

INSTITUT PASTEUR DE LILLE

Service de Microbiologie et d'Hygiène des Aliments

Domaine du CERTIA

369, rue Jules Guesde

B.P. 39

59651 VILLENEUVE D'ASCQ



50376
1995
428

Université des Sciences et Techniques
de Lille

Laboratoire de Microbiologie Fondamentale
et Appliquée - SN 2

59655 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX

THESE SOUTENUE A L'UNIVERSITE DE LILLE I

PAR PATRICK DEBERGHES

POUR LE TITRE DE DOCTEUR EN

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Contribution à l'étude de l'écologie

des *Enterobacteriaceae*

dans des Unités de Fabrication

de Poudre de Lait

Thèse présentée le 8 Décembre 1995

Président du jury: Pr HORNEZ

Rapporteurs: Pr BOURGEOIS
Pr DESCHAMPS

Examineurs: Pr LECLERC
Mr. CORDIER

REMERCIEMENTS

Plusieurs personnes sont intervenues tout au long de cette thèse, appartenant à différents organismes ou laboratoires. Si ce travail est le mien, il ne serait probablement pas arrivé à terme sans leur aide, qu'elle fut ponctuelle ou continue. Je tiens donc à les en remercier.

Monsieur le Pr. HORNEZ, de l'USTL (Université des Sciences et Technologies de Lille) : *Mes remerciements iront naturellement à vous, pour la disponibilité dont vous firent preuve tout au long de cette étude en tant que maître de thèse. Les nombreux conseils qui me furent prodigués dans l'analyse et la présentation des résultats déterminèrent la valeur scientifique de la thèse. Je tiens donc à vous exprimer ma reconnaissance pour le suivi scientifique de grande qualité que vous effectuèrent pour l'ensemble de mes travaux.*

Monsieur Michel CATTEAU, directeur du SERMHA: *Dès le début de ce projet vous m'avez accordé votre confiance , et vous avez fait en sorte que tous les moyens techniques et logistiques soient mis à ma disposition. Mon séjour dans ce laboratoire ultra-moderne aura été particulièrement enrichissant : Par la découverte et l'utilisation de techniques microbiologiques classiques et récentes ; par l'observation des procédures appliquées dans un laboratoire accrédité ; enfin, par les conférences auxquelles il m'a été donné d'assister lors des cours internationaux de microbiologie. Pour toutes ces raisons, et pour la disponibilité dont vous avez toujours fait preuve à mon égard malgré vos nombreuses responsabilités, je tiens vivement à vous remercier.*

Monsieur CORDIER, de la société NESTEC : *La confiance que vous m'avez accordée dès le départ de cette étude ne s'est jamais démentie. L'accueil que vous m'avez réservé pendant trois mois dans votre laboratoire au C.R.N. (Centre de Recherche Nestlé) fut particulièrement chaleureux et instructif, et vous firent en sorte que mes travaux soient réalisés dans d'excellentes conditions. Vous firent preuve d'une grande disponibilité à tous les niveaux de l'étude , malgré les nombreux autres projets dont vous avez la responsabilité. C'est pourquoi je tiens à vous adresser mes remerciements.*

Monsieur Jean-Pierre VINCENT, du SERMHA : *Vous vous êtes complètement investis dans cette étude, dépensant votre temps sans compter pour m'accorder votre aide technique et pour vous déplacer en usines, en Suisse ou à Paris, malgré un planning toujours chargé. J'ai pu bénéficier de votre expérience industrielle, vos conseils techniques s'étant avérés très précieux. Dans cette étude je vous dois beaucoup. Très sincèrement, merci.*

Monsieur Thomas KLEISS, de la société NESTEC : Tu fus plongé dans cette étude complexe en cours de route, malgré cela tu en as assuré un excellent encadrement. Ton départ hors d'Europe et tes impératifs professionnels de plus en plus nombreux ne t'empêchèrent pas de continuer à assurer le suivi de cette étude, et ce dans un esprit de camaraderie. Je te dois donc un très grand merci.

Monsieur COX : Vous fûtes l'instigateur de ce projet, et vos conseils, appuyés sur votre expérience industrielle en matière d'hygiène, orientèrent les grandes lignes de la thèse. Sans vous ce projet n'eût peut-être jamais été envisagé. Je tiens donc à vous faire part de ma reconnaissance.

Monsieur le Pr. DESCHAMPS, de l'ISTAB (Institut Scientifique et Technique des Aliments de Bordeaux). Les modifications en profondeur que vous proposâtes sur la présentation des résultats déterminèrent en grande partie la présentation finale du rapport. Pour ces nombreux conseils, pour votre disponibilité, et pour avoir accepté d'être rapporteur dans mon jury de thèse, je vous adresse mes remerciements.

Monsieur le Pr BOURGEOIS, de l'ADRIA (Association pour le Développement de la Recherche Appliquée aux Industries Agricoles et Alimentaires) Quimper. Malgré vos nombreuses responsabilités vous avez fait preuve d'une grande disponibilité, et vos nombreux conseils permirent de finaliser la thèse. Je tiens donc à vous remercier d'avoir accepté d'être rapporteur dans mon jury de thèse.

Pour le SERMHA, je remercierai en particulier les personnes suivantes:

Monsieur DURIEZ pour ses conseils techniques et sa bonne humeur,

Carole pour sa disponibilité lors de la réalisation de commandes et de devis, et pour son aide ainsi que celle de **Madame COUCKE** au service des milieux,

Anne-Marie pour son aide dans l'utilisation du chromatographe en phase gaz,

Arnaud, de la cellule audio-visuelle, pour le temps qu'il a consacré à mes documents,

L'ensemble du laboratoire pour m'avoir laissé un accès parfois envahissant aux installations,

Le personnel de la bibliothèque de la maison mère pour sa courtoisie.

Pour la société NESTEC, j'adresserai mes remerciements à **Monsieur ICHLIEMAN** pour ses nombreux conseils en statistique industrielle, ainsi qu'à **Madame FUHRER** pour avoir pris en charge la collection de souches.

Je remercie également Monsieur le Pr BANKS, du laboratoire Campden Food and Drink Research Association, pour les ribotypages qu'il a effectués, offrant ainsi une information scientifique de valeur comme élément de comparaison avec d'autres résultats.

Je tiens également à remercier Mademoiselle GAVINI, de l'INSERM, pour son aide dans l'exploitation des résultats.

Enfin je ne saurai assez remercier mes proches, ma famille, pour leur soutien de tous les instants. C'est à eux que je dois le plus.

PRESENTATION DU SERMHA

Le SERMHA (Service de Microbiologie et d'Hygiène des Aliments), qui fait partie de l'Institut Pasteur de Lille, est dirigé par Mr. CATTEAU. Les multiples activités qui y sont développées : analyses, audits, diagnostics hygiène, formations, recherche et développement, offrent aux entreprises des solutions à leurs besoins actuels en matière d'hygiène.

Le SERMHA a développé quatre grands axes d'activité :

- L'analyse microbiologique : Plus de 150 types d'analyses peuvent être réalisées. A côté des méthodes de référence, le SERMHA a développé des méthodes nouvelles d'analyses rapides qui améliorent l'efficacité des auto-contrôles industriels et permettent un gain de temps dans l'application de mesures correctives : Epifluorescence, impédancemétrie, bioluminescence, cytométrie de flux ou sur filtre.

- L'assistance technique et le conseil. Les actions de prévention des risques microbiologiques vont du simple diagnostic à l'audit hygiène d'établissement. Le SERMHA aide aussi à la mise en place de systèmes d'Assurance Qualité afin de préparer les entreprises à la certification.

- Les programmes de recherche et développement. Ces programmes portent sur la mise au point de produits nouveaux en atelier pilote, l'évaluation de nouveaux milieux de culture et de nouveaux tests de diagnostic (validation AFNOR), et la détermination de la date limite de consommation (DLC) grâce à la microbiologie prédictive.

-La formation, de la sensibilisation à l'hygiène au Cours International de Microbiologie. L'Institut Pasteur de Lille a créé en 1953, avec le soutien de l'OMS, le 1er Cours International de Microbiologie Alimentaire en langue française. Plus de 50000 heures stagiaires sont effectuées chaque année dans les cours d'initiation et les cours internationaux.

AVANT-PROPOS

Au cours des 10-15 dernières années les normes d'hygiène pour produits infantiles sont devenues de plus en plus exigeantes, notamment pour les coliformes au niveau international, bien que certains pays comme la Hollande ou le Portugal ne reconnaissent que les Entérobactéries (Von Wiese, 1986). Compte tenu de ces normes, les mesures de contrôle de l'hygiène basées sur des concepts comme le Hazard Analysis Critical Control Point (H.A.C.C.P.) sont devenues nécessaires pour éviter la contamination du produit (Simonsen *et al.*, 1987). Cette démarche impose une maîtrise de l'écologie bactérienne des ateliers de production par la surveillance de la présence de bactéries sur les surfaces, dans l'air et dans les résidus (Van Schothorst et Jongeneel, 1992). La séparation physique des zones sèches (critiques) et humides ainsi qu'un contrôle sévère des accès du personnel aux zones critiques sont à l'origine de nettes améliorations de la qualité microbiologique des produits (ICMSF, 1988). Pour mesurer l'efficacité de ces mesures d'hygiène, des indicateurs tels que les *Enterobacteriaceae* sont utilisés.

Malgré toutes ces mesures, des *Enterobacteriaceae* peuvent se retrouver dans le produit fini (Muytjens *et al.*, 1988), tels *Enterobacter sakazakii* (Noriega *et al.*, 1991), *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Citrobacter diversus* (Casewell *et al.*, 1981; Kornacki et Marth, 1982), germes potentiellement pathogènes responsables d'infections opportunistes chez les nourrissons, notamment par des produits diététiques infantiles. Le caractère pathogène opportuniste dénote la propension d'un germe à développer une infection sous certaines conditions inhabituelles, notamment en cas de mauvaises pratiques, d'hygiène insuffisante ou encore chez une personne immunodéprimée (femme enceinte, nourrisson, personne âgée, grand brûlé, personnes atteintes du cancer ou du SIDA...). Certaines *Enterobacteriaceae* montrent une résistance particulière aux conditions rencontrées dans les zones sèches alors que d'autres disparaissent (Roszak et Colwell, 1987).

L'objet de cette étude, réalisée dans deux unités de production de poudre de lait, est de mieux appréhender la présence et la distribution de différents groupes microbiens, notamment les *Enterobacteriaceae*, et plus précisément l'espèce *Enterobacter sakazakii*, dans l'environnement des différentes zones de production. L'analyse globale de ces flores microbiennes doit permettre de mieux comprendre les relations entre ces différentes zones et d'aller au-delà de certaines investigations limitées à la recherche de germes pathogènes (Gabis *et al.*, 1989). La répartition de ces germes sera étudiée par rapport aux conditions environnementales rencontrées dans les différentes zones et locaux, notamment la température ou le trafic de personnel. A partir de ces données écologiques les lieux susceptibles de représenter des Points Critiques à Maîtriser devront être précisés. Les résultats obtenus lors de ces investigations permettront de clarifier la situation au niveau des germes indicateurs d'hygiène et d'apporter des données concrètes dans les discussions sur l'utilisation de certains

groupes d'organismes (Entérobactéries, coliformes totaux, coliformes thermotolérants), leur utilisation restant controversée (Cox *et al.*, 1988). Les retombées de cette étude doivent permettre de confirmer l'utilité des mesures de sécurité prises à ce jour et d'en préciser les éventuels points faibles à éliminer. D'autres retombées pourront se situer au niveau de la standardisation des plans d'échantillonnage et de la méthodologie de recherche de germes spécifiques.

TABLE DES MATIERES

1 - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	page 2
1.1 - NOTIONS D'ECOLOGIE	page 2
1.2 - DESCRIPTION DU PROCEDE INDUSTRIEL DE FABRICATION DE POUDRE DE LAIT	page 3
1.3 - PRATIQUES ACTUELLES EN CONTROLE DE L'HYGIENE	page 8
1.3.1 - Normes	page 8
1.3.2 - Contrôle du risque microbiologique	page 8
1.3.2.1 - <u>Démarche "Hazard Analysis Critical Control Points"</u>	page 8
1.3.2.2 - <u>Mesures d'hygiène</u>	page 9
1.3.3 - Indicateurs d'hygiène	page 10
1.3.3.1 - <u>Entérobactéries</u>	page 10
1.3.3.2 - <u>Coliformes</u>	page 11
1.3.3.3 - <u>Coliformes fécaux</u>	page 11
1.3.3.4 - <u>Escherichia coli</u>	page 12
1.4 - PRESENCE DES <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> DANS LES PRODUITS ALIMENTAIRES	page 12
1.5 - PRESENCE DES <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> DANS LES ENVIRONNEMENTS INDUSTRIELS	page 14
1.6 - PATHOGENICITE DES PRINCIPAUX BGN IDENTIFIES AU COURS DE CETTE ETUDE	page 15
1.6.1 - Incidence en milieu hospitalier	page 15
1.6.2 - <i>Enterobacteriaceae</i>	page 16
1.6.2.1 - <u>Enterobacter sakazakii</u>	page 16
1.6.2.2 - <u>Enterobacter cloacae</u>	page 17
1.6.2.3 - <u>Escherchia coli</u>	page 17
1.6.2.4 - <u>Klebsiella</u>	page 18
1.6.2.5 - <u>Serratia</u>	page 18
1.6.2.6 - <u>Citrobacter</u>	page 19
1.6.3 - Autres BGN	page 20
1.7 - TECHNIQUES DE PRELEVEMENT	page 20
1.7.1 - Prélèvements de surface	page 20
1.7.2 - Prélèvements d'air	page 21

2 - MATERIEL ET METHODES	page 23
2.1 - STRUCTURE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS DES DIVERS ECHANTILLONNAGES	page 23
2.1.1 - 1er échantillonnage usine A (A1)	page 23
2.1.2 - 2ème échantillonnage usine A (A2)	page 23
2.1.3 - Echantillonnage usine B	page 23
2.2 - TECHNIQUES DE PRELEVEMENT	page 23
2.2.1 - Eponge	page 23
2.2.2 - Ecouvillon	page 24
2.2.3 - Autres techniques	page 24
2.3 - DENOMBREMENTS	page 25
2.3.1 - Les milieux de culture	page 25
2.3.1.1 - <u>Les milieux solides</u>	page 25
2.3.1.2 - <u>Les milieux liquides</u>	page 26
2.3.2 - Techniques de dénombrement	page 27
2.3.2.1 - <u>Préparation de l'échantillon</u>	page 27
2.3.2.2 - <u>Ensemencement des milieux de culture</u>	page 28
2.3.2.3 - <u>Incubation</u>	page 30
2.3.2.4 - <u>Numération</u>	page 30
2.4 - SELECTION ET REPIQUAGE DES COLONIES	page 31
2.5 - IDENTIFICATION	page 31
2.5.1 - Les produits	page 31
2.5.2 - Techniques d'identification	page 32
2.5.2.1 - <u>Caractérisation de l'ensemble des germes recherchés</u>	page 32
2.5.2.2 - <u>Staphylococcus aureus</u>	page 32
2.5.2.3 - <u>Listeria</u>	page 33
2.5.2.4 - <u>Entérobactéries et coliformes</u>	page 33
2.5.2.4.1 - Cartes GNI	page 33
2.5.2.4.2 - Galeries API 20E	page 34
2.5.2.4.3 - Identification des acides gras membranaires par la C.P.G.	page 34
2.5.2.4.4 - Test de Mackenzie	page 36
2.6 - RIBOTYPIE	page 37
2.7 - METHODOLOGIE STATISTIQUE	page 38
2.8 - DEFINITION DES ZONES SELON L'ACTIVITE ET L'HUMIDITE	page 39
2.9 - EXPLOITATION DES RESULTATS	page 41

3 - RESULTATS	page 42
3.1 - ETUDE DU SITE A : ELABORATION D'UNE METHODOLOGIE D'ETUDE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE D'UN ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL	page 42
3.1.1 - Evaluation de la fiabilité des techniques utilisées	page 42
3.1.1.1 - <u>Techniques de prélèvement</u>	page 42
3.1.1.2 - <u>Milieus utilisés</u>	page 43
3.1.1.3 - <u>Techniques d'identification</u>	page 45
3.1.1.3.1 - AMS VITEK	page 45
3.1.1.3.2 - API 20E	page 47
3.1.1.3.3 - Test de Mackenzie	page 50
3.1.1.4 - <u>Exploitation des résultats d'identifications</u>	page 51
3.1.2 - Etude préliminaire de la qualité microbiologique de l'environnement sur l'ensemble d'une unité de production	page 53
3.1.2.1 - <u>Choix d'un indicateur de maîtrise de la qualité microbiologique de l'environnement</u>	page 53
3.1.2.2 - <u>Eléments de confirmation d'une modification de la sectorisation</u>	page 55
3.1.2.3 - <u>Etude de la diversité sur les Entérobactéries: Observation de l'espèce <i>Enterobacter sakazakii</i> en zone protégée</u>	page 59
3.2 - ETUDE DU SITE B : FOCALISATION DE L'ETUDE ENVIRONNEMENTALE SUR LA ZONE PROTEGEE	page 60
3.2.1 - Répartition statistique des flores étudiées	page 61
3.2.2 - Propositions de valeurs de référence	page 69
3.2.2.1 - <u>Critères analytiques</u>	page 69
3.2.2.2 - <u>Critères indicatifs</u>	page 73
3.2.3 - Etude de la diversité sur les coliformes thermotolérants	page 74
3.3 - CARACTERISATION DE SOUCHES D'ENTEROBACTER SAKAZAKII EN RELATION AVEC L'ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL	page 77
3.3.1 - Répartition des profils VITEK en usine	page 77
3.3.2 - Répartition des profils de ribotypie en usine	page 80
3.3.3 - Effet de la température environnementale sur la composition en acides gras membranaires	page 81

4- DISCUSSION	page 86
4.1 - NATURE DE L'ENVIRONNEMENT DES USINES ETUDIEES	page 86
4.1.1 - Flore identifiée	page 86
4.1.2 - Réalité d'une modification de la sectorisation en zone de production	page 86
4.1.3 - Niveaux hygiéniques observés	page 87
4.1.3.1 - <u>Résidus</u>	page 87
4.1.3.2 - <u>Surfaces</u>	page 87
4.1.3.3 - <u>Air</u>	page 88
4.2 - DETERMINATION DE POINTS POUVANT CONSTITUER DES P.C.M.	page 88
4.3 - PROPOSITION D'UNE METHODOLOGIE DE SURVEILLANCE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE L'ENVIRONNEMENT	page 89
4.3.1 - Contrôle du respect des bonnes pratiques hygiéniques par la recherche d' <i>Escherichia coli</i>	page 89
4.3.2 - Contrôle de la présence d' <i>Enterobacter sakazakii</i>	page 90
4.4 - APPRECIATION DE LA FIABILITE DES TECHNIQUES UTILISEES	page 90
4.4.1 - Prélèvements de surface à l'éponge	page 90
4.4.2 - Milieux de culture	page 91
4.4.3 - A.M.S. VITEK	page 91
4.4.4 - Galeries API 20E	page 93
4.4.5 - Analyse des acides gras membranaires par la C.P.G.	page 93
4.4.5.1 - <u>Identification d'<i>Enterobacter sakazakii</i></u>	page 93
4.4.5.2 - <u>Appréciation de l'origine d'une souche d'<i>Enterobacter sakazakii</i></u>	page 94
4.4.6 - Ribotypie	page 95
5 - CONCLUSION	page 96
5.1 - OBSERVATIONS RECUEILLIES	page 96
5.2 - PERSPECTIVES	page 97
BIBLIOGRAPHIE	page 98
ANNEXES	page 119

