires, brillantes et convexes (1 à 1,5 mm de diamètre après 24 h d'incubation et 1,5 à 2,5 mm de diamètre après 48 h d'incubation) et entourées d'une zone claire qui peut être partiellement opaque. Après 24 h d'incubation, peut apparaître dans cette zone claire un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.

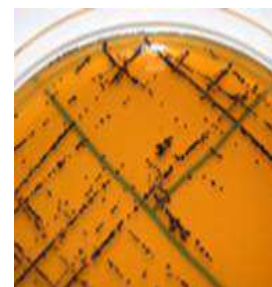
N.B : Les colonies non caractéristiques sont semblables en apparence, mais sont dépourvues de zone claire. Les colonies non caractéristiques sont souvent constituées de souches de *Staphylococcus aureus* contaminant les produits laitiers. Elles ne sont pas produites, fréquemment, par les souches de *Staphylococcus aureus* qui contaminent les autres produits.



Gélose sélective BP
Avant incubation



Gélose sélective BP
après incubation :
Absence de *St. aureus*



Gélose sélective BP
après incubation :
Présence de *St. aureus*

β- Confirmation

Pour le test de confirmation et d'après la norme (NM 08.01.104), on choisit 5 colonies caractéristiques.

La confirmation se fait à travers la recherche de la coagulase. Cependant, on peut passer d'abord par le test DNase, ensuite on réalise le test coagulase aux colonies confirmées DNase positive.

β-1- Test DNase

❖ Principe

Le milieu gélose à l'acide désoxyribonucléique permet la recherche de l'ADN des bactéries, et particulièrement celle des *Staphylococcus aureus*.

La révélation se fait par l'acide chlorhydrique (1fois normal) qui, une fois appliqué et laissé pénétrer dans le milieu, les microorganismes positifs à la DNase, comme *Staphylococcus aureus*, sont entourés d'une zone claire d'ADN dépolymérisé, tandis que les parties du milieu plus éloignées de la bande d'ensemencement sont opaques et blanchâtres, sous l'effet de l'ADN polymérisé. Les colonies de microorganismes négatifs à la DNase ne présentent pas de zones plus claires en périphérie des colonies. Si la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase (+) ; sinon, elle est DNase (-).

❖ Technique

A partir d'une culture purifiée identifiée *Staphylococcus*, on ensemence par épuisement le milieu Gélosé à l'acide désoxyribonucléique à l'aide d'une anse à fil droit, on incube à 37°C pendant 24 h.

❖ Lecture

Si après addition de l'acide chlorhydrique, la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase.



Test DNase négatif



Test DNase positif

β-2- Test coagulase

❖ Principe

Le plasma de lapin est un milieu idéal pour la recherche de la coagulase libre de *Staphylococcus aureus*. La production de la coagulase permet de différencier les souches de *Staphylococcus aureus* des autres souches (*epidermis*,...)

Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma le plus souvent au cours des 3 premières heures. Dans certains cas, la coagulation est plus légère et plus tardive, mais la réaction ne doit être considérée comme négative que si le phénomène n'intervient pas après la 24ème heure.

❖ Technique

Après une étape d'enrichissement sur milieu BHI de l'inoculum de *Staphylococcus* préalablement identifié et confirmé DNase+, on prélève 0,5 ml de ce dernier, et on l'ajoute à 0,5 ml du plasma de lapin et on incube à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 h.

❖ Lecture

Si la coagulation se produit dans les 24 h, la souche de *Staphylococcus* est coagulase positive.



Aspect du test négatif



Aspect du test positif

5-e- Dénombrement des ASR

A partir de la SM, on transfère aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1ml dans un tube contenant 20ml de milieu SPS ramené à 47°C , puis on mélange doucement l'inoculum au milieu de culture. Après solidification du tube, on incube à $37\pm 1^\circ\text{C}/24\text{h}\pm 3\text{h}$.

Si nécessaire, des dilutions sont effectuées et leur transfert dans le milieu est réalisé selon la technique ci-dessus.

La couleur noire des colonies et ayant des alentours indiquent les colonies caractéristiques. Ils sont dus à la formation de sulfure de fer.

Le comptage des colonies se fait pour les dilutions contenant moins de 30 colonies. On exprime les résultats en UFC/ml ou par g. (NM 08.0.125). \$



Teste négatif



Teste positif

5-f- Recherche des Salmonelles

La méthodologie employée au LRDEHM permettant d'isoler et identifier la bactérie *Salmonella* dans les aliments est celle préconisée dans la norme (NM 08.0.116). Elle comprend 4 étapes : le pré-enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et l'identification (biochimique et par galerie API 20E).