ABREVIATIONS

A1 : Usine A, première campagne de prélèvements

A2 : Usine A, deuxième campagne de prélèvements

A.M.S.: Auto Microbic System

B : Usine B

B.E.A. : Bile Esculine Azide

B.G.N. : Bacilles à Gram Négatif

B.L.B.V.B. : Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant

C : Coliformes totaux

C.F.C. : Cétrimide Fucidine Céfaloridine

col. : colonies

C.P.G. : Chromatographie en Phase Gaz

E : Entérobactéries

G.A.M. : Germes Aérobie Mésophile

G.N.I. card : Gram Negative Identification card

H.A.C.C.P. : Hazard Analysis Critical Control Points

M.R.S. : Man Rogosa Sharpe

O.M.P.: Outer Membrane Protein

P.C.A. : Plate Count Agar

P.C.M. : Points Critiques à Maîtriser

rdc : rez-de-chaussée

S. K. : Schleifer et Kraemer

T : Coliformes thermotolérants

ufc : unité formant colonie

V.R.B.G. : Violet Red Bile Glucose

V.R.B.L. : Violet Red Bile Lactose

ZHI : Zone Humide Interne

ZSNP : Zone Sèche Non Protégée

ZSP : Zone Sèche Protégée

ZSSP : Zone Sèche Semi-Protégée

LISTE DES FIGURES

1 : Ligne de fabrication humide d'une unité de production de poudre de lait.	page 4
2 : Ligne de fabrication sèche d'une unité de production de poudre de lait.	page 5
3 : Représentation de l'usine A.	page 6
4 : Représentation de l'usine B.	page 7
5 : Protocole utilisé pour le ribotypage de souches d' <i>Enterobacter sakazakii</i> .	page 38
6 : Résultats des identifications à l'espèce pour différents milieux	page 44
7 : Evaluation de différents critères qualitatifs sur le genre <i>Escherichia</i> .	page 52
8 : Evaluation de différents critères qualitatifs sur l'espèce <i>Enterobacter cloacae</i> .	page 52
9 : Evaluation de différents critères qualitatifs sur l'espèce <i>Enterobacter sakazakii</i> .	page 52
10 : Evaluation de différents critères qualitatifs sur l'espèce <i>Escherichia coli</i> .	page 52
11 : Evaluation de différents critères qualitatifs sur l'espèce <i>Citrobacter freundii</i> .	page 52
12 : Proportions de prélèvements présentant des dénombrements <100 ufc/cm ² ou /g pour la zone regroupant la ZSP et la ZSSP(A).	page 54
13 : Proportions de prélèvements présentant des dénombrements <100 ufc/cm ² ou /g pour la ZSNP (A).	page 54
14 : Proportions de prélèvements présentant des dénombrements <100 ufc/cm ² ou /g pour la ZHI (A).	page 54
15 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la proportion de prélèvements de résidus présentant un dénombrement inférieur à 100 ufc/g.	page 55
16 : Réponse par zone des seuils de dénombrement en G.A.M. pour les prélèvements de résidus.	page 57
17 : Réponse par zone des seuils de dénombrement en Entérobactéries pour les prélèvements de résidus.	page 57
18 : Réponse par zone des seuils de dénombrement en coliformes totaux pour les prélèvements de résidus.	page 57
19 : Réponse par zone des seuils de dénombrement en coliformes thermotolérants pour les prélèvements de résidus.	page 57
20 : Réponse par zone des seuils de dénombrement en G.A.M. pour les prélèvements de surface à l'éponge.	page 58
21 : Réponse par zone des seuils de dénombrement en Entérobactéries pour les prélèvements de surface à l'éponge.	page 58
22 : Réponse par zone des seuils de dénombrement en coliformes totaux pour les prélèvements de surface à l'éponge.	page 58
23 : Réponse par zone des seuils de dénombrement en coliformes thermotolérants pour les prélèvements de surface à l'éponge.	page 58
24 : Profils de répartition des espèces par zone.	page 60
25 : Comparaisons de charges microbiennes entre locaux sur le site B (sols).	page 64
26 : Comparaisons de charges microbiennes entre locaux sur le site B (aspirateurs).	page 67
27 : Comparaison des charges en <i>Enterobacter sakazakii</i> entre locaux sur le site B.	page 68

28 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement en G.A.M. pour les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs.	page 71
29 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement en Entérobactéries pour les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs.	page 71
30 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement en coliformes totaux pour les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs.	page 71
31 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement en coliformes thermotolérants pour les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs.	page 71
32 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement en G.A.M. pour les prélèvements de surfaces de sols à l'éponge.	page 72
33 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement en Entérobactéries pour les prélèvements de surfaces de sols à l'éponge.	page 72
34 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement en coliformes totaux pour les prélèvements de surfaces de sols à l'éponge.	page 72
35 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement en coliformes thermotolérants pour les prélèvements de surfaces de sols à l'éponge.	page 72
36 : Proportions des différentes espèces identifiées avec une ZSSP pour les prélèvements de surfaces de sols à l'éponge.	page 75
37 : Proportions des différentes espèces identifiées avec une ZSSP pour les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs.	page 76

LISTE DES TABLEAUX

1 : Techniques de préparation des échantillons et d'ensemencement - Seuils de détection(A1).	page 29
2 : Techniques de préparation des échantillons et d'ensemencement - Seuils de détection (A2, B).	page 30
3 : Etude comparative des dénombrements obtenus par éponge et par écouvillon.	page 43
4 : Proportions de prélèvements (%) par seuil de dénombrement sur 109 prélèvements de surface pour chaque dénombrement effectué.	page 43
5 : Proportions de prélèvements (%) par seuil de dénombrement sur 68 prélèvements de résidus pour chaque dénombrement effectué.	page 44
6 : Durées et seuils moyens d'identification par l'A.M.S. pour les genres les plus rencontrés au cours de cette étude.	page 45
7 : Comparaison de l'A.M.S. et du système API 20E.	page 46
8 : Comparaison des identifications obtenues par l'A.M.S. à 35.2°C et par galeries API 20E incubées à 37°C et à 30°C.	page 48
9 : Comparaison de réponses aux tests biochimiques compris dans la galerie API 20E incubée à 30°C et à 37°C pour 40 souches d' <i>Enterobacteriaceae</i> .	page 49
10 : Résultats du test de Mackenzie pour des souches de coliformes provenant d'un environnement industriel.	page 50
11.1 et 11.2 : Proportions (%) de prélèvements par gamme de ratios, par zone et par mode de prélèvement après création d'une ZSSP.	page 56
12.1 et 12.2 : Classement des locaux par rang croissant selon le test de Kruskal-Wallis (sols).	pages 62/63
13.1 et 13.2 : Classement des locaux par rang croissant selon le test de Kruskal-Wallis (aspirateurs).	page 66
14 : Proportions (%) de prélèvements par gamme de ratios, par zone et par mode de prélèvement après création d'une ZSSP.	page 69
15 : Localisation et dénombrement d' <i>Enterobacter sakazakii</i> à partir du milieu VRBL incubé 24 h à 44.5°C.	page 73
16.1 et 16.2 : Localisation des profils Vitek d' <i>Enterobacter sakazakii</i> .	pages 78
17 : Classement de souches d' <i>Enterobacter sakazakii</i> par ribogroupe (A2 + B).	page 80
18.1, 18.2 et 18.3 : Proportions respectives des différents acides gras membranaires de souches référencées d' <i>Enterobacter sakazakii</i> ainsi que de souches provenant d'un environnement industriel selon la température et le trafic de personnel.	pages 82/83/84
20 : Effet de la température ambiante des lieux de prélèvement sur le ratio acides gras totaux saturés/insaturés et acides gras hexadecanoïques saturés/insaturés pour des souches d' <i>Enterobacter sakazakii</i> .	page 85
23 : Proportions respectives des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés pour des ribogroupes de souches d' <i>Enterobacter sakazakii</i> provenant d'un site industriel.	page 85

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1 - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 - NOTIONS D'ÉCOLOGIE

Selon Ramade (1981), l'objet de l'écologie tient en l'étude des relations des êtres vivants entre eux et avec leur milieu environnant.

Quelque soit le niveau d'organisation auquel on se place, on sera toujours conduit à étudier les effets d'un certain nombre de paramètres fondamentaux, les facteurs écologiques, qui caractérisent les particularités physico-chimiques ou biologiques de chaque milieu et sont susceptibles d'agir directement sur les êtres vivants (Dajoz, 1971). On peut distinguer des facteurs abiotiques (température, facteurs propres à la composition du milieu ...) et des facteurs biotiques (interactions intra et interspécifiques, compétition ...). Certains facteurs écologiques, comme la température, sont dits indépendants de la densité car leurs effets s'exercent sur l'individu de façon identique quelle que soit la densité des effectifs de la population à laquelle il appartient.

D'après Watt (1973), tout phénomène écologique peut s'expliquer par le jeu de 5 variables écologiques fondamentales :

- la matière: Pour chaque élément existe un domaine de concentrations à l'intérieur duquel la vie de telle ou telle espèce est possible, avec une valeur optimale dénommée *preferendum*.
- l'énergie: L'évolution naturelle des écosystèmes tend à la constitution de communautés d'êtres vivants qui utilisent de façon optimale le flux d'énergie disponible.
- l'espace: Cette dimension écologique conditionne en premier lieu l'intensité des compétitions intra et interspécifiques.
- la diversité: Cette notion, qui caractérise mieux qu'aucun autre critère toute communauté d'êtres vivants, est liée à la richesse spécifique d'un peuplement, c'est-à-dire aux proportions respectives des différentes espèces présentes dans celui-ci.
- le temps: Cette dimension écologique conditionne l'évolution de tout système écologique vers un état de maturité, avec une utilisation optimale de l'énergie.

Au cours de nos travaux nous avons étudié la variable écologique "diversité" pour les Entérobactéries en unité de production de poudre de lait. La détermination des proportions des différentes espèces d'Entérobactéries observées dans l'environnement industriel doit permettre de caractériser cette communauté microbienne.

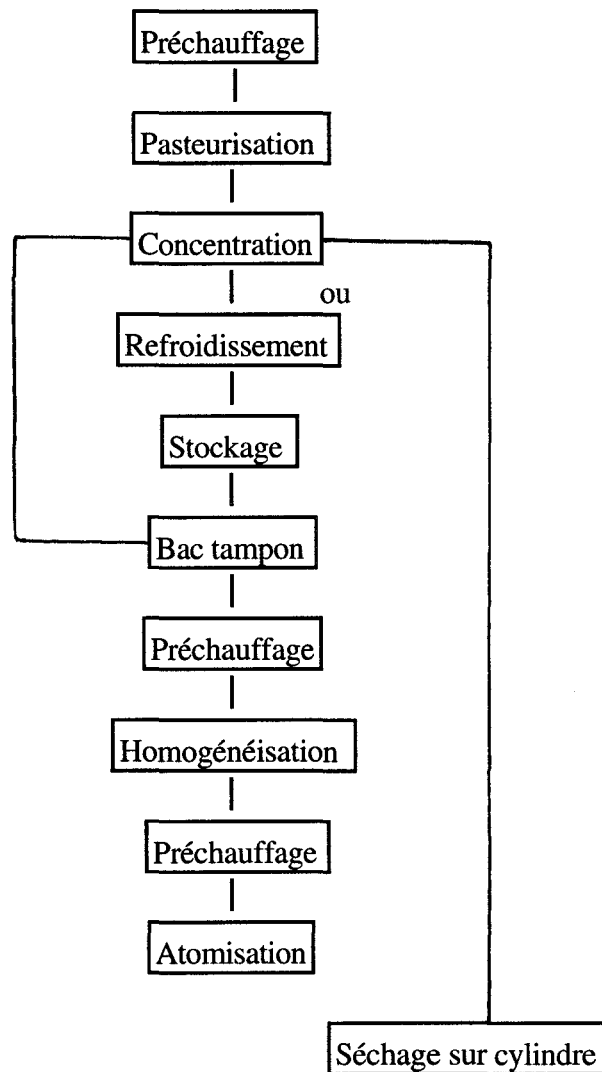
Nous nous sommes également intéressés au facteur écologique "température" comme élément de caractérisation de souches d'Entérobactéries. L'étude de ce critère est particulièrement intéressant en unité de production de poudre de lait car les écarts de température entre locaux y sont importants (de 15°C dans les locaux de stockage du lait à 60°C en tour d'atomisation).

1.2 - DESCRIPTION DU PROCEDE INDUSTRIEL DE FABRICATION DE POUDRE DE LAIT

La conservation du lait par diminution de l'activité de l'eau n'est pas récente. Au 13^e siècle, Marco Polo rapporta la production par les mongols de lait concentré et séché par le soleil, produit utilisé lors des voyages et reconstitué par addition d'eau. En 1810 Nicolas Appert déshydrata du lait concentré à l'aide d'air chaud (Phil, 1981). Depuis le premier brevet déposé par Grimwade en 1855, le lait en poudre est largement utilisé pour l'alimentation des enfants en bas âge.

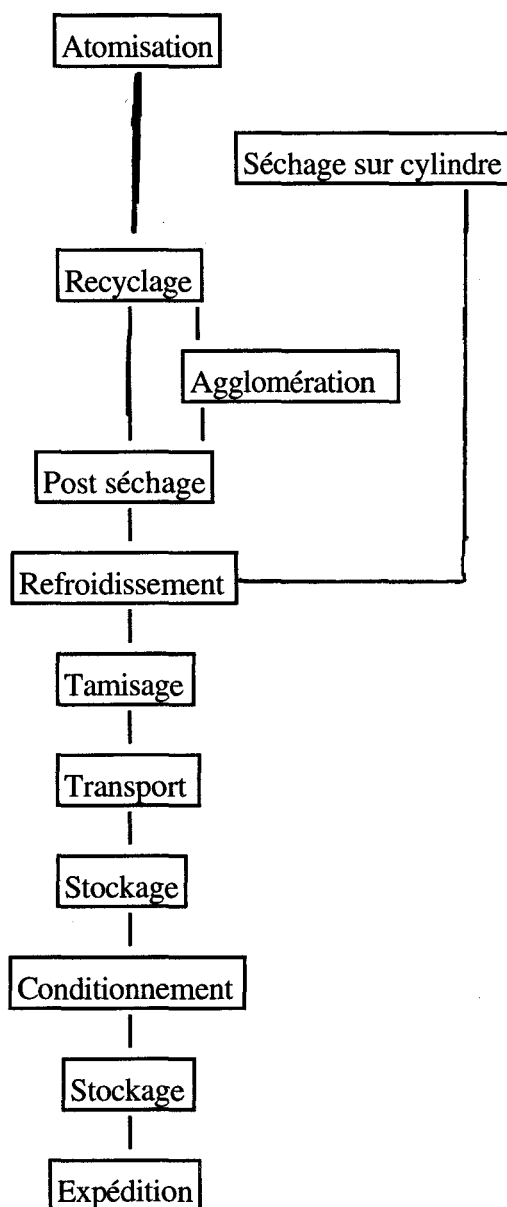
Le lait cru est stocké dans des citernes et le taux de matière grasse est standardisé. Un préchauffage est effectué avant évaporation, à 72°C pendant 15 secondes (produit basse température), ou à 85°C pendant 20 minutes (produit haute température), afin de réduire le nombre de microorganismes. Le lait pasteurisé est concentré jusqu'à 40-55% de matière sèche. La concentration est précédée d'un préchauffage destiné d'une part à stabiliser les protéines, d'autre part à inactiver les lipases (Cheftel et Cheftel, 1976). L'obtention de poudre de lait s'effectue en éliminant l'eau par séchage sur des rouleaux rotatifs chauffés par air, vapeur ou eau chaude, ou par atomisation. L'atomisation consiste à pulvériser un produit liquide sous forme de fines gouttelettes dans un courant d'air chaud pour en extraire l'eau et n'en garder que la partie soluble sous forme de poudre. Aux U.S.A. l'atomisation s'effectue plutôt à l'aide de buses, alors que les usines européennes favorisent la technique de l'atomiseur rotatif. Lors de l'atomisation, le lait concentré est d'abord préchauffé, puis pompé vers le sécheur où il est soumis au moyen de buses ou d'une turbine d'atomisation à une dessiccation par pulvérisation sous la forme d'un fin brouillard dans une grande chambre parcourue par un courant d'air chauffé à 150-160°C (Trémolières *et al.*, 1980), et séché à une teneur de 3% à 8% d'eau (Luquet, 1985). La poudre lourde tombe dans le bas de la chambre d'atomisation, alors que la poudre légère est transportée en même temps que la vapeur d'eau par le courant d'air chaud, et est recyclée soit par une série de cyclones par centrifugation, soit par des filtres tubulaires. Immédiatement après le traitement, la poudre est refroidie par un courant d'air froid, transportée et conditionnée dans de grands sacs (bigbags), puis dans des boîtes destinées au consommateur. Selon Jouve (1993), le process de fabrication général des produits laitiers déshydratés peut être décomposé en deux parties (figures 1 et 2).

Figure 1 : Ligne de fabrication humide d'une unité de production de poudre de lait.



Le bac tampon permet d'assurer la continuité des opérations en assurant une réserve de concentré, mais il représente un risque microbiologique, la température y étant de 45°C. Une solution est d'utiliser de manière alternative deux bacs tampon.

Figure 2 : Ligne de fabrication sèche d'une unité de fabrication de poudre de lait.



Le produit obtenu, la poudre de lait, est employé comme ingrédient riche en protéines dans la préparation industrielle de nombreux aliments (Cheftel et Cheftel, 1976). Trémolières *et al.* (1980) donnent des laits en poudre la définition suivante : "Ce sont des laits pratiquement privés d'eau (moins de 4%) qui ne peuvent donc plus être le siège de développements microbiens. Ils sont commercialisés sous la forme de poudre de lait entier (26% de matière grasse), de poudre de lait partiellement écrémé (17% de matière grasse) et de poudre de lait écrémé (moins de 1.5% de matière grasse)".

Les lignes de fabrication des deux usines A et B sont présentées aux pages suivantes (figures 3 et 4).

Figure 3 : Représentation de l'usine A

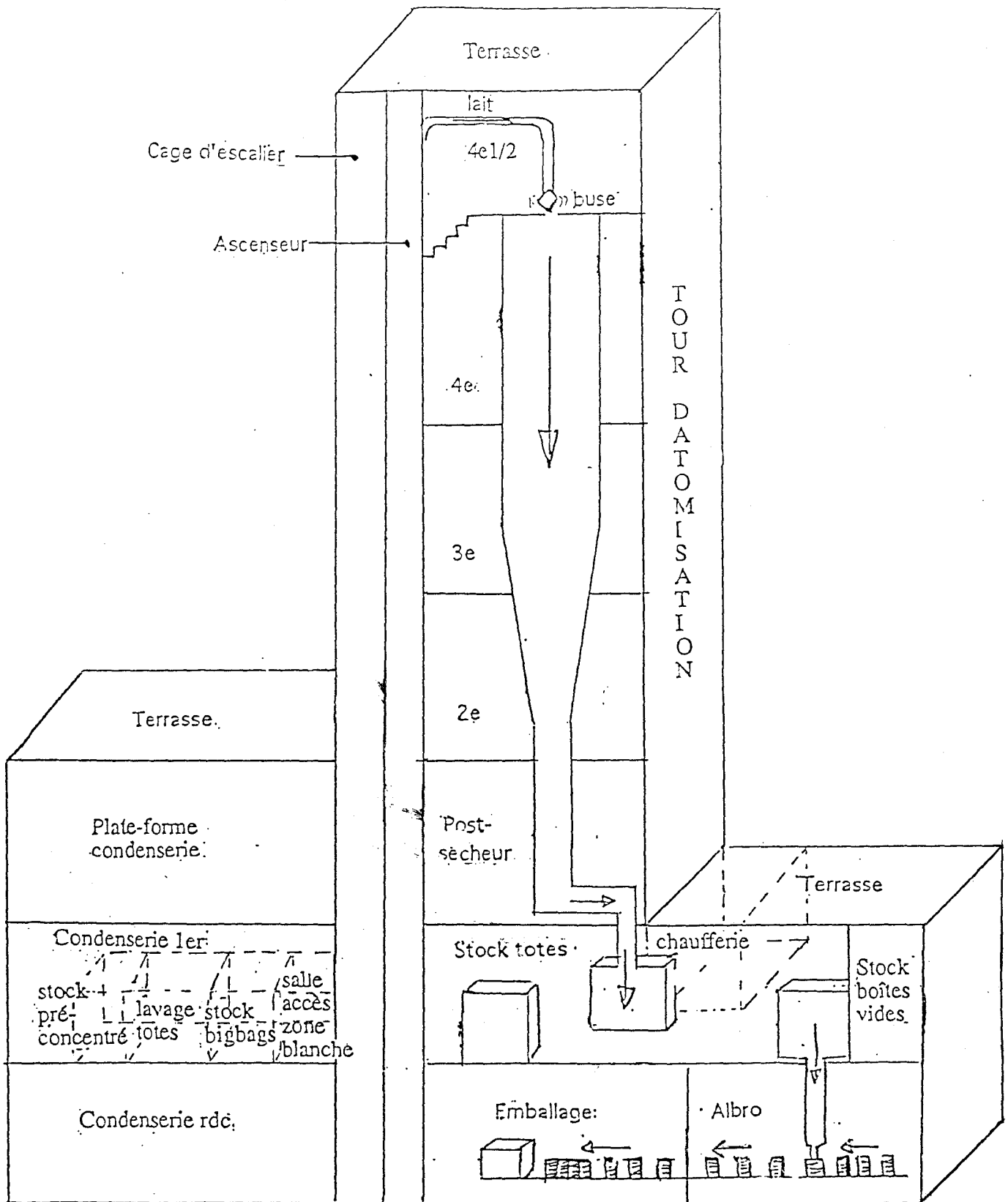
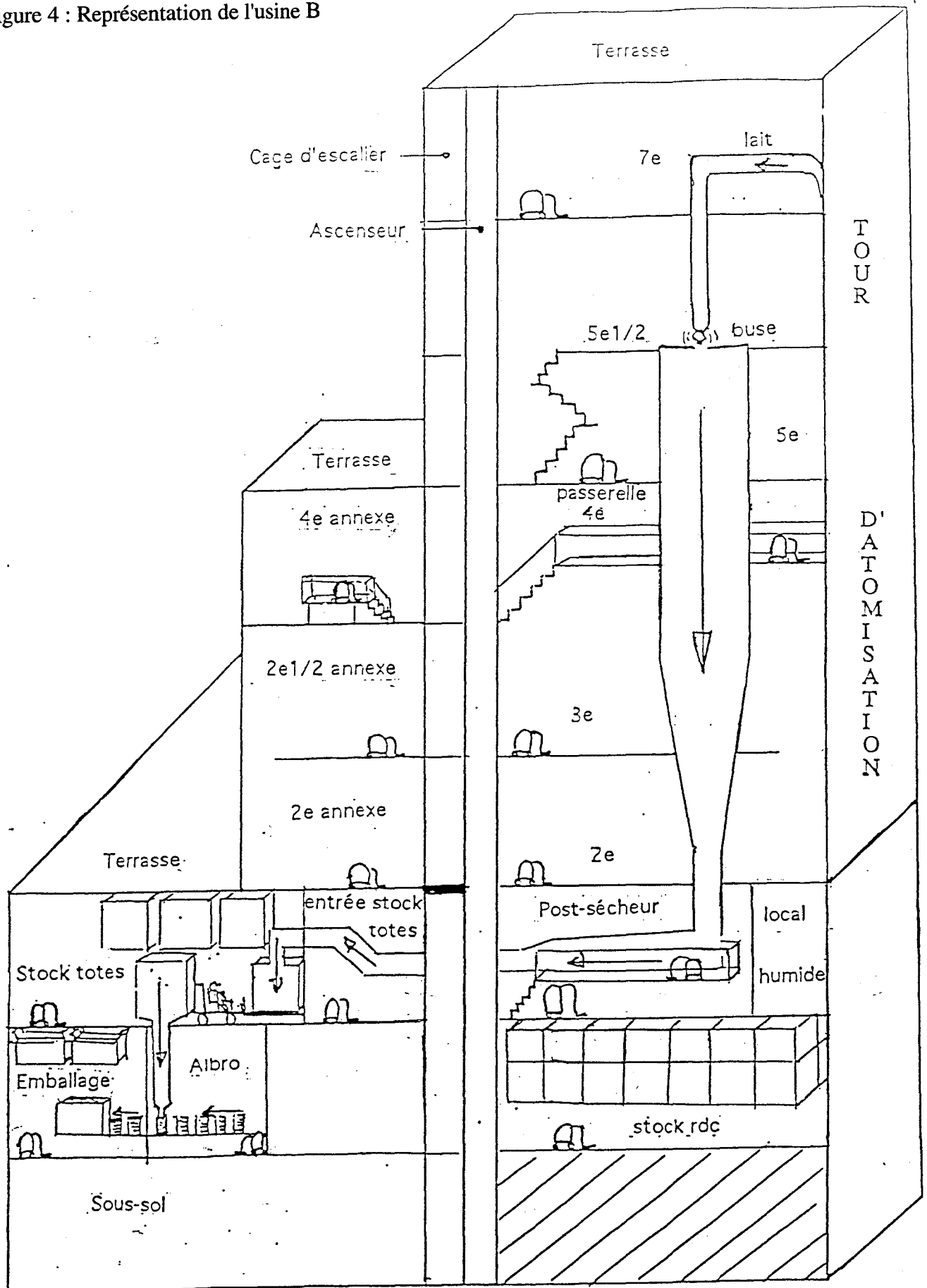


Figure 4 : Représentation de l'usine B



1.3 - PRATIQUES ACTUELLES EN CONTROLE DE L'HYGIENE

1.3.1 - Normes

Les aliments destinés aux nourrissons et enfants en bas âge sont soumis à des réglementations très strictes quant aux normes bactériologiques. La flore aérobie mésophile revivifiable à 30°C reste un excellent indicateur pour juger du bon fonctionnement des installations (Jouve, 1993). Pour la poudre de lait la norme est $\leq 5.10^4$ G.A.M./g. Concernant les coliformes la norme est : absence dans 1 g pour le produit déshydraté/sortie tamis, et ≤ 10 /g pour le produit déshydraté conditionné (Codex, 1991). Dans l'armée américaine, les critères microbiologiques pour le lait et les produits laitiers sont $< 5.10^4$ G.A.M./g ou ml, et ≤ 10 coliformes/g ou ml (Powers, 1976). L'International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF, 1988) recommande les critères microbiologiques suivants pour les poudres de lait: $n = 5$, $c = 1$, $m = 10^4$, et $M = 10^6$ pour les G.A.M., où n est le nombre d'unités dans un échantillon, c est le nombre maximum acceptable d'unités de qualité marginale, m est le dénombrement bactérien qui sépare les produits de qualités bonne et marginale, et M est le dénombrement bactérien qui sépare les produits de qualités marginale et défectueuse. Les valeurs supérieures à M sont inacceptables. La commission recommande également les critères microbiologiques suivants: $n = 10$, $c = 1$, $m = 10$, et $M = 10^2$ pour *S. aureus*; et $n = 5$, $c = 2$, $m < 3$, et $M = 10$ pour *E. coli*. Cependant selon Hildebrandt *et al.* (1995), les plans à trois classes ne sont pas adaptés à des lots hétérogènes, une valeur extrême déterminant le rejet d'un lot complet.

1.3.2 - Contrôle du risque microbiologique

1.3.2.1 - Démarche "Hazard Analysis Critical Control Points"

Le HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points : Analyse des risques - Maîtrise des points critiques), créé dans les années 1970 aux U.S.A., est un outil de contrôle des risques (microbiologiques, chimiques ou autres) visant à développer des procédures préventives. Ce concept permet d'élaborer une approche structurée de la qualité microbiologique d'un produit alimentaire, par l'identification des dangers aux différents stades de production (microorganismes pathogènes ou responsables d'altération du produit), la définition des moyens nécessaires à leur maîtrise (plans d'échantillonnage) ainsi que le contrôle de leur mise en oeuvre effective et de leur efficacité (Codex, 1991). C'est actuellement la méthode recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé et le Codex Alimentarius pour aborder l'hygiène de fabrication (Rohmer, 1995). La liste des microorganismes présentant réellement un danger doit être précisément établie (Notermans *et al.*, 1994a), de même que l'établissement de critères microbiologiques selon les charges microbiennes rencontrées dans le produit cru et selon le type de process industriel (Notermans *et al.*, 1994b). L'utilisation d'organismes indicateurs d'hygiène peut jouer un rôle significatif dans l'application du H.A.C.C.P. pour assurer la qualité du produit et réduire le risque pour le consommateur (Brodsky,

1994). Un danger microbiologique est défini comme étant la présence et la croissance inacceptables de microorganismes pathogènes dans un aliment ou leur développement dans l'environnement ou le matériel de la chaîne de production (ILSI-Europe, 1993). Il est essentiel d'identifier et de contrôler les Points Critiques à Maîtriser, qui sont les étapes du procédé industriel où la perte de contrôle peut engendrer un risque inacceptable pour la santé du consommateur (Biss et Hathaway, 1995). Outre les risques pour le consommateur, les conséquences financières pour les compagnies agro-alimentaires impliquées dans des cas d'intoxication peuvent mener l'entreprise à la faillite (Goldie, 1988). L'établissement d'un plan H.A.C.C.P. procure un moyen d'assurer de manière continue la qualité du produit et la sécurité du consommateur, par l'application de mesures préventives par la surveillance des valeurs mesurées (par exemple les charges en G.A.M.) par rapport aux valeurs admissibles (Baker, 1995).

Selon l'ICMSF (1988), dans des unités de production de lait en poudre les Points Critiques à Maîtriser (P.C.M.) sont les étapes de réception du lait, de pasteurisation au cours de laquelle l'inactivation des bactéries végétatives doit être assurée, d'atomisation pendant laquelle la qualité microbiologique de l'air et du matériel doivent permettre d'éviter toute contamination de la poudre de lait, et d'emballage au cours duquel l'air au contact du produit doit être exempt de *Salmonella*, de *Staphylococcus aureus* et de coliformes. Cependant certains germes ne présentent un réel danger que lorsque leur charge est relativement élevée. L'identification bactérienne est souvent nécessaire pour préciser les P.C.M. (Kleiss *et al.*, 1994).

1.3.2.2 - Mesures d'hygiène

L'hygiène du matériel dépend de l'hygiène des locaux, souvent fonction de leur conception architecturale (Taibi, 1989). Il est conseillé de préférer les surfaces lisses, comptant peu ou pas d'angles vifs, et d'éviter les plans de travail en bois. La marche en avant des aliments sans croisement des matières et des aliments confectionnés doit être respectée. Balais, serpillères, poignées de portes et coffrets électriques doivent être proscrits, le principe étant d'éviter tout ce qui peut retenir poussières et particules et constituer des "nids" à microbes (Dauphin et Darbord, 1988). Zingesser *et al.* (1990) rapportent le cas d'une dispersion de *Legionella* par l'air conditionné. Chauffage, ventilation et air conditionné doivent être conçus pour être nettoyés régulièrement, et l'air provenant de l'extérieur doit être filtré (Food and Drug Administration and Milk Industry Foundation International Ice Cream Association, 1988). L'hygiène vestimentaire et l'hygiène personnelle sont impératives (Radmore *et al.*, 1988). L'homme peut contribuer de manière notable à la contamination des aliments par voie aérienne ou par contact lorsqu'il est porteur sain de germes pathogènes (*S. aureus*, *Salmonelles*) ou lorsqu'il présente furoncles ou panaris (Taibi, 1989). La définition des postes de travail doit permettre de réduire les déplacements du personnel à l'intérieur des salles propres (Radmore *et al.*, 1988). Le contrôle de l'environnement implique la maîtrise de la température, de l'humidité relative et du taux de renouvellement de l'air (Dauphin et Darbord, 1988). Dans son ouvrage, Jouve (1993) cite parmi les vecteurs de contamination la chevelure, la cavité oropharyngée (Staphylocoques pathogènes, Streptocoques hémolytiques) et les mains (microflore

résidente: Microcoques, Staphylocoques, Corynebactéries). Les insectes, et notamment les mouches, sont aussi des vecteurs de bactéries pathogènes entériques (Echeverria *et al.*, 1983). Fotedar *et al.* (1992) ont notamment mis en évidence le port de *Klebsiella* spp.

1.3.3 - Indicateurs d'hygiène

Selon le SYNAFAP (Anon, 1995), il convient de distinguer différents types de critères microbiologiques :

- les critères impératifs ou obligatoires, qui concernent la flore potentiellement pathogène (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ...), et dont le dépassement caractérise un produit devant être retiré de la consommation ainsi qu'une non-conformité du procédé de fabrication.
- les critères indicatifs, qui concernent la flore pathogène mais dont le dépassement est n'entraîne aucune action particulière vis-à-vis du produit, seul le procédé devant être analysé pour en identifier les causes de non-conformité.
- les critères analytiques ou indicateurs de maîtrise des procédés, qui concernent des germes non pathogènes (Entérobactéries, *E. coli* non pathogènes ...) mais dont la présence à certains niveaux de contamination est révélatrice de certaines défaillances de la maîtrise du procédé industriel.

1.3.3.1 - Entérobactéries

Selon Richard (1994), les *Enterobacteriaceae* sont définies par un ensemble de caractères: Bacilles à Gram négatif, mobiles grâce à une ciliature péritrice ou immobiles, non sporulés, présentant une réaction d'oxydase négative, fermentant le glucose avec ou sans production de gaz et réduisant les nitrates en nitrites. En 1988, la famille des *Enterobacteriaceae* compte 30 genres et 99 espèces dont une vingtaine doivent être connues et correctement identifiées par les bactériologistes médicaux en raison de leur importance (Richard, 1988). Les Entérobactéries sont largement distribuées dans le sol, l'eau, les végétaux (Blood et Curtis, 1995), et sont commensales du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. Ces espèces sont potentiellement pathogènes ou pathogènes opportunistes. L'utilisation d'organismes indicateurs tels que les Entérobactéries confère une marge de sécurité sur l'évaluation de la salubrité des aliments, car généralement seule une part mineure de la population des Entérobactéries présents dans les aliments sont de type pathogène. Ces germes peuvent être utilisés comme indicateurs du risque dans des produits alimentaires (Mossel, 1978). Toutes les Entérobactéries retrouvées dans des procédés utilisant la chaleur comme moyen de destruction des micro-organismes indiquent nécessairement une recontamination pouvant provenir d'une mauvaise séparation entre la zone humide et la zone sèche de production (Lück et Lategan, 1983).

1.3.3.2 - Coliformes

En 1892, Schardinger fut le premier à introduire le principe d'organisme indicateur, en suggérant l'utilisation de germes plus tard appelés coliformes fécaux pour la surveillance des eaux potables (Mossel, 1967). Les coliformes sont des membres de la famille des *Enterobacteriaceae* fermentant le lactose, morphologiquement et physiologiquement similaires à *E. coli*. Au contraire de ce dernier, ils se trouvent aussi en-dehors du tractus digestif de l'homme (Mossel, 1967). Classiquement, les coliformes sont répartis en deux groupes : Les psychrotrophes, d'origine aquatique ou tellurique, et les thermotolérants, d'origine animale ou humaine. Les espèces d'origine aquatique ou tellurique sont les suivantes (Leclerc *et al.*, 1981) : *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella ozaenae*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter intermedius*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, et les espèces appartenant au genre *Serratia*. Pour mesurer la qualité microbiologique de l'eau, les coliformes sont utilisés comme organisme indicateur de choix (Roszak et Colwell, 1987). La recherche de coliformes peut être utilisée comme un index de contamination post-pasteurisation (Food and Drug Administration and Milk Industry Foundation International Ice Cream Association, 1988). Cependant selon Lück et Lategan (1983), les coliformes totaux ne sont qu'un index sanitaire et non une mesure du risque pour la santé, leur présence n'étant pas toujours corrélée avec la présence de germes pathogènes comme *Listeria*.

1.3.3.3 - Coliformes fécaux

Les coliformes (présumés) fécaux appartiennent à la catégorie des coliformes thermotrophes, mais il serait osé de prétendre que cette catégorie comprend exclusivement des coliformes fécaux (Leclerc *et al.*, 1981). Les espèces appartenant à cette catégorie de germes sont les suivantes (Leclerc *et al.*, 1981) : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus*. Les tests "haute température", proposés pour la première fois par Eijkman en 1904, sont utilisés depuis des décennies pour rechercher les coliformes thermotolérants (Oger et Leclerc, 1977). Un nombre élevé de coliformes fécaux signale une qualité hygiénique insuffisante ou de mauvaises pratiques sanitaires, ou encore une contamination fécale récente avec présence éventuelle de microbes pathogènes dangereux (Brunet, 1988). La contamination des produits avec des coliformes fécaux intervient principalement pendant le process, cependant les coliformes thermotolérants ne subsistent pas longtemps dans les aliments (Brunet, 1988). Les coliformes fécaux peuvent faire partie de la flore naturelle d'un site industriel, perdant ainsi leur caractère d'indicateur d'hygiène. Selon Cox *et al.* (1988), dans presque tous les process alimentaires, *E. coli* et les coliformes fécaux perdent leur connotation fécale car on ne peut les mettre en relation avec des organismes pathogènes comme les *Salmonella* ou les *Yersinia*.

1.3.3.4 - *Escherichia coli*

Environ 90% du groupe des coliformes fécaux est constitué d'*Escherichia coli* (Lück et Lategan, 1983). Il peut être important de repérer facilement les *Escherichia coli* parmi les autres coliformes fécaux, que l'on croie ou non selon les circonstances à leur primauté comme témoin de contamination d'origine intestinale (Jacquet et Coiffier, 1978 ; Tebbutt et Southwell, 1989 ; Zeitoun *et al.*, 1994). Ce germe laisse supposer la présence possible de *Salmonella*, *Shigella* et d'autres germes pathogènes entériques (Blood et Curtis, 1995). C'est un indicateur idéal, possédant une spécificité fécale élevée, ne se multipliant pas dans l'eau et étant facile à détecter (Leclerc et Haslay, 1993). L'énumération d'*Escherichia coli* constitue le moyen le plus approprié de surveillance de l'hygiène de production dans les abattoirs de poulets (Zeitoun *et al.*, 1994).

1.4 - PRESENCE DES ENTEROBACTERIACEAE DANS LES PRODUITS ALIMENTAIRES

Selon Brunet (1988), le nombre total de germes que renferme un aliment représente un élément important d'appréciation de sa qualité sanitaire globale. En plus de leur flore intrinsèque, les aliments végétaux et animaux subissent une contamination additionnelle lors de leur manutention et de leur traitement. Beaucoup de ces contaminants, notamment dans la viande hachée, sont membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (Guthertz et Okoluk, 1978). Des incidents liés à la présence d'*Escherichia coli* O157:H7 ont impliqué des viandes de boeuf mal cuites, ou moins souvent la consommation de lait cru (Ryan *et al.*, 1986; Doyle, 1991). Un fort taux de *Klebsiella pneumoniae* sur des légumes frais provient de mauvaises façons culturales et est susceptible d'être la cause d'infections nosocomiales (Brown et Seidler, 1973). *Enterobacter agglomerans* ainsi que *Enterobacter cloacae* sont parmi les espèces d'Entérobactéries les plus fréquemment isolées de fruits et légumes (Roberts *et al.*, 1989).

La métrologie indique que généralement la qualité microbiologique des formulations infantiles à base de lait en poudre est excellente, à quelques exceptions près (Schwab *et al.*, 1982). Des Entérobactéries peuvent néanmoins y être trouvées, telles *Enterobacter sakazakii* (Noriega *et al.*, 1991), *Escherichia coli* (Kornacki et Marth, 1982), *Citrobacter freundii* (Thurm et Gericke, 1994) ou *Enterobacter cloacae* (Casewell *et al.*, 1981 ; Bologna *et al.*, 1984), germes potentiellement pathogènes responsables d'infections de nourrissons notamment par des produits diététiques infantiles. En 1988, Muytjens *et al.* analysèrent 141 échantillons de poudre de lait provenant de 35 pays et trouvèrent que 52.5% d'entre eux contenaient des membres de la famille des *Enterobacteriaceae* à une concentration n'excédant pas 1 ufc/g, notamment *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter sakazakii*. Le réservoir naturel d'*Enterobacter sakazakii* demeure inconnu, mais des poudres de lait ont été plusieurs fois mises en cause lors d'infections de nouveau-nés (Biering *et al.*, 1989 ; Muytjens et Kollée, 1990 ; Noriega *et al.*, 1991). En 1989, Simmons *et al.* ont observé lors d'un cas d'infection nosocomiale à *Enterobacter sakazakii* des concentrations de

8 ufc/100g en *Enterobacter sakazakii* et de 48 ufc/100g en *Enterobacter cloacae* dans la poudre de lait utilisée. Il est clair qu'une contamination prend place après le dernier traitement à la chaleur (pasteurisation). Ayant subi une atomisation et une déshydratation, la poudre de lait telle quelle est un produit stabilisé. Ce n'est que lors de la reconstitution que les microorganismes pourront représenter, lorsqu'ils auront pu se multiplier en nombre élevé, un danger pour les consommateurs particulièrement sensibles que sont les jeunes enfants. Il est fondamental que le producteur de lait en poudre ait une bonne connaissance des conditions d'utilisation par le consommateur (Woodhall, 1989). Selon Simmons *et al.* (1989), la présence de l'espèce *Enterobacter sakazakii* dans des poudres de lait représente un risque plus élevé que celle d'*Enterobacter cloacae* pour la santé des nouveaux-nés. En effet, la revivification d'*Enterobacter sakazakii* par ajout de bouillon dans de la poudre de lait contaminée est excellente alors que la croissance d'*Enterobacter cloacae* est très faible. Noriega *et al.* (1991) recommandent l'usage de formulations liquides. Ce mode de formulation n'a en effet pas été impliqué dans des cas d'infection à *Enterobacter sakazakii*, alors qu'après pasteurisation la poudre de lait peut être recontaminée lors de l'emballage par de faibles quantités de germes potentiellement pathogènes comme *Enterobacter sakazakii* (Muytjens et Kollée, 1990). Cependant cette présentation se heurte à des problèmes de disponibilité, de prix et de stockage.