5-f-1- Pré-enrichissement en milieu non-sélectif

Il consiste à prélever de façon aseptique, différentes parties de la salade, à l'ensemencer dans l'eau peptonée, puis l'incuber à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant $24\text{h}\pm 3\text{h}$

N.B : La solution mère préalablement préparée pour le dénombrement de la flore totale, des coliformes, des *Staphylococcus* et des ASR sert pour le pré-enrichissement des *Salmonella*.

5-f- 2 Enrichissement en milieu sélectif

Les cultures de pré-enrichissement sontensemencées dans un milieu nutritif contenant des agents inhibiteurs actifs sur les germes qui font concurrence à *Salmonella*. Pour cela, on transfère à l'aide d'une pipette stérile 0,1 ml de la culture de pré-enrichissement dans 10 ml de bouillon rapport et on incube à $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant $21\text{h}\pm 3\text{h}$.

5-f-3- Culture sur gélose sélective

Les cultures d'enrichissement sélectif sont étalées par stries sur des géloses sélectives qui inhibent la croissance des bactéries concurrentes et permettent un examen visuel des colonies présumées *Salmonella*.

Après $21\text{h}\pm 3\text{h}$ d'incubation du milieu d'enrichissement à $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, on ensemence par épuisement à l'aide d'une anse flambée du bouillon sélectif sur une gélose Hektoen de façon à obtenir les colonies bien isolées, on incube la gélose $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $24\text{h}\pm 3\text{h}$.

❖ Lecture

Sur gélose HK : Les colonies typiques de *Salmonella* ont une coloration bleu-vert avec ou sans centre noir. Celui-ci peut s'élargir et rendre la colonie complètement noire. Certaines souches atypiques produisent des colonies jaunes avec ou sans centre noir.

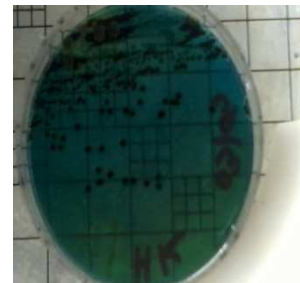
N.B : Après $21\text{h}\pm 3\text{h}$ d'incubation s'il n'y a pas de colonies indiquant la présence de *Salmonella* sur la gélose Hektoen, on peut ré-incuber les boîtes pendant $24\text{h}\pm 3\text{h}$ de plus.



**Gélose Heckteon
Avant incubation**



**Gélose Heckteon
Après incubation
Absence de *Salmonella***



**Gélose Heckteon
Après incubation
Suspicion de *Salmonella***

5-f- 4- Identification

5-f-4-1- Identification par galerie classique

Préalablement à l'identification complète, la colonie suspecte peut être soumise à des tests d'orientation de diagnostic miniaturisés ou à quelques tests d'identification appartenant à la galerie classique d'identification afin de s'assurer son appartenance aux Entérobactéries. Dans ce cas, il peut s'avérer nécessaire d'ensemencer les milieux et réactifs suivants: Kligler-Hajna, urée indole, réactif pour la recherche de la β -galactosidase.

a- Milieu Kligler-Hajna

Ce milieu est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Entérobactériaceae*.

❖ Principe

Il s'agit d'un milieu différentiel de couleur rouge qui permet de confirmer la fermentation du glucose et du lactose, la production de gaz, et aussi la réduction des composés soufrés qui se traduit par la production de H₂S. Comme les milieux contiennent des sels de fer, la production de H₂S est révélée par la formation du sulfure métallique de couleur noire.

❖ Technique

Avec les colonies sélectionnées et après purification éventuelle sur gélose nutritive, on ensemence la pente du milieu en stries serrées et parallèles et le culot par piqûre profonde, puis on incube à 37±1°C pendant 24h±3h.

❖ Lecture

- Si la souche fermente le lactose, la surface inclinée vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée.
- Si la souche fermente le glucose, le culot vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée.
- Si la souche produit l'H₂S, il se produit un noircissement de la zone joignant le culot à la pente.

Les cultures typiques de *Salmonella* correspondent à une pente alcaline (rouge) et un culot acide (jaune), avec formation de gaz, et avec (dans environ 90 % de cas) formation de sulfure d'hydrogène (noircissement de la gélose).



Milieu Kligler

Avant incubation



Milieu Kligler

Après incubation (1)



Milieu Kligler

Après incubation (2)

(1) : Pente rouge et culot jaune ; (2) : Pente rouge , culot jaune et formation d'H₂S

b- Test Uréase

❖ Principe

Il se fait sur milieu urée tryptophane, appelé improprement milieu Urée Indole. Le milieu Urée Tryptophane est un milieu synthétique (milieu dont la composition est connue exactement tant qualitativement que quantitativement). C'est un milieu complexe qui permet de rechercher l'uréase et l'indole, utiles à l'identification de nombreuses bactéries notamment parmi les *Entérobactériaceae*.