Les laits et les produits laitiers peuvent être contaminés ou recontaminés avec des sérotypes pathogènes d'*E. coli* pour l'homme pendant la production de lait et le process industriel, de hauts niveaux de contamination étant observés quand les standards hygiéniques sont faibles (Otenhajmer *et al.*, 1989). L'utilisation d'ingrédients contaminés, de méthodes de production et de pratiques manquant d'hygiène peuvent contribuer à un fort taux de coliformes dans le produit. Une attention particulière est portée à *E. coli* dans le lait et les produits laitiers, car c'est un témoin de contamination majeur qui peut indiquer la présence de *Salmonella*, de *Shigella* et d'autres germes entériques pathogènes. Les crèmes glacées peuvent contenir cette espèce (Tamminga *et al.*, 1980 ; Mahasneh et Haswah, 1981 ; Khan *et al.*, 1985). Les sources d'*E. coli* pathogènes peuvent être les hommes et les animaux, la peau des mamelles de vaches constituant un réservoir (Otenhajmer *et al.*, 1989). La présence de bactéries coliformes dans les aliments pasteurisés est généralement considérée comme témoin d'une contamination due à un traitement thermique insuffisant ou à une recontamination post-process (Garzaroli *et al.*, 1994). L'alimentation infantile peut être la cause d'infections à *Enterobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (ESAP) (Casewell *et al.*, 1981). Aux U.S.A. les principaux germes causes d'infections tous produits laitiers confondus sont *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylocoque*, *Brucella* et *Yersinia* (Bryan, 1983). La combinaison de plusieurs méthodes biochimiques (analyse de plasmides, ribotypage...) a permis d'affirmer que les préparations déshydratées pour enfants, lorsqu'elles sont intrinséquement contaminées, sont la source d'infections néonatales (Clark *et al.*, 1990).

1.5 - PRESENCE DES *ENTEROBACTERIACEAE* DANS LES ENVIRONNEMENTS INDUSTRIELS

Les fécès représentent un réservoir majeur d'*E. coli* et de coliformes fécaux. Cependant sous certaines conditions ces organismes peuvent croître dans des niches écologiques hors des intestins. Quand la qualité microbiologique d'un procédé alimentaire est établie, la présence d'Entérobactéries indique une déficience du procédé ou une contamination postérieure au procédé (Mossel, 1982). Les coliformes sont un bon indicateur de contamination post-procédé dans le cas des aliments pasteurisés (Garzaroli *et al.*, 1994). Il est clair que si *E. coli* et les coliformes fécaux font partie de la flore naturelle de l'environnement d'une usine alimentaire, la présence de ces micro-organismes dans les aliments perd complètement sa signification fécale. L'application de mesures d'hygiène adéquates permet de réduire la présence d'*Escherichia coli* dans l'environnement (Taylor *et al.*, 1982). Certaines *Enterobacteriaceae* montrent une résistance particulière aux conditions rencontrées dans les zones sèches alors que d'autres disparaissent (Roszak et Colwell, 1987). Les *Enterobacteriaceae* peuvent former des communautés stables sur les surfaces, difficiles à éliminer dans les environnements d'usines alimentaires. Toutes les mesures prises pour réduire le nombre d'*Enterobacteriaceae* dans l'environnement d'une ligne de production contribuent à assurer la sécurité des produits déshydratés (Cox *et al.*, 1988). La séparation physique des zones sèches (critiques) et humides ainsi qu'un contrôle sévère des accès du personnel aux zones critiques sont à l'origine de nettes améliorations de la qualité microbiologique des produits (ICMSF, 1988). Le remplacement régulier des filtres dans les systèmes de climatisation est indispensable, sous peine de les voir se transformer en dangereux réservoirs de germes (Lamoureux, 1994). Une étude menée par Gabis *et al.* (1989) sur 410 échantillons prélevés dans l'environnement de 18 unités de production de lait en poudre a montré l'absence de *Yersinia* et un pourcentage de 1% d'échantillons positifs en *Salmonella* et en *Listeria*, provenant de caniveaux en zone humide. La présence de *Salmonella* constitue un risque majeur : Elles peuvent coloniser les installations de production et en particulier les installations de séchage et leur environnement (Jouve, 1993). A partir de l'étude de 30 sites de fabrication de produits laitiers, Pritchard *et al.* ont observé en 1995 le caractère psychrotrophe de *Yersinia*.

Sur les surfaces, les bactéries se présentent sous forme de biofilm (Costerton *et al.*, 1987). En adhérant au caoutchouc ou au téflon, les bactéries forment des colonies dynamiques difficiles à détruire (Brouillaud-Delattre *et al.*, 1994 ; Cerf et Carpentier, 1992). Selon Herson *et al.* (1987), *Enterobacter cloacae* est résistant à la chloration quand il est fixé à une surface. L'adhésion des microbes est accrue durant la phase exponentielle de croissance (Van Loosdrecht *et al.*, 1990). Une fois attachées à ces surfaces, les bactéries se développent rapidement jusqu'à atteindre 10^4 à 10^5 ufc par mm^2 , et se protègent en exsudant des polysaccharides qui constituent le biofilm (Brouillaud-Delattre et Cerf, 1993). Walter *et al.* (1990) ont montré que l'humidité relative et la température affectent la viabilité des organismes et que le taux de survie dépend du type d'organisme. Les

températures et les humidités relatives comparables à celles trouvées dans les stalles d'animaux de ferme prolongent la viabilité des micro-organismes aéroportés (Thorn *et al.*, 1992).

1.6 - PATHOGENICITE DES PRINCIPAUX BGN IDENTIFIES AU COURS DE CETTE ETUDE

1.6.1 - Incidence en milieu hospitalier

En milieu hospitalier, les bactéries responsables d'infections nosocomiales sont dans 90% des cas des bactéries à Gram négatif (Muller-Serieys *et al.*, 1989), et 60% des bactéries isolées sont des Entérobactéries (Richard, 1994). Selon Le Pennec *et al.* (1990), les proportions de souches isolées dans les hôpitaux de la région parisienne sont de 87% en Entérobactéries, 10% en pyocyaniques et 2.5% en *Acinetobacter*. Selon Billiau *et al.* (1989), avec l'utilisation croissante des antibiotiques on note une recrudescence des septicémies dûes aux bacilles à Gram négatif (BGN) dits hospitaliers, les *Enterobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (ESAP). La mortalité est de 28%, elle ne varie pas selon le sexe mais selon l'âge avec un taux de décès de 46% chez les sujets âgés de plus de 75 ans. Cette mortalité est seulement de 9% pour les autres BGN (*Acinetobacter*, *Xanthomonas*). Plusieurs cas de résistance ont été observés suite à l'utilisation d'antibiotiques à large spectre d'action (Then *et al.*, 1988 ; Tullus *et al.*, 1988 ; Lambert-Zechovsky *et al.*, 1992 ; Mani *et al.*, 1992 ; De Champs *et al.*, 1993 ; Pörmull *et al.*, 1993). Cependant, selon Lamoureux (1994), les médecins sont placés devant un dilemme dramatique: Soit ne rien prescrire et faire courir au malade un risque mortel pendant l'opération ; soit prescrire des antibiotiques à large spectre d'action, sachant que si ensuite il y a infection ce sera par des bactéries multirésistantes difficiles à détruire. Les espèces appartenant au genre *Enterobacter* sont parmi les bactéries à Gram négatif les plus enclines à produire des β -lactamases capables d'inactiver des pénicillines et céphalosporines à large spectre d'activité (Bodey *et al.*, 1991).

Un âge inférieur à 18 mois constitue un facteur associé à la mortalité due à *Enterobacter*, le tractus biliaire représentant la principale voie d'infection (Gallagher, 1990). La plupart des infections surviennent chez des patients ayant fait un passage en unité de soins intensifs, et les diabétiques sont des patients à risque (Mani *et al.*, 1992). *Escherichia coli*, *Klebsiella* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les causes les plus fréquentes d'infections bactériennes dans les hôpitaux (Bodey *et al.*, 1991). Cependant le genre *Enterobacter* représente une part importante des infections nosocomiales à Gram négatif, et est la quatrième cause d'infection chez les enfants (Lambert-Zechovsky *et al.*, 1992). La plupart des infections dues à des espèces appartenant au genre *Enterobacter* sont acquises dans les hôpitaux (Brenner, 1981), et arrivent par la flore propre des patients, en particulier la flore intestinale (Flynn *et al.*, 1987).

1.6.2 - *Enterobacteriaceae*

1.6.2.1 - *Enterobacter sakazakii*

Enterobacter sakazakii est un germe découvert récemment et encore insuffisamment connu (Farmer *et al.*, 1980). Le nom de cette espèce, anciennement appelée "*Enterobacter cloacae* pigmenté en jaune" a été proposé en l'honneur du bactériologiste Riichi Sakazakii, et utilisé pour la première fois en Mai 1977 au meeting annuel de l'American Society for Microbiology. L'homogénéité génomique de cette espèce a été confirmée par Izard *et al.* en 1983 (hybridation intra-spécifique : 89% +/- 10%).

Sur le plan biochimique, ce germe peut être caractérisé par ses décarboxylases (lysine négative, arginine positive, ornithine positive) (Farmer *et al.*, 1980), et par la production d' α -glucosidase (Muytjens *et al.*, 1984). La distinction phénotypique avec *Enterobacter cloacae* est principalement basée sur la production d'un pigment jaune après incubation 24 h à 25°C (Farmer *et al.*, 1985), insoluble dans l'eau, l'alcool, le chloroforme et l'éther (Urmenyi et Franklin, 1961), sur l'absence de fermentation du D-sorbitol (Goullet et Picard, 1986), sur la présence de sédiment après 24 h d'incubation en bouillon trypticase-soja, et sur l'estérase (Tween 80) positive (Postupa et Aldova, 1984).

En 1961 Urmenyi et Franklin, ont rapporté deux cas de méningites mortelles causées par une souche inhabituelle pigmentée en jaune, probablement transmise dans le tractus respiratoire par les aérosols se trouvant dans un incubateur, les plus grands dommages étant causés au cerveau. L'infection chez l'adulte est rare, elle intervient chez des personnes immunodéprimées (Hawkins *et al.*, 1991). Ce germe est responsable de méningites chez les enfants de moins d'un mois (Willis et Robinson, 1988 ; Beiring *et al.*, 1989). Les cas de méningites dûes à *Enterobacter sakazakii* sont associés dans 75% des cas à des naissances de moins de 2.5 kg et dans 88% des cas à l'utilisation d'un incubateur (Muytjens *et al.*, 1983). L'infection entraîne une nécrose méningoencéphalique avec formation d'un abcès, compartimentalisation des ventricules et dilatation ventriculaire massive (Kleinman *et al.*, 1981). Une infection à *Enterobacter sakazakii* sans méningite est inhabituelle. Les principales sources d'isolement sont le liquide cérébro-spinal et le sang (Muytjens *et al.*, 1983). Le taux de mortalité est d'environ 50% (Gallagher, 1990). La fréquence de ces complications ainsi que le taux de mortalité égalent ceux causés par *Citrobacter diversus*, pour lequel 77% des cas documentés d'infection se sont accompagnés d'un abcès (Graham *et al.*, 1981).

La source et le mode de dissémination d'*Enterobacter sakazakii* dans les nurseries reste inconnu, n'ayant pas été trouvé sur les mains du personnel ou dans l'environnement (Arseni *et al.*, 1987). Cependant la contamination exogène semble plus plausible que l'hypothèse d'une contamination vaginale pendant la naissance, des cas d'infections ayant été rapportés après césarienne, et un délai de 6 jours étant nécessaire entre la naissance et l'apparition de symptômes

(Monroe et Tift, 1979). Des cas de contamination de la formulation par un mélangeur utilisé pour réhydrater la poudre de lait ont été observés (Noriega *et al.*, 1991 ; Muytjens et Kollée, 1990).

1.6.2.2 - *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae est un hôte saprophyte de la flore intestinale. Récemment ce germe a émergé comme pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales (Gaston, 1988 ; Falkiner, 1992). L'espèce *Enterobacter cloacae* a été décrite comme étant l'espèce d'*Enterobacter* la plus rencontrée dans les infections de cancéreux, les espèces *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* et *Enterobacter sakazakii* étant beaucoup moins impliquées dans ce genre d'infections (Bodey *et al.*, 1991).

Au cours d'un incident néonatal survenu en 1994 dans une unité de soins intensifs, Grattard *et al.* ont démontré l'efficacité de la AP PCR (Arbitrarily Primed Poly Chain Reaction) et de la ribotypie pour discriminer des souches d'*Enterobacter cloacae* dans le cadre d'études épidémiologiques, le profil génomique trouvé sur des souches isolées du tractus respiratoire de patients pendant l'incident nosocomial n'étant le même que ceux trouvés sur des souches isolées avant et après cet incident. Haertl et Bandlow (1993) sont arrivés aux mêmes résultats en utilisant les techniques SF-REA (Small-Fragment Restriction Endonuclease Analysis) et PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Weischer *et al.* (1993) ont montré que la combinaison biotypie, type de phage et O-sérotypie est suffisamment discriminante pour étudier l'épidémiologie de souches d'*Enterobacter cloacae*, observation confirmée lors d'une autre étude menée par Weisher et Kolmos (1993).

1.6.2.3 - *Escherichia coli*

Les méningites à bacilles entériques touchent principalement les nouveaux-nés, chez qui la mortalité atteint 80%. La cause la plus fréquente de ce type de méningite est *E. coli*, qui représente 70% des cas rapportés par le National Cooperative Study Group (McCracken et Mize, 1976). La prématurité, un faible poids à la naissance, une rupture prématurée de la membrane amniotique et un asphyxie sont associés au développement de méningites dues à *E. coli*. Les cancers évolutifs sont plus fréquents chez les patients colonisés par des Entérobactéries produisant des β -lactamases (De Champs *et al.*, 1989 ; Bodey *et al.*, 1991). Des incidents impliquant le sérotype entérohémorragique O157:H7 d'*Escherichia coli* ont été rapportés (Taylor *et al.*, 1982 ; Wells *et al.*, 1983), les symptômes observés étant des crampes abdominales et des diarrhées sanglantes (Riley *et al.*, 1983).

1.6.2.4 - *Klebsiella*

Klebsiella pneumoniae est fréquemment associée à des infections humaines respiratoires et du tractus sexuel. C'est une bactérie saprophyte de l'environnement, pouvant être isolée de la surface de végétaux bien que l'organisme prédominant dans ces sites soit *Enterobacter* (Brown et Seidler, 1973 ; Rao et Rao, 1983), mais étant également retrouvée dans les selles d'hommes et d'animaux (Montgomerie *et al.*, 1970 ; Knittel, 1975) en proportions plus faibles qu'*Escherichia coli* (Orskov, 1984). Le genre *Klebsiella* est particulièrement important chez les enfants âgés d'une ou deux semaines, alors qu'au-delà l'espèce *Escherichia coli* devient prédominante dans la flore intestinale (Tullus *et al.*, 1988). Chez la vache ce germe est responsable de mammites (Knittel, 1975). La présence de *Klebsiella* sur les végétaux provient de sa capacité à métaboliser l'inositol et le pinitol, très répandus chez les végétaux, et d'utiliser l'acide phytique, un composant des graines, comme seule source de carbone et de phosphate (Talbot *et al.*, 1977).

La signification clinique de *Klebsiella pneumoniae* était classiquement limitée aux pneumonies, mais récemment ce germe a été impliqué dans d'autres infections incluant des diarrhées infantiles et des suppurations (plaies, abcès) (Seidler, 1981). La présence de *Klebsiella* représente une détérioration de la qualité microbiologique de l'environnement et doit être considérée comme représentant un danger pour la santé publique (Seidler *et al.*, 1975).

1.6.2.5 - *Serratia*

Serratia marcescens est la souche de *Serratia* la plus isolée dans les hôpitaux (Theccanat *et al.*, 1991). C'est un germe saprophyte des sols, de l'eau et des déchets, mais qui peut se comporter comme un agent infectieux opportuniste reconnu comme étant la cause d'épidémies nosocomiales (Saito *et al.*, 1989). Ce germe, responsable d'infections du tractus urinaire, de méningites ou de pneumonies, est retrouvé typiquement chez les patients immunodéprimés (McCormack et Kunin, 1966), particulièrement chez des patients atteints de leucémie (Saito *et al.*, 1989). Son réservoir est généralement trouvé dans les tractus urinaires et respiratoires (Lewis *et al.*, 1989), mais ce germe a été également isolé de la lymphe (Scully *et al.*, 1993), de l'oreille moyenne et sur les mains de nurses (Theccanat *et al.*, 1991). Dans les nurseries le plus important réservoir est constitué par les enfants infectés et colonisés au niveau du tractus gastro-intestinal ou du cordon ombilical, et les infections croisées entre enfants surviennent fréquemment. Cependant les nouveaux-nés sont assez peu sujets à ces infections (Stamm *et al.*, 1976).

Beaucoup de patients infectés ne présentent pas de symptômes, représentant une source persistante d'infection pour les autres patients. Sans élimination des réservoirs constitués par des patients infectés ou colonisés, le cercle vicieux de l'accroissement des résistances continue jusqu'à émergence d'un mutant résistant à tous les antibiotiques, en raison d'une utilisation massive d'antibiotiques à large spectre d'action (Farmer *et al.*, 1976). Des infections nosocomiales chez des

adultes causées par des équipements de thérapie par inhalation attestent la capacité de ce germe à persister dans des réservoirs environnementaux. *Serratia marcescens* peut survivre au contact de désinfectants (Lewis *et al.*, 1989).

1.6.2.6 - *Citrobacter*

Le genre *Citrobacter* est proche du groupe *Salmonella*-Arizona des *Enterobacteriaceae* (Williams *et al.*, 1984) et a été décrit comme étant un hôte normal du tractus intestinal des hommes et des animaux (Wilson et Miles, 1964), impliqué dans un nombre croissant d'infections. Les méningites à *Citrobacter diversus* sont inhabituelles mais dévastatrices, ce germe n'infectant que de jeunes enfants. Les plus forts taux d'infection à *Citrobacter* sont trouvés chez les patients atteints de leucémie aiguë (Samonis *et al.*, 1991). Chez les jeunes enfants l'infection à *Citrobacter* s'accompagne de graves nécroses méningoencéphaliques avec une forte fréquence d'abcès du cerveau pouvant atteindre 75% (Gwynn et George, 1973 ; Graham *et al.*, 1981 ; Kline *et al.*, 1988a ; Morgan *et al.*, 1992) et a aussi été associé à des cas sporadiques de gastro-entérites (Vogel *et al.*, 1978). La raison de l'effet destructeur du système nerveux central par *Citrobacter diversus* est inconnue, mais la forte fréquence d'abcès du cerveau et de mortalité implique la nécessité d'un diagnostic rapide (Graham et Band, 1981). Ce germe ne se développe que dans les zones périventriculaires du cerveau (Soriano *et al.*, 1991). Un taux de mortalité de 34% a été rapporté par Kline en 1988, et moins de 10% des survivants ne gardent pas de séquelles. Des incidents en nurserie ont été rapportés durant lesquels plusieurs enfants étaient colonisés de manière asymptomatique (Kline *et al.*, 1989).

Kline *et al.* (1988b) ont mis en évidence la prépondérance d'une OMP (Outer Membrane Protein) de poids moléculaire 32.000 sur les souches de *Citrobacter diversus* provenant du fluide cébrospinal, pouvant servir de marqueur des souches susceptibles de causer des méningites ou des abcès du cerveau chez les nouveaux-nés. Une étude épidémiologique a permis d'incriminer des formulations infantiles au cours d'une épidémie à *Citrobacter freundii* (Thurm et Gericke, 1994). Des mains de nurses ont également été impliquées dans des incidents nosocomiaux, ce germe persistant sur les mains malgré un lavage vigoureux avec un antiseptique (Williams *et al.*, 1984). La déclaration de l'infection pendant les premiers jours de la vie laisse présager une acquisition in-utero ou périnatale de l'organisme (Kline *et al.*, 1989). Cependant l'épidémiologie des méningites néonatales à *Citrobacter diversus* reste incertaine, essentiellement en raison de l'absence d'un système de typage satisfaisant.

1.6.3 - Autres BGN

Le genre *Acinetobacter* est le seul représentant de la famille des *Neisseriaceae* présentant une réaction oxydase négative (Tjernberg et Ursing, 1989). C'est un organisme ubiquitaire dans le sol et l'eau, saprophyte de la peau et des muqueuses chez l'homme (Juni, 1978). Ce genre peut représenter plus de 50% des organismes présents dans des échantillons de sol et d'eau, et colonise la peau d'environ 25% des adultes en bonne santé (Gradon *et al.*, 1992). Ce genre est apparemment le seul parmi les bactéries à Gram négatif à pouvoir résider sur la peau (Seifert *et al.*, 1993). L'incidence de bactéries opportunistes multirésistantes telles que *Acinetobacter* dans les infections urinaires hospitalières et les surinfections chirurgicales est en progression (Dijkshoorn *et al.*, 1990 ; Joly-Guillou *et al.*, 1990 ; Le Pennec *et al.*, 1990 ; Picard et Goullet, 1990), notamment avec l'utilisation d'antibiotiques à large spectre d'action (Muller-Serieys *et al.*, 1989 ; Anstey, 1992). Ce germe, généralement non pathogène, est fréquemment isolé de patients immunodéprimés ou souffrant d'infections polymicrobiennes (Westh *et al.*, 1990 ; Ohsugi *et al.*, 1993). La pneumonie est l'affection la plus fréquente (Barnes *et al.*, 1988). La majorité des isollements cliniques sont représentés par *A. baumannii* (Freney *et al.*, 1989 ; Seifert *et al.*, 1993), précédemment connu comme *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* (Bouvet et Grimont, 1986 ; Dijkshoorn et Van Der Toorn, 1992). Des épidémies ont été rapportées (Anstey *et al.*, 1992 ; Gradon *et al.*, 1992). Les facteurs de risques majeurs de pneumonie à *Acinetobacter* sont l'alcoolisme, le tabagisme et l'obstruction chronique des voies respiratoires.