Les bactéries uréase (+) hydrolysent l'urée en ammoniac, qui fait varier l'indicateur de pH, entraînant un changement de la couleur du milieu, ainsi il devient alcalin par formation de carbonate d'ammonium, et vire au rouge violacé, alors qu'il était jaune orange.

❖ **Technique**

On ensemence le milieu urée avec l'isolat purifié sur milieu gélosé, puis on incube à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 h.

❖ **Lecture**

L'apparition d'une couleur rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium, la bactérie est Uréase positive.

La persistance de la couleur orange montre qu'il n'y a pas eu d'alcalinisation, la bactérie est Uréase négative.



Test Uréase négatif



Test Uréase positif

N.B : Si l'uréase est négative, on passe au test indole

c- Test Indole

❖ **Principe**

Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole produit par l'activité de la tryptophanase, et produit un anneau rouge à la partie supérieure du milieu urée-indole préalablement ensemencé.

❖ **Technique**

Ajouter une goutte de Kovacs au milieu Urée-indole préalablement ensemencé

❖ **Lecture**

Si formation d'un anneau rouge : indole négatif

Si absence d'un anneau rouge : indole positif



Test indole négatif



Test indole positif

d- Test ONPG (Orthonitrophényl -D-Galactopyranoside)

❖ Principe

Le terme ONPG hydrolase est plus propre que celui de D-galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté nitro-2-phénol et non celui du D-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase sans fermenter le lactose. Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'Ortho-Nitrophényl-D Galactopyranoside, ou le 2-naphtol-D-galactopyranoside. Ceux-ci sont utilisés comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le b-naphtol.

❖ Technique

A partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif et oxydase négative, nous avons réalisé une suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile, puis nous avons ajouté un disque imprégné d'ONPG.

❖ Lecture

Une réaction positive se traduit par un virage du milieu au jaune



Test ONPG négatif



Test ONPG positif

5-f-4-2- Identification par API 20^E

Si les tests d'orientation sont ceux de Salmonella, on passe à l'identification par l'API 20^E.

Galerie API 20^E

C'est une galerie de 20 microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des *ENTEROBACTERIACEAE*.

6- Interprétation des résultats

La conformité des échantillons analysés est effectuée selon l'arrêté conjoint n°624 /04 Safar 1425(8 Avril 2004) publié au bulletin officiel N:5214-30 rabbi 1-1425 (20.5.2004) relative aux critères microbiologiques d'usage pour les aliments.

Le résultat global est calculé selon la formule suivante :

$$N = (\sum \text{colonies} \times Fd) \div V$$

N : Nombre d'UFC par gramme ou par ml

$\sum \text{colonies}$: Somme des colonies des boîtes interprétables.

Fd : facteur de dilution

Fd= 1/ D avec D : dilution et V : volume ensemencé

7- Outil d'analyse

La saisie et le traitement des données ont été faits à l'aide du programme Excel.

RESULTATS

Au cours de notre étude, nous avons réalisé le contrôle hygiénique des salades au sein du LRDEHM.

1- Répartition des échantillons analysés par catégories

Le nombre d'échantillons analysés était de 35. Leur répartition par catégorie est montrée dans le tableau suivant

Tableau 3 : Répartition des salades analysées par catégorie

Catégorie	Dénomination	Nombre des échantillons analysés
Salades crues : 19 échantillons	Salades varies crues	9
	Salades concombres crues	2

	Salades à la betterave crues	1
	Salade de fromage, piments crue	2
	Salade fruits	2
	Salade des épinards crue	1
	Salade betterave+ tomate crue	1
	Salade de chaux crue	1
Salades cuites : 16 échantillons	Salade carotte cuite	2
	Salade de riz cuite	1
	Zaàlouk cuit	1
	Salade bakoula cuite	1
	Salade poivres et aubergines frite	1
	Salade de riz et carotte cuite	2
	Salade varies demi cuit pomme de terre, riz, piments	1
	Salade pomme de terre cuite	2
	Salade cuit thon, tomate, piments	2
	Salade navette + carotte cuite	1
	Salade betterave cuite	1
	Salade carotte, piment cuite	1

2- Pourcentage de non-conformité globale

Sur 35 échantillons de salades analysées, la non-conformité a été notée dans 24 cas, soit un pourcentage de non-conformité de l'ordre de 69%.