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène nosocomial important (Billiau *et al.*, 1989). Il peut se comporter comme pathogène opportuniste chez des personnes immunodéprimées (Francillon *et al.*, 1988 ; Kolmos *et al.*, 1994). Lors d'un incident nosocomial à *Pseudomonas aeruginosa* survenu en 1993 dans une unité de soin de grands brûlés, Blanc *et al.* ont utilisé avec succès la ribotypie comme outil de discrimination épidémiologique. Ils trouvèrent ainsi que les souches isolées chez les patients présentaient un ribotype différent de celui de souches provenant de l'environnement.

1.7 - TECHNIQUES DE PRELEVEMENT

1.7.1 - Prélèvements de surface

Les prélèvements de surface sont des outils indispensables pour évaluer l'hygiène des sols et des plans de travail et en effectuer le contrôle régulier. C'est également un bon moyen pour contrôler si les opérations de nettoyage et de désinfection ont bien été effectuées et ont été efficaces (Dauphin et Darbord, 1988). L'échantillonnage des surfaces est un problème complexe, et les résultats dépendent de plusieurs facteurs, incluant le type de surface, le mode et la fréquence de nettoyage, la source de contamination et la température (Tebbutt, 1991a). Selon les guides pratiques des CHR (Brunet, 1988), il est nécessaire de respecter deux règles lors du prélèvement : l'asepsie, et la stabilité du nombre de bactéries prélevées jusqu'au moment de l'analyse.

Si la bibliographie est riche en publications concernant les techniques d'écouvillonnage et de prélèvement à l'aide de boîtes de gélose contact (Tebbutt, 1988 ; Babb *et al.*, 1989 ; Williams *et al.*, 1990 ; Tebbutt, 1991b), il n'existe pas de données concernant les prélèvements réalisés avec des éponges stériles, ce type de prélèvement, souvent utilisé dans le domaine de l'alimentaire en particulier aux U.S.A., n'étant pas proposé par les distributeurs de matériel de laboratoire. Cependant l'éponge permet de couvrir une surface plus importante que l'écouvillon ou la boîte de gélose contact. Selon Williams *et al.* (1990), la boîte de gélose-contact constitue une alternative à la technique de l'écouvillonnage pour la quantification de *S. aureus*, de microcoques et de Staphylocoques à coagulase négative. Rosset *et al.* (1992) ont utilisé la technique du double-écouvillonnage, qui consiste à écouvillonner une même surface successivement avec un écouvillon humidifié dans de la tryptone-sel, puis avec un écouvillon sec, et ensuite à placer les deux écouvillons dans un même tube de diluant. Selon Tebbutt (1988), cette technique permet d'effectuer un prélèvement plus important des micro-organismes sur les surfaces. La méthode de l'écouvillonnage, qui consiste à racler à l'aide d'une tige surmontée d'un coton les germes présents sur une surface, est la plus appropriée pour détecter les bactéries se trouvant au fond d'irrégularités de surface, comme les plans de travail en bois. Les boîtes de gélose contact sont au moins aussi sensibles que les écouvillons humectés pour la détection des bactéries sur les surfaces (Tebbutt, 1988). Après écouvillonnage, les boîtes de gélose contact peuvent détecter *E. coli*, alors que l'observation inverse n'est pas vérifiée (Tebbutt, 1991b). Les écouvillons à base d'alginate contenant du calcium soluble sont plus performants que les écouvillons en coton. L'écouvillonnage permet de casser les colonies, alors que la boîte de gélose contact ne peut faire la distinction entre une unité microbienne et une colonie microbienne. Les boîtes de gélose contact sont efficaces sur des surfaces relativement propres et offrent la possibilité d'une réplique directe sur une gélose sélective (Tebbutt, 1991b).

1.7.2 - Prélèvements d'air

La contamination aérienne est importante dans les entreprises de fabrication de poudre de lait (Hedrick et Heldman, 1969). Cette contamination est plus élevée en l'absence de ventilation, et est directement liée au nombre de personnes présentes dans la pièce (Babb *et al.*, 1989). Cependant selon Hedrick et Heldman (1969), les principales sources de contamination aérienne sont, outre les mouvements d'air et de personnel, les systèmes de ventilation ne possédant pas de filtre ou insuffisamment entretenus. La plupart des contaminants de l'air sont associés à des particules relativement grosses ou "clumps", d'un diamètre supérieur à 5 µm (Greene *et al.*, 1962). La majorité des bactéries aériennes sont des cocci à Gram positif attachés à des squames de peau (Davies et Noble, 1962), des poussières ou des gouttelettes salivaires (Taibi, 1989), avec une moyenne de quatre bactéries viables par particule (Lidwell *et al.*, 1959). En règle générale, la flore de l'air n'est pas pathogène (microcoques, *Saccharomyces*).

Alvarez *et al.* (1995) ont montré que la technique d'amplification de séquences plasmidiques par la PCR (Poly Chain Reaction) utilisée dans la détection de microorganismes présents dans l'air

est rapide et sensible. Cependant l'essentiel des techniques actuelles de contrôle de la contamination de l'air sont constituées d'un appareillage permettant d'aspirer l'air et de l'envoyer sur un milieu gélosé. Le préleveur Sartorius fait appel à la technique GMF (Gelatin Membrane Filter), 0.75m³ d'air étant aspiré à la vitesse de 1.5ml³/h sur une membrane de gélatine. Après prélèvement cette membrane est placée dans 20 ml de liquide de Ringer et le dénombrement est effectué à partir de cette solution mère. L'impacteur à vitesse rapide de type Joubert aspire l'air à travers une série de tamis calibrés de plus en plus fins. L'impacteur à vitesse lente de type Casella présente une fente d'aspiration étroite derrière laquelle se trouve une boîte de Pétri d'un diamètre important, il doit être correctement orienté. Contrairement à l'impacteur Joubert, il sauvegarde les espèces microbiennes fragiles (Taylor et Leeming, 1993). L'efficacité du préleveur RCS Plus, turbine projetant l'air aspiré sur une bandelette de gélose, est bonne pour les environnements dont l'air présente une charge microbienne élevée (Humphreys, 1992). Par contre dans les laboratoires, le préleveur Casella montre une meilleure efficacité, pouvant aspirer jusqu'à 700 litres d'air par minute alors que le RCS Plus est limité à 50 litres par minute (Benbough *et al.*, 1993). Dans certains cas, un prélèvement d'air sans prélèvement concomitant de surface peut ne pas refléter adéquatement le niveau de contamination microbienne de l'environnement (Buttner et Stetzenbach, 1993).

**MATERIEL
ET
METHODES**

2 - MATERIEL ET METHODES

2.1 - STRUCTURE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS DES DIVERS ECHANTILLONNAGES

2.1.1 - 1er échantillonnage usine A (A1)

La première campagne de prélèvements avait pour objet une approche quantitative globale sur l'ensemble des zones de production par la recherche d'une flore diversifiée. Pour l'ensemble de cette étude 89 prélèvements de surface ont été réalisés à l'aide d'éponges stériles, 108 prélèvements de résidus divers avec des grattoirs et des pinceaux stériles, 32 prélèvements par écouvillonnage, 57 prélèvements par application d'une boîte de gélose contact, et 46 prélèvements d'air à l'aide de l'"Ochlovar".

2.1.2 - 2ème échantillonnage usine A (A2)

L'intérêt a été porté sur les Entérobactéries, les coliformes totaux et les coliformes thermotolérants. En tout 72 prélèvements de surface ont été réalisés à l'aide d'éponges stériles, 109 prélèvements de résidus divers avec des grattoirs et des pinceaux stériles ainsi que 19 écouvillonnages.

2.1.3 - Echantillonnage usine B (B)

Les recherches effectuées ont été les mêmes que lors de la deuxième campagne réalisée à l'usine A, mais cette fois les prélèvements ont été réalisés uniquement dans les locaux appartenant à la zone de production protégée. Dans l'ensemble des locaux de cette zone de production, 168 prélèvements de surfaces de sols ont été effectués à raison de 10 par local quand cela était possible ; et 75 prélèvements du contenu du sac de 15 aspirateurs, soit la totalité des aspirateurs de la zone de production, ont été étudiés, cinq prélèvements étant systématiquement effectués pour chaque aspirateur.

2.2 - TECHNIQUES DE PRELEVEMENT

2.2.1 - Eponges

Les prélèvements à l'éponge ont été effectués à l'aide d'éponges végétales Spontex tradition N°4, selon une méthode semblable à celle de Silliker et Gabis (1975) : L'éponge, de format 10 x 8 x 4 cm, est coupée en trois parties égales. Ces morceaux d'éponges sont nettoyés à l'eau courante pour les débarrasser d'éventuelles substances inhibitrices, puis rincées abondamment à l'eau déminéralisée et essorées manuellement. Après séchage 24 h à 48 h à l'étuve à 55°C, elles sont immergées dans de la tryptone sel et essorées manuellement. L'humidité résiduelle de l'éponge est

d'environ 15 ml de tryptone sel qui devront être pris en compte dans le seuil de dilution lors de l'analyse. Les éponges sont stérilisées 20 minutes à 120°C à l'autoclave dans des boîtes métalliques étanches, puis chaque éponge est introduite aseptiquement sous hotte à flux laminaire à l'aide d'une pince stérile dans un sachet plastique stérile thermosoudé. Pour s'assurer de la stérilité des éponges, il est nécessaire d'effectuer un témoin, en ajoutant environ 100 ml de bouillon cerveau-cœur dans un sachet contenant une éponge, puis en le thermosoudant. Après incubation 24 h à 30°C, un isolement est réalisé à partir de ce bouillon sur gélose P.C.A. incubée 24 h à 30°C. Ce test a été effectué sur plusieurs éponges.

La technique de prélèvement à l'éponge est de couper stérilement le sachet thermosoudé, puis de le retourner en doigt de gant autour de la main en maintenant fermement l'éponge et en prenant garde de ne toucher que la partie externe du sachet. Les prélèvements ont été effectués sur des surfaces de 50 x 50 cm en utilisant tous les côtés de l'éponge. Le prélèvement doit s'opérer en progressant vers l'avant de sorte que le préleveur ne puisse jamais contaminer une surface à prélever en se trouvant au-dessus. Ensuite le sachet est retourné en n'en manipulant que la partie externe, et fermé à l'aide d'une barrette plastique. Les éponges ont été amenées au laboratoire à 4°C et analysées dans les 24 h suivant le prélèvement.

Une étude comparative effectuée au cours de la campagne de prélèvements A2 a porté sur 19 prélèvements à l'éponge et à l'écouvillon, dans différents locaux et sur des surfaces très voisines pour chaque comparaison.

2.2.2 - Ecouvillon

Les prélèvements à l'écouvillon ont été effectués à l'aide de culturettes (Becton Dickinson Microbiology Systems 4360214). A l'intérieur de ces culturettes se trouve une ampoule contenant 0,5 ml du milieu de transport de Stuart modifié. Au moment de l'emploi, l'ampoule contenant ce milieu est craquée afin d'humidifier l'écouvillon. Le prélèvement s'effectue sur une surface de 5 x 5 cm. La culturette est ensuite replacée dans son étui. Après transport au laboratoire à 4°C, l'analyse est effectuée dans les 24 h suivant le prélèvement. L'extrémité de l'écouvillon est cassée dans un tube à essai contenant 2 ml de tryptone-sel. Après passage au vortex pendant 30 secondes, les ensemencements sont effectués à l'aide de l'ensemencement Spiral pour la solution mère et sa dilution au 1/10e sur gélose P.C.A. incubée 48 h à 30°C. Les seuils étudiés ont été < 40 ufc/prélèvement et < 400 ufc/prélèvement.

2.2.3 - Autres techniques

Une autre technique de contrôle de la flore microbienne des surfaces a été utilisée : La boîte de gélose contact. C'est une boîte de Pétri dont la gélose dépasse les bords en formant un ménisque. Une pression de 500 g environ est appliquée pendant 10 à 15 secondes sur la surface étudiée (Taibi, 1989). Respecter des pressions et des temps d'application constants permet d'assurer une reproductibilité de l'expérience.

Les prélèvements de sacs d'aspirateurs et de résidus divers ont été effectués aseptiquement à l'aide de cuillères, pinceaux, grattoirs et pots stériles. Les résidus secs ont été transportés à température ambiante, stockés à 4°C et traités dans la semaine suivant le prélèvement. Les résidus humides ont été amenées au laboratoire à 4°C et analysés dans les 24 h suivant le prélèvement.

L'appareil de type impacteur Ochlovar a été utilisé pour l'étude de la contamination de l'air. Cet appareil se présente sous la forme d'une tour dans laquelle l'air est aspiré à l'aide d'une turbine et projeté sur une boîte de Pétri. L'aspiration s'effectue à raison de 150 litres d'air par minute pendant un maximum de 7 minutes.

2.3 - DENOMBREMENTS

2.3.1 - Les milieux de culture

2.3.1.1 - Les milieux solides

Les milieux utilisés pour le dénombrement des différentes flores ont été les suivants :

- germes aérobies mésophiles : gélose standard pour dénombrement Plate Count Agar (P.C.A., Diagnostics Pasteur 54451) incubée 48 h à 30°C pour les ensemencements en surface, et 72 h à 30°C pour les ensemencements en profondeur.
- Entérobactéries : gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (V.R.B.G., Diagnostics Pasteur 64587) incubée 24 h à 37°C.
- repiquage des bouillons d'enrichissement pour Entérobactéries et de l'eau peptonée tamponnée : gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (B.C.P., Diagnostics Pasteur 54374) incubée 24 h à 37°C.
- coliformes : gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL). (V.R.B.L., Diagnostics Pasteur 54781) incubée 24 h à 30°C pour les coliformes totaux, ou 24 h à 44.5°C pour les coliformes thermotolérants.
- *Pseudomonas* : gélose à la Cétrimide Fucidine Céfaloridine (C.F.C., Oxoid 50341; supplément sélectif, Oxoid 50332) incubée 48 h à 30°C.
- lactobacilles : gélose de Man, Rogosa et Sharpe (M.R.S., Diagnostics Pasteur 64247) incubée 24 h à 48 h à 30°C.
- streptocoques fécaux (entérocoques) : gélose à la bile, esculine, azide (B.E.A., Diagnostics Pasteur 63994) incubée 24 h à 48 h à 37°C.

- staphylocoques totaux : gélose de Schleifer et Kraemer (1980)
(S.K., 1980) incubée 24 h 48 h à 37°C, et dont la composition est la suivante :

1.0 % tryptone ou peptone
0.5 % extrait de boeuf
0.3 % extrait de levure
1.0 % glycerol
1.0 % pyruvate de sodium
0.05 % glycine
2.25 % KSCN
0.06 % $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0.09 % $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0.2 % LiCl
1.3 % agar

Après dissolution dans de l'eau déminéralisée, le pH est ajusté à 7.2.

Le milieu est ensuite autoclavé 15 minutes à 121°C.

Ensuite à chaque litre de milieu sont ajoutés 10 ml d'une solution stérile d'azide de sodium à 0.45 %.

Le milieu est stocké à 4°C pour une durée n'excédant pas 10-14 jours.

- *Staphylococcus aureus* : gélose de Baird-Parker

(B.P., Diagnostics Pasteur 78611) incubée 24 h à 48 h à 37°C.

- *Listeria* : gélose Palcam

(Oxoid 56041) incubée 48 h à 37°C.

- repiquages : gélose à la trypto-caséine-soja

(T.S.A., Diagnostics Pasteur 63884) incubée 48 h à 30°C

- conservation de souches bactériennes : tubes de Félix

(Diagnostics Pasteur 63683) incubés 24 h à 30°C.

2.3.1.2 - Les milieux liquides

-diluant Tryptone-sel

(Diagnostics Pasteur 55750 en tubes de 9 ml, 55751 en flacon de 100 ml).

-bouillon d'enrichissement Entérobactéries

(Diagnostics Pasteur 69257) incubé 24 h à 37°C, puis repiqué sur gélose au B.C.P.

-eau peptonée tamponnée pour la recherche des Entérobactéries
(Oxoid CM 9) incubée 24 h à 37°C, puis repiquée sur gélose au B.C.P.

-bouillon lactosé bilié au vert brillant (B.L.B.V.B.) pour le test de Mackenzie
(Diagnostics Pasteur 78025) incubé 24 h à 44.5°C.

-eau peptonée exempte d'indole pour le test de Mackenzie
(Diagnostics Pasteur 54175) incubée 24 h à 44.5°C.

-bouillon d'enrichissement pour la flore lactique
(Diagnostics Pasteur 64237) incubé 48 h à 30°C et repiqué sur gélose M.R.S.

-bouillon d'enrichissement de Rothe pour entérocoques
(Diagnostics Pasteur 78725 simple concentration, 78715 double concentration) incubé 48 h à 37°C et repiqué sur gélose B.E.A.

-bouillon d'enrichissement pour staphylocoques totaux
(Schleifer et Kraemer, 1980) incubé 48 h à 37°C et repiqué sur gélose S.K.

-bouillon d'enrichissement de Chapman pour *Staphylococcus aureus*
(Diagnostics Pasteur 78625 double concentration, dilution au 1/2 pour obtenir un bouillon simple concentration) incubé 48 h à 37°C et repiqué sur gélose B.P.

-bouillon d'enrichissement pour *Listeria*
(Oxoid 52321; supplément sélectif, Oxoid 52342) incubé 48 h à 37°C et repiqué sur gélose Palcam.

-bouillon cerveau-cœur pour le test de stérilité des éponges
(Diagnostics Pasteur 64017) incubé 24 h à 30°C et repiqué sur gélose P.C.A.

2.3.2 - Techniques de dénombrement

2.3.2.1 - Préparation de l'échantillon

En ce qui concerne les prélèvements de surfaces effectués à l'aide d'éponges, la démarche a été la suivante : 65 ml de tryptone-sel sont ajoutés aseptiquement dans le sac stomacher contenant l'éponge, soit un volume total de 80 ml en tenant compte des 15 ml intrinsèques à l'éponge. Le sachet est ensuite fermé à l'aide d'une barette plastique et broyé pendant une minute.

Chaque écouvillon est cassé de manière aseptique dans un tube contenant 12 ml de tryptone-sel, ou 2 ml pour l'étude comparative réalisée pour A2. Chaque tube est alors passé au vortex pendant 15 secondes.

Pour les résidus, un taux de dilution variant de 1/1 à 1/200 a été appliqué pour A1, la nature des résidus étant très variée. Pour A2 et B, un taux unique de 1/10 a été retenu.

2.3.2.2 - Ensemencement des milieux de culture

La solution mère a été laissée 40 minutes à la température du laboratoire avant ensemencement pour permettre aux germes de recouvrer leur potentiel de croissance. Plusieurs techniques d'ensemencement ont été utilisées :

- ensemencements en profondeur, avec application d'une double couche pour les Entérobactéries et les coliformes.

- ensemencements à l'ensemenceur Spiral selon la norme NF V 08-100 (Recueil de Normes Françaises, 1993), avec application d'une double couche pour les Entérobactéries et les coliformes. Le principe de l'ensemenceur Spiral repose sur une micropompe doseuse qui dépose un volume décroissant d'un échantillon liquide suivant une spirale d'Archimède à la surface de la gélose d'une boîte de Pétri en rotation (De Rautlin De La Roy *et al.*, 1983). Statistiquement aucune différence n'est observée entre les dénombrements obtenus par cette technique et les étalements de différentes dilutions à la surface d'un milieu nutritif (Catteau *et al.*, 1981).

- ensemencement de bouillons d'enrichissement à la pipette.

- repiquages de bouillons d'enrichissement en surface à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

Les volumes de diluant et les différents seuils de dilution considérés par recherche et pour chaque type de prélèvement sont présentés dans les tableaux 1 et 2. La difficulté a consisté à appliquer des seuils de dilution permettant d'effectuer avec un même protocole des dénombrements d'échantillons faiblement contaminés (enrichissement, profondeur) et d'échantillons fortement contaminés (dilution au 1/10e, Spiral).

Tableau 1 : Technique de préparation des échantillons et d'ensemencement - Seuils de détection (A1).