La figure 1 illustre le pourcentage de non-conformité globale.

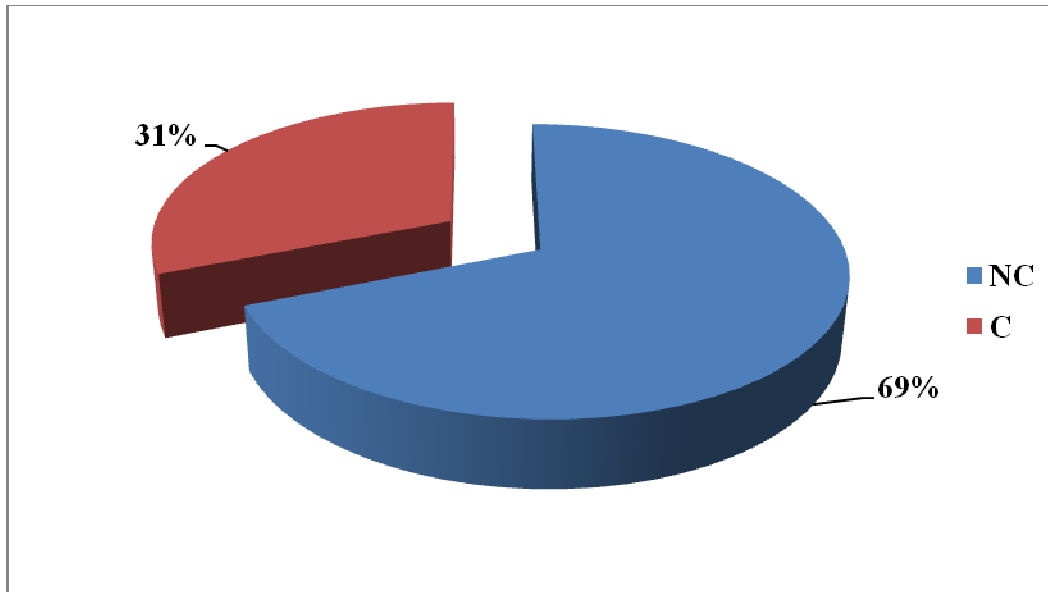


Figure 1 : Pourcentage de non-conformité globale

3- Pourcentage de non-conformité par catégorie de salade

Comme illustré en figure 2, nous avons noté une non-conformité plus élevée dans le cas des salades crues (% de N.C : 73,68%) que dans le cas des salades cuites (% de N.C : 62,5%).

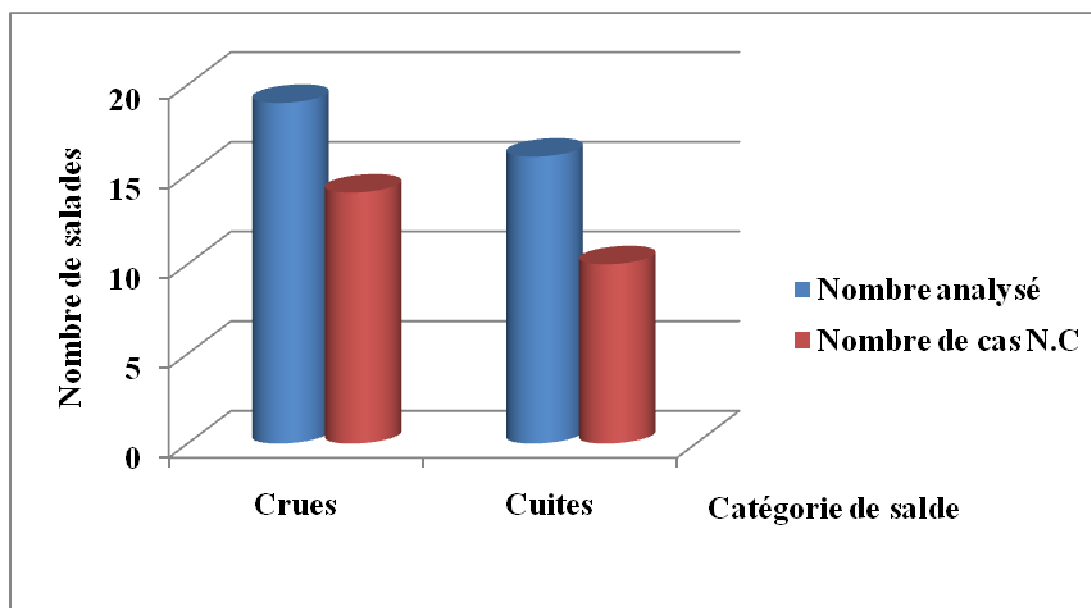


Figure 2 : Pourcentage de non-conformité par catégorie de salade

4- Distribution de la positivité des germes

Les germes responsables de la N.C des salades sont montrés dans la figure 3. On remarque que la contamination par les germes fécaux est la plus dominante (56%), alors que celle causée par les CT est de 33%. Les GT et les St aureus ont été responsables de 8% et de 3% respectivement de N.C