MILIEUX	TECHNIQUE	EPONGE + 80 ml T.S. (D = 1/80)		ECOUVILLON + 12 ml T.S. (D = 1/12)		RESIDUS + Volume variable de diluant (D= 1/1 à 1/200)	
		Seuils en ufc/Pt 8 ml/90 ml		Seuils en ufc/Pt		Seuils en ufc/g	
V.R.B.G.	B.E.	< 10					
	P	1 ml	< 80	1 ml	< 12	1 ml	< 200 à < 1
	S	0.1 ml	< 800	0.1 ml	< 120	0.1 ml 0.05 ml	< 2000 à < 10 < 4000 à < 20
P.C.A.	P	1 ml	< 80	1 ml	< 12	1 ml	< 200 à < 1
	S	0.1 ml	< 800	0.1 ml	< 120	0.1 ml 0.05 ml	< 2000 à < 10 < 4000 à < 20
C.F.C.	P	1 ml	< 80	1 ml	< 12	1 ml	< 200 à < 1
	S	0.1 ml	< 800	0.1 ml	< 120	0.1 ml 0.05 ml	< 2000 à < 10 < 4000 à < 20
CHAPMAN	B.E.	8 ml/12 ml D	< 10	1 ml/9 ml	< 12	1 ml/9 ml	< 200 à < 1
BAIRD PARKER	S	0.1 ml	< 800	0.1 ml	< 120	0.1 ml 0.05 ml	< 2000 à < 10 < 4000 à < 20
S.K.	B.E.	8 ml/ 12 ml D	< 10	1 ml/9 ml	< 12	1 ml/9 ml	< 200 à < 1
	S	0.1 ml	< 800	0.1 ml	< 120	0.1 ml 0.05 ml	< 2000 à < 10 < 4000 à < 20
ROTHE	B.E.	8 ml/ 12 ml D	< 10	1 ml/9 ml	< 12	1 ml/9 ml	< 200 à < 1
B.E.A.	S	0.1 ml	< 800	0.1 ml	< 120	0.1 ml 0.05 ml	< 2000 à < 10 < 4000 à < 20
PALCAM	B.E.	8 ml/ 90 ml	< 10	1 ml/9 ml	< 12	1 ml/9 ml	< 200 à < 1
	S	0.1 ml	< 800	0.1 ml	< 120	0.1 ml 0.05 ml	< 2000 à < 10 < 4000 à < 20
M.R.S.	B.E.	8 ml/ 90 ml	< 10	1 ml/9 ml	< 12	1 ml/9 ml	< 200 à < 1
	S	0.1 ml	< 800	0.1 ml	< 120	0.1 ml 0.05 ml	< 2000 à < 10 < 4000 à < 20

B.E. : Bouillon d'Enrichissement. D = Double

P : Profondeur, S : Spiral, Pt : Prélèvement

Tableau 2 : Technique de préparation des échantillons et d'ensemencement - Seuils de détection (A2 et B).

MILIEUX	TECHNIQUE	EPONGE		RESIDUS	
		+			
		80 ml T.S. (D = 1/80)		2g + 18 ml T.S. (D = 1/10)	
		Seuils en ufc/Pt		Seuils en ufc/g	
P.C.A.	S	0.05 ml	< 1600	0.05 ml	< 200
	S-1	0.05 ml	< 16000	0.05 ml	< 2000
E.P.T.	B.E.	16 ml/150 ml	< 5	5 ml/45 ml	< 2
V.R.B.G.	P	1 ml	< 80	1 ml	< 10
	S	0.05 ml	< 1600	0.05 ml	< 200
	S-1	0.05 ml	< 16000	0.05 ml	< 2000
V.R.B.L. 30°C	P	1 ml	< 80	1 ml	< 10
	S	0.05 ml	< 1600	0.05 ml	< 200
	S-1	0.05 ml	< 16000	0.05 ml	< 2000
V.R.B.L. 44,5°C	P	1 ml	< 80	1 ml	< 10
	S	0.05 ml	< 1600	0.05 ml	< 200
	S-1	0.05 ml	< 16000	0.05 ml	< 2000

B.E. : Bouillon d'Enrichissement.
P : Profondeur, S : Spiral, Pt : Prélèvement

2.3.2.3 - Incubation

Après ensemencement les boîtes retournées, tubes et flacons ont été mis à incuber selon les conditions de température et les durées présentées aux paragraphes 2.3.1.1 et 2.3.1.2.

2.3.2.4 - Numération

Après incubation les boîtes présentant entre 30 et 300 colonies sont dénombrées sous une lumière forte, avec référence à des tables pour les dénombrements d'ensemencements réalisés à l'aide de l'ensemenceur Spiral. Les critères de dénombrement sont présentés ci-dessous :

- germes aérobies mésophiles : dénombrement de toutes les colonies,
- Pseudomonas* : dénombrement de toutes les colonies,
- Entérobactéries : dénombrement des colonies rouges d'un diamètres ≥ 0.5 mm,

- coliformes : dénombrement des colonies rouges d'un diamètre ≥ 0.5 mm,
- entérocoques : dénombrement des colonies petites, translucides et entourées d'un halo noir,
- staphylocoques totaux : dénombrement de toutes les colonies,
- Staphylococcus aureus* : dénombrement des colonies présentant un halo clair (protéolyse) et éventuellement plus tardivement des zones opaques dans ce halo clair (action de lipases),
- Listeria* : dénombrement des colonies d'environ 2 mm de diamètre, de couleur gris-vert, avec un centre concave et un halo noir sur fond rouge cerise,
- lactobacilles : dénombrement des colonies opaques incolores ou blanchâtres d'un diamètre de 0.5 à 1 mm, présentant des contours nets ou irréguliers, de consistance homogène ou discrètement granuleuse.

2.4 - SELECTION ET REPIQUAGE DES COLONIES

Pour chaque échantillon des colonies présentant un diamètre supérieur à 0.5 mm ont été prélevées à partir de chacun des milieux V.R.B.G., V.R.B.L. à 30°C et à 44.5°C pour A2, et uniquement à partir du milieu V.R.B.L. à 44.5°C pour B, dans la limite de 10 sur la boîte permettant le dénombrement le plus clair. Le choix s'effectue indépendamment de l'aspect des colonies à l'intérieur de deux segments diamétralement opposés sur la boîte de Pétri. Après croissance sous forme de spots sur gélose T.S.A. incubé 48 h à 30°C, trois purifications sont effectuées pour chaque colonie sur gélose P.C.A. incubée 48 h à 30°C.

2.5 - IDENTIFICATION

2.5.1 - Les produits

- galeries API 20E (bioMérieux 20100) et cartes GNI (bioMérieux V1306) pour l'identification des bacilles à Gram négatif et plus spécifiquement pour l'identification des Entérobactéries,
- galeries API Listeria (bioMérieux 10300) pour l'identification des colonies provenant du milieu Palcam,
- ampoules de milieu de suspension pour galeries API 20E (bioMérieux 20110),

- kit réactifs API (Diagnostics Pasteur 53911),
- bouteille d'huile de paraffine (bioMérieux 70100),
- réactif oxydase pour la recherche de l'oxydase (Diagnostics Pasteur 53831),
- eau oxygénée pour la recherche de la catalase (bioMérieux 55561),
- réactifs nécessaires à la coloration de Gram (Diagnostics Pasteur 55281),
- réactif de Kovacs pour la recherche de l'indole (Diagnostics Pasteur 55311),
- plasma de lapin pour la recherche de la coagulase de *Staphylococcus aureus* (Diagnostics Pasteur 56352),
- gélose à ADN et au bleu de toluidine pour la recherche de la thermonucléase de *Staphylococcus aureus* (Diagnostics Pasteur 53555),

2.5.2 - Techniques d'identification

Les identifications ont porté sur des colonies isolées de milieux sélectifs ou électifs.

2.5.2.1 - Caractérisation de l'ensemble des germes recherchés

Pour caractériser les genres ou groupes de genres de colonies observées sur les différents milieux, les tests ou examens suivants ont été réalisés :

- examen de la colonie : pigmentation, aspect,
- examen microscopique de la bactérie (coloration de Gram),
- test de la catalase,
- test de l'oxydase.

2.5.2.2 - *Staphylococcus aureus*

Pour les identifications de staphylocoques présumés pathogènes provenant du milieu B.P., les tests suivants ont été effectués : recherche de la coagulase et de la thermonucléase.

2.5.2.3 - *Listeria*

Les identifications de colonies suspectes provenant du milieu Palcam ont été effectuées à l'aide de galeries API *Listeria*.

2.5.2.4 - Entérobactéries et coliformes

2.5.2.4.1 - Cartes GNI

Le Vitek Auto Microbic System (A.M.S. ; Vitek Systems, 595 Anglum Drive, Hazelwood, Missouri 63042-2395, U.S.A.) est un système d'identification automatique basé sur la lecture optique de réactions biochimiques dans une carte standard inoculée ; cette carte est composée de puits contenant des substrats et des indicateurs colorés pour chaque réaction biochimique testée. L'A.M.S. fut introduit en 1976 pour la détection et l'identification automatiques d'organismes dans l'urine (Nicholson et Koepke, 1979). En 1980 le système fut utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae* (Isenberg *et al.*, 1980). En 1984, Vitek Systems, Inc. (Hazelwood, Mo.) remplaça la carte EBC-Plus par la carte GNI (Gram Negative Identification card), augmentant ainsi le nombre d'espèces d'Entérobactéries identifiables de 7 à 30. L'A.M.S. a l'avantage d'être complètement automatisé une fois la carte introduite dans le module d'incubation et de lecture. L'A.M.S. allie précision, rapidité et reproductibilité. Le temps technicien requis pour 10 analyses est de 30 minutes (O'Hara *et al.*, 1993).

Souches : 3200 souches de germes à Gram négatif provenant des deux sites industriels étudiés ont été traitées par l'A.M.S. Vitek.

Technique : A partir de colonies jeunes (18-24 h), un test de cytochrome oxydase est réalisé, les résultats positifs sont enregistrés sur la carte GNI. Une suspension est effectuée dans une solution saline et ajustée à la turbidité standard. Cette suspension est ensuite inoculée dans une carte GNI à l'aide d'un injecteur Vitek. Les cartes sont alors incubées à 36°C +/- 2°C dans un lecteur Vitek A.M.S.. La lecture des 30 tests (31 avec l'oxydase) des cartes s'opère toutes les demi-heures. L'identification est validée quand le seuil d'identification du premier taxon est supérieur à 0.90 (valeur P). Après une durée d'incubation comprise entre 4 h et 18 h, un code binaire correspondant à une identification et à un seuil d'identification est obtenu. Les deux taxons ayant les meilleures valeurs d'identification sont sélectionnés comme premier et deuxième choix et imprimés avec les niveaux de probabilité P attendus. Si le profil des réactions n'est typique d'aucune espèce comprise dans la base de données de l'A.M.S., la souche est rapportée comme étant un "unidentified organism". Si la croissance est insuffisante dans le puits de contrôle, la souche est rapportée comme étant "non-viable". Toutes les souches présentant un seuil d'identification P supérieur à 0.50 comme premier choix ont été retenues sous l'identification attribuée.

2.5.2.4.2 - Galeries API 20E

Le système API 20E est utilisé depuis 1973 (O'Hara *et al.*, 1992). Ce système a été conçu pour identifier des espèces appartenant aux *Enterobacteriaceae*. Sa simplicité d'utilisation a contribué à son succès (Shayegani *et al.*, 1978). Dans plusieurs études comparatives portant sur la fiabilité de systèmes d'identification, le système API sert de référence (Cox et Mercuri, 1978 ; Cox *et al.*, 1983 ; Jorgensen *et al.*, 1983 ; Bailey *et al.*, 1985 ; O'Hara *et al.*, 1993 ; Kleiss *et al.*, 1995). Seulement 50% des bactéries à Gram négatif non fermentantes sont correctement identifiées au genre, et 22% à l'espèce. Cependant les espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia* et *A. calcoaceticus* sont correctement identifiées (Shayegani *et al.*, 1978). Le temps technique requis pour l'ensemencement et la lecture de 10 galeries est de 50 minutes (O'Hara *et al.*, 1993).

Souches : Le choix des souches utilisées pour la comparaison des systèmes d'identification API 20E et AMS Vitek, portant sur les souches provenant des campagnes de prélèvements effectuées sur le site A, s'est effectué selon les critères suivants :

- 103 souches choisies de manière équitable parmi les espèces les plus représentées,
- 100 souches choisies à l'aide d'une table de hasard.

Sur ces 203 souches, 40 montrèrent une discordance d'identification (identification différente de l'A.M.S., ou la même identification mais avec une probabilité d'identification inférieure à 55%). Ces 40 souches ont été de nouveau identifiées par galeries API 20E mais cette fois avec une température d'incubation de 30°C.

Technique : L'ensemencement de la galeries API 20E (API system, S. A., Montalieu Vercieu, France) est effectué avec une suspension bactérienne de McFarland 1 réalisée à partir de colonies pures ayant cultivé 24 h à 37°C sur gélose P.C.A. et testées pour la (cytochrome) oxydase. Les galeries sont incubées 24 h à 37°C, ou à 30°C dans notre étude comparative portant sur les températures d'incubation ; après addition des réactifs les réactions sont enregistrées sous forme de profils à sept chiffres et les identifications sont effectuées en utilisant le codeur API (Anon, 1976).

2.5.2.4.3 - Identification des acides gras membranaires par la C.P.G.

L'identification des acides gras membranaires par la Chromatographie en Phase Gaz (C.P.G.) est une technique qui a été utilisée pour la première fois en identification bactérienne vers le milieu des années 1960 (Moss, 1981). Les travaux de différents auteurs (Moss et Dees, 1975 ; Ikemoto *et al.*, 1978 ; Bergan et Sorheim, 1984 ; Huys *et al.*, 1994) ont montré qu'il était possible de différencier des micro-organismes sur la base de leur composition en acides gras cellulaires. Ainsi des espèces parfois très proches selon des critères physiologiques et/ou biochimiques ont pu être séparées grâce à l'analyse qualitative et quantitative de leur contenu en acides gras (Moss, 1981). Cette technique est

rapide (Bergan et Sorheim, 1984) et ne nécessite pas l'emploi de grandes quantités de réactifs (Stead, 1992).

La membrane externe des bactéries à Gram négatif contient en quantités égales trois composants: des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides (Lambert, 1988). L'absence de lipopolysaccharides donne des colonies R (rough), par opposition aux colonies S (smooth) (Westphal *et al.*, 1983). La présence dans ces lipopolysaccharides d'acides gras hydroxy et l'absence d'acides gras insaturés sont importantes dans le maintien de l'organisation de la membrane externe et de sa perméabilité (Nikaido et Vaara, 1985). Les acides gras insaturés de la membrane se trouvent dans les phospholipides. Les bactéries à Gram négatif possèdent généralement des acides gras comme constituants des lipopolysaccharides à un taux de 11%, souvent à courtes chaînes avec des groupements hydroxyles (Drucker, 1977). La paroi des bactéries à Gram positif contient 3% de lipides. Les cellules bactériennes modifient la composition de leurs lipides pour maintenir la fluidité de leur membrane en fonction de leur phase de croissance mais également en fonction des variations de la température.

Les acides gras membranaires de souches d'*Enterobacter sakazakii* ont été identifiés par C.P.G. afin d'évaluer la fiabilité de cette technique en identification, et pour tenter de dégager une relation entre les profils d'acides gras et la température des lieux de prélèvement.

Souches industrielles: Elles proviennent de 168 prélèvements de surface réalisés à l'aide d'éponges stériles et de 75 prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs réalisés à l'aide d'ustensiles stériles sur un site de production de poudre de lait. Les coliformes thermotolérants ont été dénombrés sur gélose V.R.B.L. incubée 24 heures +/- 1 heure à 44,5°C +/- 0.5°C. Un maximum de 10 souches par prélèvement a été identifié à l'aide de l'A.M.S. Vitek (AutoMicrobic System). Sur les 800 souches identifiées provenant de ce milieu, 96 étaient des *Enterobacter sakazakii*. Les acides gras membranaires de ces 96 souches ont été identifiés par C.P.G.

Souches de référence: Elles proviennent de la Collection Institut Pasteur (C.I.P.) de Paris :

- la souche AHF 55.33 provient de poudre de lait,
- la souche 192 CIP 103581 est d'origine inconnue.

Technique: Nous avons utilisé un Chromatographe Hewlett Packard modèle 5890 série II (Hewlett-Packard Company - P. O. Box 23452 - 1100 DZ Amsterdam Z.O.). Cet appareil est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, d'une colonne capillaire de silice non polaire (25 m x 0,2 mm x 0,33 µm épaisseur du film), ayant une phase stationnaire contenant 5% de méthyl phenylsilicone (référence 5060-9084, HP, USA), et d'un passeur d'échantillons automatique (référence 7673, HP, USA). Comme gaz vecteur nous avons utilisé de l'hydrogène C (bouteille B50, Air liquide, France). Un régulateur de pression assure une pression uniforme et constante à l'entrée de la colonne (30 ml/min.). La pression en tête de colonne a été maintenue à 70 kPa afin d'obtenir l'élution du pic de solvant à un temps de rétention de 1,6 minutes. La température de l'injecteur a été fixée à 250°C. Un intégrateur HP 3369II associé au chromatographe enregistre les profils chromatographiques et les temps de rétention des différents esters méthylés.

L'intégrateur est relié à un ordinateur : le Microbial Identification System (M.I.S.), qui permet le traitement des données. Ce système analyse les profils des acides gras à chaîne carbonée allant de 9 à 20 atomes de carbone. Nous avons utilisé la version 3.8 de la banque de données TSBA, spécifique des bactéries aérobies. Les profils d'acides gras de la banque de données sont constitués de profils moyens en acides gras, résultant de moyennes réalisées à partir d'un minimum de 20 souches par espèce. L'exploitation des 96 profils d'acides gras a été réalisée en calculant la moyenne des proportions respectives de chaque acide gras, leur gamme de variation et la proportion de souches présentant chacun des acides gras étudiés.

A partir de souches purifiées, une gélose T.S.A. estensemencée selon la technique des quadrants et incubée 24 h +/- 2 h à 28°C +/- 1°C. Après incubation, les colonies confluentes des quadrants 2 et 3 sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et introduites dans un tube stérile. La préparation des échantillons comporte quatre étapes:

- La première étape consiste à extraire les acides gras cellulaires par saponification. La saponification a pour objet la lyse des cellules, libérant les acides gras sous forme de savons (sels de sodium des différents acides). Dans la cellule bactérienne, ces acides gras sont normalement présents sous forme de lipides complexes. La saponification est réalisée à 100°C pendant 30 minutes en présence de soude et de méthanol.

- Lors de l'estérification (deuxième étape), les acides gras libérés, peu volatils, sont transformés en esters méthyliques (à tension de vapeur plus élevée). Cette méthylation est produite à chaud à 80°C pendant 10 minutes, en présence d'acide chlorhydrique concentré et de méthanol.

- L'extraction des acides gras estérifiés constitue la troisième étape. Les esters méthyliques du mélange passent en phase organique. L'extraction se passe à la température du laboratoire sous agitation par retournement en présence d'hexane et de Méthyl Tert-Butyl Ether (MTBE).

- Enfin avant analyse, un lavage de la phase organique par une solution d'hydroxyde de sodium diluée est nécessaire afin d'éliminer toute trace de réactif et d'eau.

2.5.2.4.4 - Test de Mackenzie

Le test de Mackenzie a été proposé en 1948 par Mackenzie *et al.* pour la détermination rapide des *E. coli* sur la base de la production de gaz à partir de lactose et d'indole à partir de tryptophane après incubation 24 h à 44.5°C.

Souches : Les 109 souches testées proviennent de B, elles représentent l'ensemble des espèces identifiées au cours de cette campagne de prélèvements.

Technique : Après repiquage à 44.5°C sur gélose P.C.A. pendant 24 h, un tube d'eau peptonée et un tube de B.L.B.V.B. contenant une cloche sontensemencés et mis à incuber à 44.5°C pendant 24 h à 48 h. Le test indole est positif lorsqu'un anneau rouge se forme en surface du tube d'eau peptonée après ajout de quelques gouttes de réactif de Kovacs. Le test gaz est positif si une bulle est visible dans la cloche contenue dans le tube de B.L.B.V.B. Selon la norme ISO 6887 qui fait l'objet de la

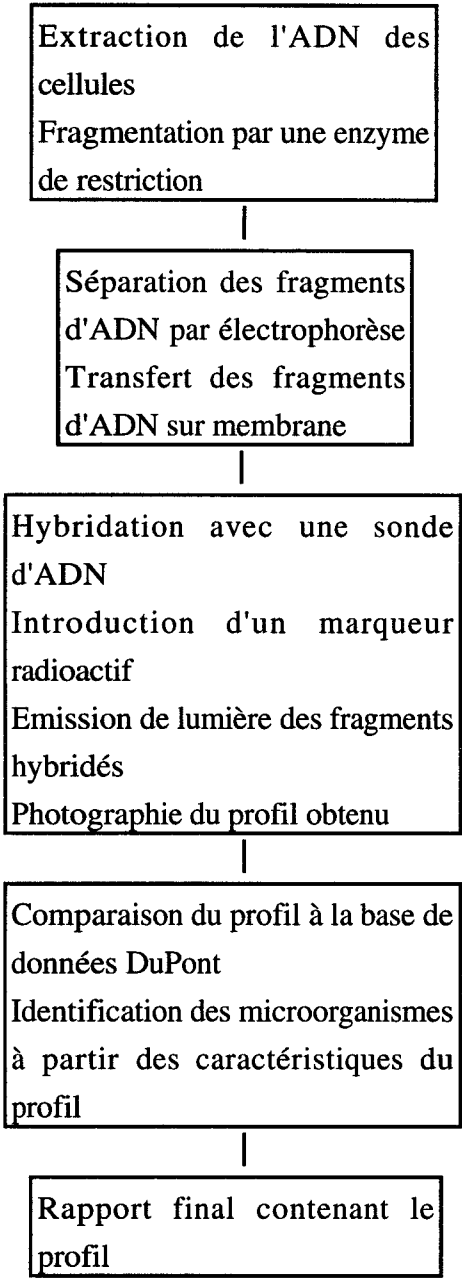
norme française NF V 08-020 (Recueil de Normes Françaises, 1993), les *E. coli* présumés sont des bactéries qui, à 44.5°C, fermentent le lactose avec production de gaz et produisent de l'indole à partir du tryptophane en 24 h à 48 h. Il n'existe que trois espèces d'*Enterobacteriaceae* lactose positif capables de fermenter ce glucide avec production de gaz à 44.5°C : *Escherichia coli* (97% des souches), *Klebsiella pneumoniae* (81%) et *Enterobacter sakazakii* (71%) ; or parmi ces trois espèces *Escherichia coli* est la seule qui soit indologène, si l'on excepte les très rares souches indole positif de *Enterobacter sakazakii* (Richard, 1985).

2.6 - RIBOTYPAGE

Souches : Les 20 souches traitées appartiennent à l'espèce *Enterobacter sakazakii*. Elles proviennent de l'usine A (2 souches) et de l'usine B (18 souches). Le choix des souches s'est effectué en tentant de traiter l'ensemble des profils Vitek les plus rencontrés, et en prenant des souches provenant de différents lieux de prélèvement.

Technique : Le ribotypage a été effectué à l'aide du "Dupont Riboprinter Microbial Typing Technology" (Dupont Central Research and Development), installé au Campden Food and Drink Research Association, Microbiology department (Chipping Campden, Gloucestershire GL55 6LD, UK). Le profil génétique est généré à partir des opérons de l'ARN ribosomal (ARNr). La stabilité des gènes de l'ARNr dans les bactéries est très bonne, ceux-ci n'étant pas modifiés par les conditions nutritionnelles ou environnementales. Après utilisation d'enzymes de restriction spécifiques, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse. Un système d'imagerie électronique permet alors de comparer le profil obtenu avec ceux se trouvant dans une base de données (figure 5).

Figure 5 : Protocole utilisé pour le ribotypage de souches d'*Enterobacter sakazakii*.



2.7 - METHODOLOGIE STATISTIQUE

Les locaux étudiés se trouvaient dans la zone sèche protégée de l'usine B. Le plan de prélèvement a été conçu pour permettre une analyse statistique, par une harmonisation des types de prélèvement et une répétition des prélèvements dans chaque pièce, afin de permettre des comparaisons fiables des charges microbiennes entre les différents locaux. Deux types de prélèvement ont été utilisés : l'éponge, à raison de 3 à 10 par local selon la surface de la pièce ; le prélèvement du contenu des sacs d'aspirateurs à l'aide de cuillères stériles, au nombre de 5 par aspirateur, chaque local possédant au moins un aspirateur pour permettre un nettoyage à sec des surfaces.

Les comparaisons de charges microbiennes ont été effectuées respectivement pour les prélèvements de surfaces et les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs. Les lots sont constitués pour les sols des prélèvements provenant d'une "unité géographique" de l'usine (local, palier), et pour les aspirateurs des 5 prélèvements provenant de chaque sac d'aspirateur. Les lots ont ainsi pu être classés pour chaque recherche microbienne. L'étude de la dispersion par lot a été préalablement effectuée à l'aide de la formule :

$$\text{Médiane} - \text{moyenne} / (\text{écart type} / \text{nombre de prélèvements}) < 2$$

Pour l'ensemble des lots cette équation s'est vérifiée, les lots ont donc pu être considérés comme étant relativement homogènes. Le test de Kruskal-Wallis a été effectué à l'aide du logiciel Statview. Le principe de ce test repose sur l'établissement pour chaque lot de valeurs d'un rang moyen correspondant à la somme, rapportée à l'effectif du lot considéré, du nombre de dépassements et d'égalités des valeurs de ce lot par rapport aux valeurs des autres lots. Ce classement a été réalisé par local et pour chaque recherche effectuée. La précision est établie par la valeur p : La probabilité d'égalité entre deux lots sera d'autant plus faible que cette valeur sera petite. Par exemple, pour une valeur p de 0.01, il y a seulement une chance sur 100 que deux lots comparés ne soient pas différents. Dans ce cas nous pouvons dire qu'il existe une différence statistique entre les deux lots de valeurs comparés.

2.8 - DEFINITION DES ZONES SELON L'ACTIVITE ET L'HUMIDITE

Les différentes zones étudiées sont la zone sèche protégée (ZSP), où se trouvent les locaux de production et où l'accès du personnel est restreint au minimum, la zone sèche semi-protégée (ZSSP) qui comprend les locaux de conditionnement et où l'accès du personnel est limité, celui-ci devant porter coiffe, blouse et couvre-chaussures ; la zone sèche non protégée (ZSNP), en libre accès et où se trouvent notamment les locaux de stockage ; et la zone humide interne (ZHI) comprenant essentiellement la condenserie et le stockage de lait. En usine la ZSP et la ZSSP ne font qu'une seule zone. Cependant les différences de trafic de personnel et de température des locaux nous ont amenés à envisager l'existence d'une zone intermédiaire. La répartition des locaux dans la zone de production nous a amenés à envisager. La définition exacte de ces zones est présentée ci-dessous :

usine AZSP (tour d'atomisation) :

4e1/2

4e

3e

2e

Post-Sécheur (transfert de la poudre de lait vers la zone de conditionnement)

escalier du 4e1/2 au Post-Sécheur

ZSSP (locaux de conditionnement) :

Stock totes (stockage de la poudre de lait dans des containers métalliques)

Stock boîtes vides

Local Albro (conditionnement de la poudre de lait dans des boîtes métalliques)

Emballage (paletisation des boîtes)

Ligne sacs (conditionnement de la poudre de lait dans des sacs)

escalier sous le Post-Sécheur

ascenseur

ZSNP (essentiellement locaux de stockage) :

Salle accès zone protégée

Stockage bigbags (sacs recevant la poudre de lait et se trouvant à l'intérieur des totes)

Chaufferie

Ferblanterie (fabrication des boîtes métalliques de conditionnement)

Stock A (palettes vides)

Stock B (palettes pleines)

ZHI (étapes du procédé où se trouve le lait dans sa phase liquide - nettoyage) :

Lavage totes

Stock préconcentré (produits de nettoyage)

Condenserie rdc (évaporation)

Condenserie 1er

Condenserie 2e

Standardisation (taux de matière grasse)

Stockage lait

usine BZSP :

7e

5e

passerelle 4e

locaux annexe 4e, 2e1/2, 2e

3e

2e

Post-Sécheur

escalier du 7e au 2e

ZSSP :

local entrée stock totes

stock totes

stock rdc

local Albro

Emballage

sous-sol

escalier sous le 2e

ascenseur

2.9 - EXPLOITATION DES RESULTATS

L'étude des ratios a été effectuée à partir des rapports suivants :

- Coliformes totaux/Entérobactéries (C/E),
- Coliformes thermotolérants/Entérobactéries (T/E),
- Coliformes thermotolérants/Coliformes totaux (T/C).

Ces ratios n'ont bien sûr pu être calculés que lorsque le dénombrement du germe figurant au dénominateur était supérieur au seuil de dilution.

L'exploitation des seuils de dénombrement par recherche et par type de prélèvement se fait en calculant les proportions de prélèvements négatifs pour les seuils $< 1 \text{ ufc}/25\text{cm}^2$, $< 10 \text{ ufc}/25\text{cm}^2$, $< 100 \text{ ufc}/25\text{cm}^2$, $< 1000 \text{ ufc}/25\text{cm}^2$ et $< 10000 \text{ ufc}/25\text{cm}^2$ pour les prélèvements de surface ; et les seuils $< 10 \text{ ufc/g}$, $< 100 \text{ ufc/g}$ et $< 1000 \text{ ufc/g}$ pour les prélèvements de résidus.

Selon le Journal officiel de la république française (1991), " il convient de retenir que la valeur des méthodes de dénombrement microbien n'est pas absolue, quelle que soit la nature des milieux de culture utilisés. Il est généralement admis que la variabilité peut atteindre 1/2 log avec les milieux liquides ."

RESULTATS

Tableau 3: Etude comparative des dénombrements obtenus par éponge et par écouvillon.

Eponge (ufc/25cm ²) (a)	Ecouvillon (ufc/25cm ²) (b)	Rapport a/b
180	< 40	> 4,5
220	< 40	> 5,5
5.10 ⁴	< 40	> 1250
1,3.10 ⁴	< 40	> 325
940	40	23
670	3,8.10 ⁴	0
3.10 ⁴	3,8.10 ⁴	1
45	< 40	> 1
2,5.10 ⁴	< 40	> 625
6,7.10 ³	80	84
3.10 ⁷	1,7.10 ⁴	1,8.10 ³
3.10 ⁷	3,7.10 ⁴	810
1,4.10 ⁴	600	23
8.10 ⁵	3.10 ⁷	0
600	< 40	> 15
720	1,6.10 ⁵	0
1,6.10 ⁴	520	30
3.10 ³	280	11
3,3.10 ⁷	6.10 ³	5,5.10 ³

3.1.1.2 - Milieux utilisés

Les résultats des dénombrements obtenus à partir des milieux V.R.B.G. à 37°C et V.R.B.L. à 30°C montrent des similitudes pour certains seuils de dénombrement, notamment les seuils < 10000 ufc/25cm² (respectivement 93% et 93%) et < 1000 ufc/25cm² (respectivement 81% et 83%) pour les prélèvements de surface (tableau 4), et < 1000 ufc/g (respectivement 82% et 88%) pour les prélèvements de résidus (tableau 5). Cependant pour ces 3 seuils de dénombrement les résultats obtenus à partir du milieu V.R.B.L. à 44.5°C montrent de plus fortes proportions de prélèvements négatifs (96%).

Tableau 4 : Proportions de prélèvements (%) par seuil de dénombrement sur 109 prélèvements de surface pour chaque dénombrement effectué.

Seuil	VRBG 37°C	VRBL 30°C	VRBL 44,5°C
< 10000 ufc/25cm ²	93	93	96
< 1000 ufc/25cm ²	81	83	96
< 100 ufc/25cm ²	68	76	91
< 10 ufc/25cm ²	51	63	90
< 1 ufc/25cm ²	36	54	81

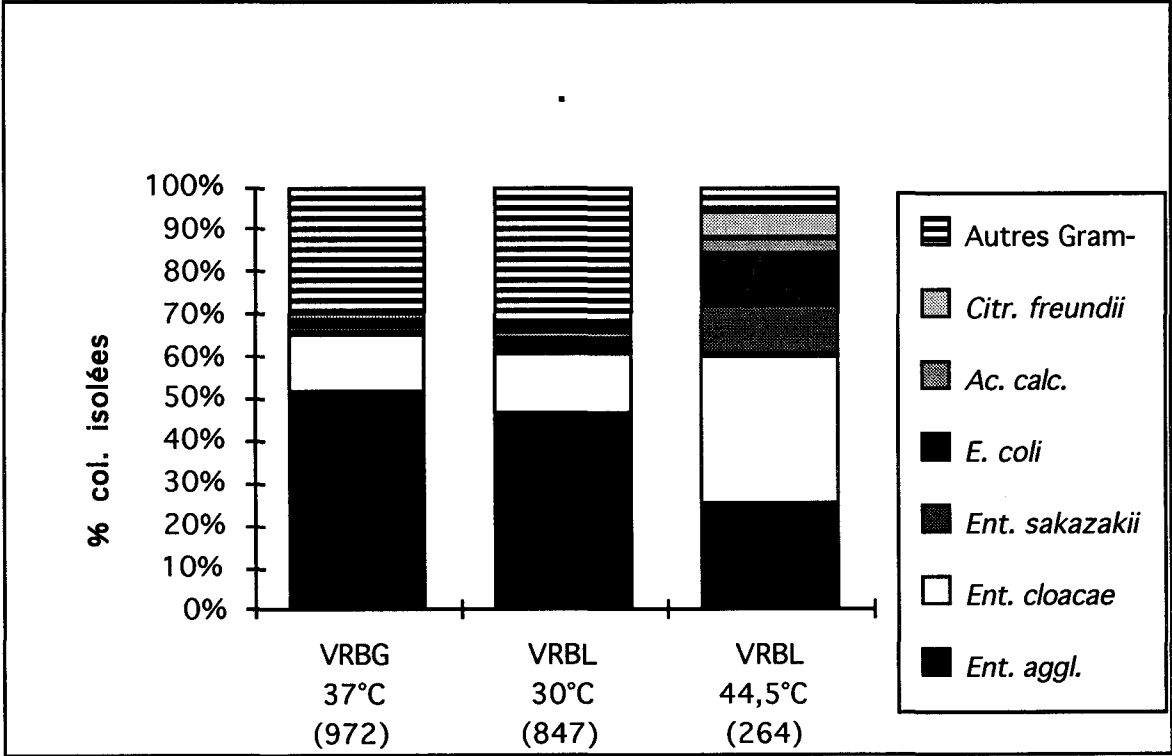
Tableau 5 : Proportions de prélèvements (%) par seuil de dénombrement sur 68 prélèvements de résidus pour chaque dénombrement effectué.

Seuil	VRBG 37°C	VRBL 30°C	VRBL 44.5°C
< 1000 ufc/g	82	88	96
< 100 ufc/g	61	68	91
< 10 ufc/g	47	58	84

Les proportions observées à partir des milieux V.R.B.G. incubé 24 h à 37°C et V.R.B.L. incubé 24 h à 30°C ne diffèrent pas de plus de 5% (figure 6).

Par contre, le milieu V.R.B.L. incubé 24 h à 44.5°C se distingue par des proportions élevées en *Enterobacter cloacae* (36% contre 15% à 30°C), *Enterobacter sakazakii* (11% contre 1% à 30°C), *Escherichia coli* (11% contre 2% à 30°C) et *Citrobacter freundii* (7% contre 1% à 30°C), alors que pour ce même milieu les proportions sont relativement faibles en *Enterobacter agglomerans* (24% contre 46% à 30°C) ainsi qu'en *Pseudomonas aeruginosa* (1% contre 10% à 30°C), cette dernière espèce ayant été observée contre toute attente sur le milieu VRBL.

Figure 6 : Résultats des identifications à l'espèce pour différents milieux.



3.1.1.3 - Techniques d'identification

3.1.1.3.1 - A.M.S. VITEK

Les durées moyennes les plus courtes d'identification ont été obtenues avec les coliformes (5.2 h - 8.7 h), sauf pour le genre *Citrobacter* (> 10.5 h) et le genre *Proteus* (4.6 h). La plupart des autres genres (*Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) ont présenté des durées moyennes d'identification supérieures à 10 h (tableau 6). Les seuils moyens d'identification de l'ensemble des genres étudiés sont supérieurs à 88%, mis à part le genre *Citrobacter* qui se situe à 73%.

Tableau 6: Durées et seuils moyens d'identification par l'A.M.S. pour les genres les plus rencontrés au cours de cette étude.

Identification	Nombre	Durée d'incubation	Seuil
<i>Enterobacter</i>	1571	8,7h (4h->13h)	91,4% (48%->99%)
<i>Escherichia</i>	50	5,7h (4h->13h)	95,4% (50%->99%)
<i>Klebsiella</i>	56	5,2h (4h->13h)	97,5% (84%->99%)
<i>Citrobacter</i>	47	10,5h (4h->13h)	73,3% (46%->99%)
<i>Serratia</i>	23	11,1h (6h->13h)	89,7% (48%->99%)
<i>Pseudomonas</i>	46	15,4h (9h->18h)	88,2% (48%->99%)
<i>Acinetobacter</i>	99	11,4h (6h->18h)	97,6% (71%->99%)
<i>Flavimonas</i>	22	18h.	90,5% (66%->99%)
<i>Proteus</i>	19	4,6h (4h->13h)	97,8% (88%->99%)
autres genres	8	-	-
non identifiés	427	18h	-
TOTAL	2376	-	-

- : sans objet

Parmi les principaux coliformes étudiés, seules les espèces *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter intermedius* ainsi que le genre *Citrobacter* montrent quelques discordances d'identification entre les deux systèmes A.M.S. et API 20E (tableau 7). En revanche la concordance est bonne pour les espèces *Enterobacter agglomerans* (99%), *Enterobacter cloacae* (97%), *Enterobacter amnigenus* (83% - 100%), *Klebsiella pneumoniae* (100%), *Klebsiella oxytoca* (100%) *Serratia liquefaciens* (100%) et le genre *Escherichia* (67% - 100%).

Tableau 7 : Comparaison de l'A.M.S. et du système API 20E.

Identification A.M.S.	Nombre	Concordance /API 20E	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	74	73	99 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	37	36	97 %
<i>Enterobacter sakazakii</i>	14	3	21 %
<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	12	12	100 %
<i>Enterobacter amnigenus 2</i>	6	5	83 %
<i>Enterobacter intermedius</i>	8	0	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	5	0	
<i>Citrobacter diversus</i>	5	0	
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0	
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	2	100 %
<i>Serratia rubidaea</i>	1	0	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	5	100 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	6	100 %
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	0	
<i>Escherichia coli</i>	15	15	100 %
<i>Escherichia vulneris</i>	3	2	67 %
<i>Ewingella americana</i>	1	1	100 %
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	100 %
<i>Flavimonas oryzae</i>	1	0	
<i>Yersinia frederiksenii</i>	1	0	
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	1	0	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	0	
Total	203	161	79%

La discordance entre l'A.M.S. et le système API concernant l'espèce *Enterobacter sakazakii* provient d'une défaillance de ce dernier système pour l'identification des souches inositol négatives. L'A.M.S. constitue donc un outil d'identification fiable pour cette espèce.

3.1.1.3.2 - API 20E

Sur les 40 souches testées, 22 (55%) montrèrent des profils biochimiques différents à 37°C et 30°C (tableau 8). Parmi ces 22 variations observées, 21 (95.4%) donnèrent une meilleure probabilité d'identification à 30°C, 17 (77.3%) donnèrent une meilleure concordance avec l'identification A.M.S. Vitek par une probabilité d'identification plus élevée ou par une identification différente de celle trouvée à 37°C, et 14 (63.6%) donnèrent un profil biochimique correspondant à une espèce différente de celle trouvée à 37°C. Parmi ces 14 identifications différentes, 10 (71.4%) concordaient avec celles trouvées par l'A.M.S. Vitek. Un test Citrate négatif à 37°C donna un profil d'*Enterobacter intermedius* alors qu'à 30°C la seule variation de ce test donna *Enterobacter cloacae*. L'accroissement des probabilités d'identification des espèces *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans* et *Ewingella americana* à 30°C est dû respectivement aux tests Vosges-Proskauer positif, melibiose négatif et citrate positif/rhamnose positif. La probabilité d'identification de l'espèce *Enterobacter amnigenus* était de 56% à 30°C, alors qu'à 37°C les tests arginine dihydrolase (ADH) négative, ornithine decarboxylase (ODC) négative et sodium citrate (CIT) négatif donnèrent *Enterobacter agglomerans* avec une probabilité d'identification de 43.7%. L'espèce *Rahnella aquatilis* a été identifiée avec une probabilité d'identification de 88.8% à 30°C, alors qu'à 37°C avec un test inositol négatif la souche fut identifiée comme *Enterobacter agglomerans* avec un pourcentage d'identification de 63.2%.

Tableau 8: Comparaison des identifications obtenues par l'A.M.S. à 35.2°C et par galerie API 20E incubées à 37°C et à 30°C.