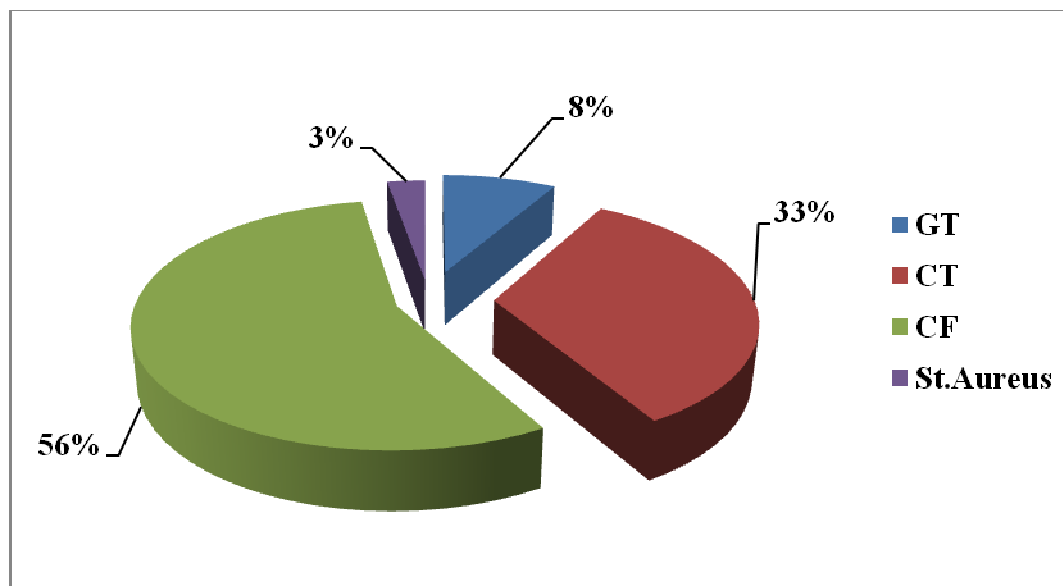


Figure 3 : Distribution de la positivité des germes

5- Répartition de la non-conformité par germe et par catégorie

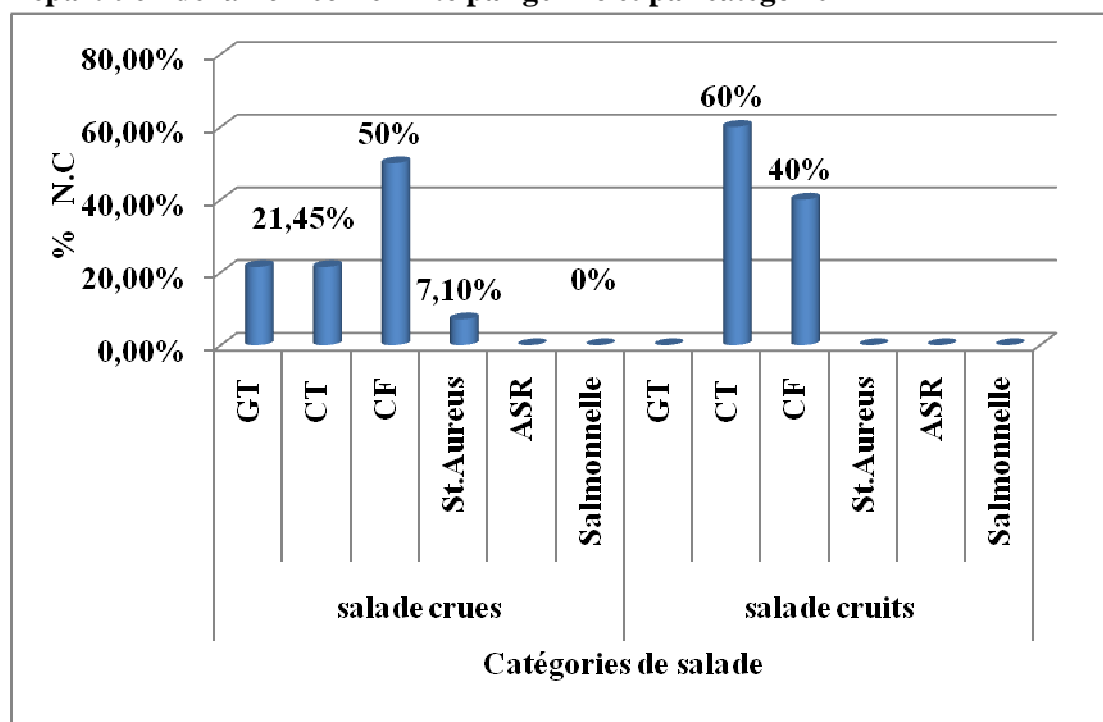


Figure 4: Répartition de la N.C. des salades par germe et par catégorie

Les germes responsables de non-conformité dans les deux catégories de salades sont montrés dans la figure 4. On remarque que la contamination par les germes fécaux est la plus dominante (50%) au niveau de la catégorie des salades crues que celle des salades cuites (40%). Cependant, la contamination causée par les coliformes totaux est plus importante dans le cas des salades cuites (60%).

En ce qui concerne la contamination par les germes pathogènes, on a remarqué seulement les salades crues qui étaient contaminées par les *Staphylococcus aureus* et que le % N.C est de 7,10%.

Discussion

Cette étude est été réalisée au LRDEHM dans le but d'évaluer la qualité hygiénique des salades. Les échantillons étaient au nombre de 35 dont 19 crues et 16 cuites.

L'évaluation de la qualité hygiénique des salades a révélé la présence de 4 types des germes: la flore mésophile aérobie totale, les coliformes totaux, les coliformes thermo tolérants, les staphylocoques. Nous avons noté l'absence des salmonelles et des anaérobies-sulfito-réducteurs dans la totalité des échantillons.

La non-conformité globale a été constatée dans 24 échantillons, soit un pourcentage de 69%. Ce résultat ne concorde pas à celle trouvée par **B. EL MARNISSI *et al*** qui avait noté un pourcentage de non-conformité de 32,70%.

La non-conformité élevée que nous avons notée, pourrait être liée à un défaut d'hygiène aussi bien corporelle, que vestimentaire, technique et locale (**EL OUALI ALAMI et al, 2013**).

La non-conformité vis-à-vis des coliformes fécaux a révélé un pourcentage de 56%, il correspond au % de non-conformité le plus élevé. Ce résultat concorde à celui trouvé par d'autres auteurs.

MOHAMMAD ROSTAMI NEJAD et al, a montré dans une étude réalisée en 2008, sur 42 échantillons de salade de légumes, un niveau élevé de non-conformité causée par les coliformes fécaux (98%) notamment par *E. coli*.

CASTRO-ROSAS J, et al. Avait noté lors d'une étude déroulée en 2012, dans les régions les moins développées du monde Pachuca-ville, Hidalgo, au Mexique, sur un total de 130 salades prélevées de 6 restaurants un pourcentage de 99% des salades contaminées par les coliformes fécaux (CF).

Castro-Rosas J et al ont constaté que la plupart des salades avaient une qualité microbiologique pauvre due à la contamination de la matière première par les eaux usées non traitées. Dans notre cas, la contamination pourrait être due au non respect des conditions hygiéniques de fabrication, à la contamination après préparation par les différents agents, au non respect de la température de conservation.

Le nombre des échantillons de salades cuites contaminées par les coliformes totaux est de (60%). Ce résultat est incomparable à celui de **BAUTISTA et al, Mars(2013)** qui avaient rapporté une charge de 4,1% de bactéries coliformes sur 220 échantillons des salades cuites prêtes à consommer dans la ville de Pachuca (Mexique).

La fréquence importante d'isolement des coliformes totaux pourrait être le résultat d'un traitement thermique inefficace des salades cuites, de mauvaises méthodes de désinfection et de contamination après cuisson.

Concernant les germes pathogènes, une seule souche de *Staphylococcus aureus* a été identifiée au niveau de salades crues avec un taux de contamination qui correspond à 3%. Ce résultat ne concorde pas à l'étude menée en 2012 sur 24 échantillons de salades par **S. KARIM et al**, qui n'avaient isolé aucune souche de *Staphylococcus aureus*.

La présence de *Staphylococcus aureus* pourrait être due à une contamination humaine des aliments vue que cette bactérie est commensale de la peau et des muqueuses de l'Homme (**Y LE LOIR, 2010**).

L'absence des anaérobies sulfite-réducteurs dans la totalité des salades analysés, a été constatée ; ce qui ne concorde pas avec les travaux d'autres auteurs.

L'OISEAU- MAROLLEAU ET LAFOREST ont rapporté un pourcentage de contamination par les A.S.R de 14.4% dans les salades vertes.

RODRIGUEZ-REBOLLO en 1974, avaient noté des teneurs en germes aérobies totaux, en coliformes et ASR plus élevés dans les légumes que dans les fruits.

L'absence de contamination des salades par les salmonelles, a été aussi remarquée. Le même résultat a été constaté aussi bien par les autres auteurs.

Conclusion & Recommandation

L'observation générale des résultats révèle que :

- **69% de salades analysées étaient non-conformes,**
- **Les salades crues ont été plus contaminées que les salades cuites (73,68% contre 62,5%),**
- **La contamination des salades était principalement due aux coliformes (56% de CF et 33% de CT),**
- **Les coliformes totaux sont en excès dans la catégorie de salades cuites, soit un pourcentage de 60% de non-conformité,**
- **La non-conformité due à la flore aérobie totale n'a été concerné que la catégorie des salades crues,**
- **Les Staphylococcus aureus présumés pathogènes sont présents à un pourcentage de 7,10%,**
- **Les anaérobies sulfite-réducteurs et les salmonelles sont absents au niveau de salades aussi bien crues que celles cuites.**
- **L'absence quasi-totale de germes pathogènes et la présence abondante de coliformes témoigne de défaut d'hygiène et de non respect des bonnes pratiques.**

Suite à notre étude et afin éviter les toxi-infections alimentaires pouvant résulter de la consommation de salade ayant une mauvaise qualité hygiénique, il est recommandé de :

- Obliger les préparateurs et les vendeurs à réaliser un contrôle sanitaire,
- Sensibiliser le personnel des restaurants sur le respect systématique des Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH),

- Respecter la chaîne de froid,
- Couvrir les aliments prêts à être consommés pour empêcher leur contamination par les mouches et la poussière,
- séparer les salades crues des salades cuites pour limiter la contamination croisée,
- Nettoyer et désinfecter les locaux et les matériaux de préparation et de vente,
- Instaurer un système HACCP, en responsabilisant un employé sur le suivi et la traçabilité.

Référence bibliographiques

- AFSSA, 2007. Appréciation quantitative des risques liés à *Escherichia coli* O157:H7 dans les steaks hachés surgelés consommés en restauration familiale en France par les enfants de moins de 16 ans. accessed 12 June 2012.
- ALGERT *et al*, 2006. Disparities in access to fresh produce in low-income neighborhoods in Los Angeles. *Am J Prev Med*, 30:365-370.
- AMAT-ROSE J.M, 1997 Dynamiques porteuses de risque en Europe. *Lettre de l'infectiologie*, 12, 326-327.
- AFSSA, 2009. Fiches informatives sur les critères microbiologiques, <http://www.planantibiotiques.sante.gouv.fr/-Afssa-.html>
- AFSSA, Juillet 2003, Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique.
- BELOMARIA *et al*, 2007. Origine environnementale des intoxications alimentaires collectives au Maroc: Cas de la région du Gharb Chr arda Bni Hssen,
- B. EL MARNISSI *et al*, 2012. Contribution A L'étude De La Qualité Microbiologique De Denrées Alimentaires Commercialisées A Fès-Boulemane. Vol 6, N°1, p : 98-117.
- BEUCHAT LR, 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, vol. 4, n° 4, pp. 413-423.

- **BAKER et al, 2006.** The Garden of Eden: acknowledging the impact of race and class in efforts to decrease obesity rates. *AmJ Public Health*; 96:117-1174.
- **BENKADDOUR, 2002.** Situation épidémiologique des toxi-infections alimentaires collectives au Maroc, 1992-2001. Séminaire national sur l'application du système HACCP dans le domaine de l'hygiène alimentaire. Ministère de la santé. Rabat.
- **BENLARABI et al, 2006.** Les toxi-infections alimentaires collectives: données du centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc.
- **BAUTISTA et al, 2013.** Frequency of indicator bacteria, Salmonella and diarrheagenic Escherichia coli pathotypes on ready-to-eat cooked vegetable salads from Mexican restaurants.
- **Bulletin officiel N : 5214-30 rabbis 1-1425 (20.5.2004)** relative aux Critères microbiologiques pour les aliments.
- **CHRISTIAN STEPHAN SECKE, 2007.** Contribution a l'étude de la qualité bactériologique des aliments vendus sur la voie publique de Dakar. Université cheikh anta diop de Dakar.
- **CASTRO-ROSAS et al, 30Mars 2012.** Presence of faecal coliforms, Escherichia coli and diarrheagenic E. coli pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro Universitario, Hidalgo, C.P. 42183, México.
- **CARPENTIER et al, 2007.** Eléments de microbiologie et d'hygiène utiles au bon usage de son réfrigérateur. *Revue Générale du Froid* 1079, 35-40.
- **DESBORDES DELPHINE, 2003.** Qualité microbiologique des fruits et légumes : flores, altérations, risques sanitaires, prévention Rapport de Recherche Bibliographique.
- **EFSA-Q-2004-2009,** Avis du groupe scientifique sur les risques biologiques relatif à la présence de *Clostridium spp.* Dans les denrées alimentaires,
- **FUKUYAMA et al, 2009 .**Efficiency of sodium hypochlorite and calcinated calcium in killing Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp., and Staphylococcus aureus attached to freshly shredded cabbage. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73, 9-14.
- **FAIN ALFRED, 1996,** A Review of the Microbiological Safety of Fresh Salads, Dairy. *Food and Environmental Sanitation*, vol. 16, n° 3, pp. 146-149.

- **GRUINARD, 2003. Microbiologie alimentaire, Dunod, Paris, RIA (Le mensuel de l'innovation alimentaire), 651 p.**
- **HILBORN *et al*, 1999**, a multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. Archives of Internal Medicine, vol. 159, pp. 1758-1764.
- **HAMILTON-MILLER *et al*, 2001**. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. International journal of antimicrobial agents (Netherlands), vol. 18, n° 1, pp. 81-83.
- **HAEGHEBAERT *et al*, 1997, Epidémiologie des maladies infectieuses en France: synthèse sur les toxi-infections alimentaires collectives' en France. Institut de veille sanitaire.**
- **JEAN-LOUIS, Septembre 2007. Microbiologie alimentaire, Université Montpellier.**
- **KORO MARLEN *et al*, 2010. Microbial Quality of Food Available to Populations of Differing Socioeconomic Status American Journal of Preventive Medicine, 38(5):478-81.**
- **LOISEAU-MAROLLEAU *et al*, 1976. Contribution à l'étude de la flore bactérienne des aliments en milieu hospitalier. Med.Mal.Inf, 5, 160- 171.**
- **LONG *et al*, 2002**. General outbreaks of infectious intestinal disease linked with salad vegetables and fruit, England and Wales, 1992-2000. Communicable disease and public health / PHLS (England), vol. 5, n° 2, pp. 101-105.
- **MENG *et al*, 2002**.Introduction. Microbiological food safety, Microbes and Infection, vol. 4, n° 4, pp. 395-397.
- **MOHAMMAD ROSTAMI NEJAD *et al*, 2008**. Assessment of the microbiological safety of salad vegetables from different Restaurants in Ilam. Journal of Paramedical Sciences (JPS).
- **NGUYEN-THE *et al*, 1999**. Fresh and Processed Vegetables. **In:** The microbiological safety and quality of food. Lund Barbara M., Baird-Parker Tony C., Gould Grahame W. vol. 1. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. ISBN 0-8342-1323-0.
- **NKERE *et al*, 2011**. Bacteriological Quality of Foods and Water Sold by Vendors and in Restaurants in Nsukka, Enugu State, Nigeria: A Comparative Study of Three Microbiological Methods. J Health Popul Nutr, 29(6):560-56.
- **NM 08.0.116(2004)**. Recherché de salmonella.
- **NM 08.0.102**.Dénombrement des colonies par comptage de colonies obtenues à 30°C.

- **NM 08.0.124(2004)**.Dénombrements des coliformes thermo-tolérants par comptage des colonies obtenus à 44°C.
- **NM 08.01.104, ISO 6888(2004)**. Directives générales pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus*.
- **NM 08.0.125**. dénombrements en anaérobies des bactéries sulfitoréducteur.
- **NM 08.0.115**. Dénombrements des coliformes totaux par comptage des colonies à 30°C.
- **OMS, 2000, Salubrité des aliments et maladies d'origine alimentaire. Aide Mémoire n° 237.**
- **S.KARIM ET DR EL OUALI LALAMI .A, DR BENNANI L, PR FIKRI BENBRAHIM K, 2012**.Identification biochimique des germes pathogènes.
- **SIGNS *et al*, 2011. Retail food safety risks for populations of different races, ethnicities, and income levels. Journal of Food Protection, 74(10):1717-23.**
- **VERNOZY-ROZAND, 2005**. Escherichia coli 0157:H7, Tec&Doc.
- **VARNAM L.R. EVANS M.G, 1996. Food had borne Pathogens, Manson Publishing Ltd, London.**
- **Y. LE LOIR, 2010**, Staphylococcus aureus Tec&Doc.
- **ZENK *et al*, 2006. Fruit and vegetable access differs by community racial composition and socioeconomic position in Detroit, Michigan. Ethn Dis 2006;16.**