Identification .AMS (x nombre de souches)	Nombre de souches	Milieu d'origine	Identification API à 37°C	Biocode à 37°C	Identification API à 30°C	Biocode à 30°C
non identifié	1	VRBL 30°C	<i>Enterobacter amnigenus</i> 56.3%	3305173	<i>Enterobacter amnigenus</i> 56.3%	3305173
non identifié	1	VRBG 37°C	<i>Enterobacter agglomerans</i> 49.7%	1044553	<i>Enterobacter agglomerans</i> 49.7%	1044553
<i>Enterobacter gergoviae</i> 93% (x 2), 96%	3	VRBL 30°C (2x) VRBG 37°C	<i>Enterobacter agglomerans</i> 43.7%	1005173	<i>Enterobacter amnigenus</i> 56.3%	3305173
<i>Enterobacter intermedius</i> 90%, 92%(x 2)	3	VRBL 30°C (2x) VRBG 37°C	<i>Enterobacter agglomerans</i> 49.7%	1044553	<i>Enterobacter agglomerans</i> 49.7%	1044553
<i>Enterobacter amnigenus</i> 92%, 96%, 98%(x 4)	6	VRBG 37°C (4x) VRBL 30°C (2x)	<i>Enterobacter agglomerans</i> 43.7%	1005173	<i>Enterobacter amnigenus</i> 56.3%	3305173
<i>Enterobacter amnigenus</i> 95%	1	VRBG 37°C	<i>Citrobacter diversus</i> 93.3%	3144553	<i>Citrobacter diversus</i> 93.3%	3144553
<i>Yersinia frederiksenii</i> 90%	1	VRBG 37°C	<i>Enterobacter agglomerans</i> 63.2%	1005773	<i>Rahnella aquatilis</i> 88.8%	1005573 pigment-
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> 90%	1	VRBG 37°C	<i>Enterobacter cloacae</i> 56.8%	3304573	<i>Enterobacter cloacae</i> 86.6%	3305573
<i>Enterobacter cloacae</i> 91%, 99%(x 2)	3	VRBG 37°C	<i>Enterobacter cloacae</i> 56.8%	3304573	<i>Enterobacter cloacae</i> 86.6%	3305573
<i>Enterobacter cloacae</i> 98%(x 4)	4	VRBG 37°C (2x) VRBL 30°C (2x)	<i>Enterobacter intermedium</i> 54.3%	1105573	<i>Enterobacter cloacae</i> 85.4%	1305573
<i>Citrobacter diversus</i> 59%	1	VRBL 44.5°C	<i>Escherichia hermanii</i> 95.7%	1144113	<i>Escherichia hermanii</i> 95.7%	1144113
<i>Enterobacter sakazakii</i> 98%(x 9)	9	VRBG 37°C (6x) VRBL 44,5°C (3x)	<i>Enterobacter amnigenus</i> 56.3%	3305173	<i>Enterobacter amnigenus</i> 56.3%	3305173 pigment+
<i>Enterobacter sakazakii</i> 97%	1	VRBL 30°C	<i>Enterobacter sakazakii</i> 42.2%	1305373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 42.2%	1305373 pigment+
<i>Enterobacter agglomerans</i> 95%, 99%(x 2)	3	VRBG 37°C (2x) VRBL 30°C	<i>Enterobacter agglomerans</i> 43.7%	1005173	<i>Enterobacter agglomerans</i> 88.8%	1005133
<i>Escherichia coli</i> 99%	1	VRBL 30°C	<i>Escherichia coli</i> 43.3%	5004542	<i>Escherichia coli</i> 43.3%	5004542
<i>Ewingella americana</i> 99%	1	VRBL 30°C	<i>Ewingella americana</i> 52%	.0005101	<i>Ewingella americana</i> 99.5%	.0205111
TOTAL	40					

Au niveau biochimique, sur les 39 variations de tests biochimiques observées, (tableau 9), 36 (92.3%) étaient dues à une réaction négative à 37°C pour les tests citrate (13=33.3%), arginine (9=23.1%), ornithine (9=23.1%), Vosges-Proskauer (40=10.3%) et inositol (1=2.6%), alors que 3 (7.7%) étaient dues à des réactions positives à 37°C pour les tests saccharose (2=5.1%) et rhamnose (1=2.6%). Plus précisément les tests citrate et ornithine présentèrent respectivement 48.1% (13/27) et 47.4% (9/19) de leurs réactions négatives à 37°C qui devinrent positives à 30°C, ce taux étant respectivement de 36% (9/25) et de 36.4% (4/11) pour les tests arginine et Vosges-Proskauer.

Tableau 9 : Comparaison de réponses aux test biochimiques compris dans la galerie API 20E à 30°C et 37°C pour 40 souches d'*Enterobacteriaceae*.

Test biochimique	Résultats après 24h d'incubation à 37°C (a) (+=positif; -=négatif)	Résultats discordants après 24h d'incubation à 30°C (b)	Taux de variation b/a
ONPG	39 +	0	0.0%
	1 -	0	0.0%
ADH	15 +	0	0.0%
	25 -	9	36.0%
LDC	1 +	0	0.0%
	39 -	0	0.0%
ODC	21 +	0	0.0%
	19 -	9	47.4%
CIT	13 +	0	0.0%
	27 -	13	48.1%
H ₂ S	0 +	0	0.0%
	40 -	0	0.0%
URE	0 +	0	0.0%
	40 -	0	0.0%
TDA	0 +	0	0.0%
	40 -	0	0.0%
IND	6 +	0	0.0%
	34 -	0	0.0%
VP	29 +	0	0.0%
	11 -	4	36.4%
GEL	0 +	0	0.0%
	40 -	0	0.0%
GLU	40 +	0	0.0%
	0 -	0	0.0%
MAN	40 +	0	0.0%
	0 -	0	0.0%
INO	2 +	1	50.0%
	38 -	0	0.0%
SOR	12 +	0	0.0%
	28 -	0	0.0%
RHA	38 +	0	0.0%
	2 -	1	50.0%
SAC	32 +	2	6.2%
	8 -	0	0.0%
MEL	38 +	0	0.0%
	2 -	0	0.0%
AMY	39 +	0	0.0%
	1 -	0	0.0%
ARA	39 +	0	0.0%
	1 -	0	0.0%

3.1.1.3.3 - Test de Mackenzie

Les résultats indiquent que pour les souches traitées, seule l'espèce *E. coli* présente un test de Mackenzie positif (tableau 10). Les souches de *Klebsiella oxytoca* légèrement gaz positives ne peuvent prêter à confusion, la bulle de gaz étant très petite par rapport à celle obtenue avec les *E. coli*. Pour l'ensemble des espèces étudiées, la comparaison avec les pourcentages de souches positives en indole à 37°C présentés par API est bonne. L'espèce *Enterobacter agglomerans* 2, la seule souche positive pour ce test à 37°C, n'a jamais été identifiée, de même que les rares souches d'*Enterobacter sakazakii* indole positives.

Tableau 10 : Résultats du test de Mackenzie pour des souches de coliformes provenant d'un environnement industriel.

identification A.M.S.	nombre de souches	indole	gaz	% indole+ selon API pour chaque espèce
<i>Enterobacter agglomerans</i>	30	négatif	négatif	biovar 1,3,4 : 1% biovar 2 : 99%
<i>Enterobacter cloacae</i>	17	négatif	négatif	0%
<i>Citrobacter freundii</i>	12	négatif	négatif	6%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	10	négatif	négatif	1%
<i>Escherichia coli</i>	10	positif	positif	95%
<i>Serratia plymuthica</i>	8	négatif	négatif	0%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	positif	négatif	biovar 1 : 100%
	2	positif	positif	biovar 2 : 99%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	négatif	positif	0%
	1	négatif	négatif	
<i>Escherichia hermanii</i>	3	positif	négatif	100%
	1	négatif	positif	
	1	négatif	négatif	
<i>Escherichia vulneris</i>	4	négatif	négatif	0%
<i>Enterobacter intermedium</i>	1	négatif	négatif	0%
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	négatif	négatif	0%
<i>Serratia fonticola</i>	1	négatif	négatif	0%
TOTAL	109	-	-	-

3.1.1.4 - Exploitation des résultats d'identifications

Trois critères ont été envisagés pour évaluer les proportions respectives de chaque espèce identifiée :

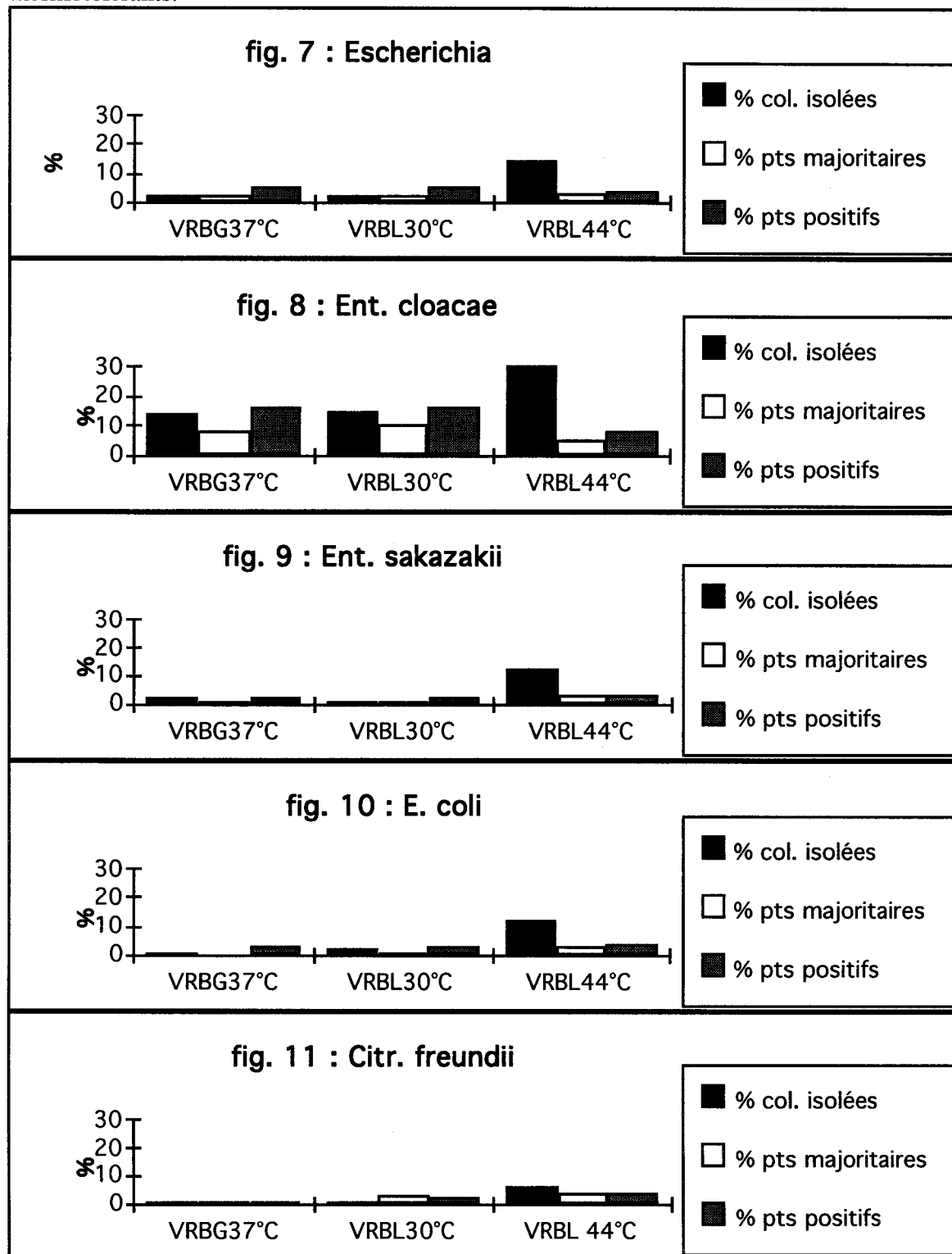
- a) la somme du nombre de colonies identifiées pour l'ensemble des prélèvements,
- b) le nombre de prélèvements majoritaires,
- c) le nombre de prélèvements positifs.

Cinq types de germes ont été retenus sur la base de leur caractère thermotolérant :

- le genre *Escherichia* (genre entérique),
- l'espèce *Enterobacter cloacae* (espèce entérique),
- l'espèce *Escherichia coli* (espèce entérique),
- l'espèce *Citrobacter freundii* (espèce entérique),
- l'espèce *Enterobacter sakazakii* (caractère thermotolérant décrit par Farmer *et al.* en 1980).

Pour l'ensemble de ces germes, la proportion de colonies isolées met en évidence de manière nette ou très nette leur caractère thermotolérant (figures 7, 8, 9, 10 et 11). Les deux autres critères étudiés (b, c) ne font pas ressortir cette tendance. Ces résultats semblent donc établir que le critère à retenir pour évaluer la proportion des germes identifiés dans un environnement industriel est le nombre de colonies (critère a). Le nombre de souches traitées permet d'accorder une certaine confiance à ces résultats.

Figures 7, 8, 9, 10 et 11 : Evaluation de différents critères qualitatifs sur plusieurs germes présumés thermotolérants.



col. : colonies

pts : prélèvements

3.1.2 - Etude préliminaire de la qualité microbiologique de l'environnement sur l'ensemble d'une unité de production

3.1.2 1 - Choix d'un indicateur de maîtrise de la qualité microbiologique de l'environnement

L'étude globale des diverses flores microbiennes effectuée lors de la première campagne de prélèvements (A1) a montré que pour les prélèvements à l'éponge et pour le seuil considéré ($< 100 \text{ ufc/cm}^2$), les dénombrements effectués dans les différentes zones ne présentent pas de différence significative, sauf pour les G.A.M. dont les dénombrements sont légèrement plus élevés en zone sèche qu'en zone humide (figures 12, 13 et 14). Le manque d'homogénéité des prélèvements à l'éponge (sols, parois, matériel...) ainsi que les grandes différences de nombre d'échantillons entre les zones incitent à la prudence quand aux conclusions à tirer de ces résultats.

Pour les résidus et au seuil de dénombrement $< 100 \text{ ufc/g}$, l'ensemble des flores étudiées présente les dénombrements les plus faibles en zone de production et les plus élevés en zone humide, seuls les entérocoques se maintenant au même niveau dans toute la zone sèche mais présentant des charges plus élevées en ZHI (figures 12, 13 et 14). Il s'avère donc que dans le cas des prélèvements de résidus, la présence des Entérobactéries peut être mise en relation avec les conditions d'hygiène de l'environnement, leur présence étant d'autant plus faible que les contraintes de circulation du personnel sont fortes. Cette catégorie de germes est fréquemment utilisée comme indicateur de la qualité microbiologique du procédé industriel (voir chapitre 1.2.3.1). Les Entérobactéries peuvent donc être utilisées dans le cadre de notre étude pour déterminer les P.C.M.. La flore de l'environnement de l'usine est principalement composée de flore lactique, de Pseudomonas et d'Entérobactéries, notamment en zone humide, les staphylocoques et les Entérocoques étant dans l'ensemble les populations de germes les moins représentées.

3 - RESULTATS

Les dénombrements effectués pour les trois campagnes de prélèvements sont présentés en annexes 1 (A1), 2 (A2) et 3 (B). Ils sont classés par local et par type de prélèvement.

3.1 - ETUDE DU SITE A : ELABORATION D'UNE METHODOLOGIE D'ETUDE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE D'UN ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL

3.1.1 - Evaluation de la fiabilité des techniques utilisées

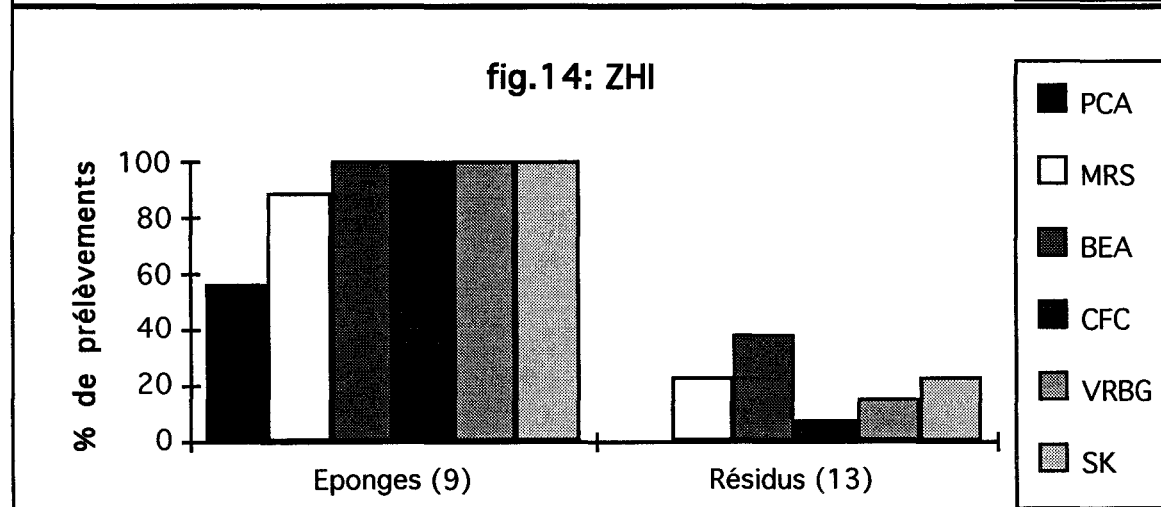
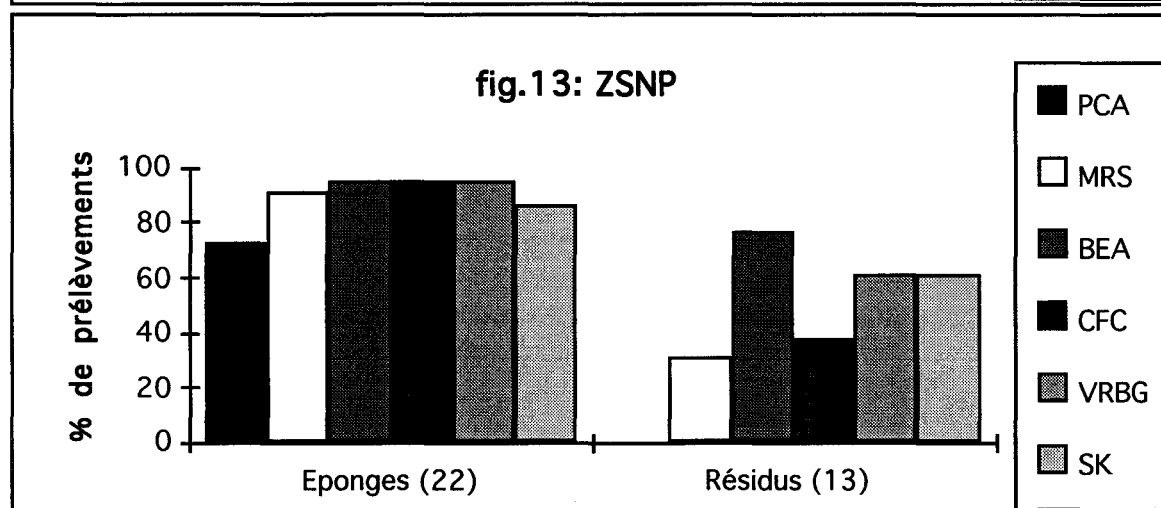
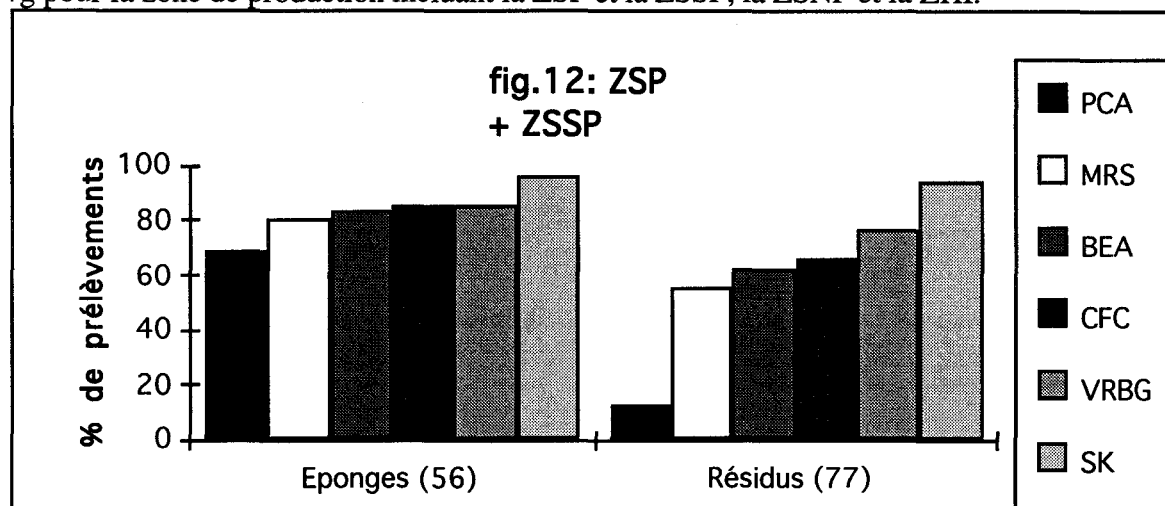
3.1.1.1 - Techniques de prélèvement

Les résultats des prélèvements d'air effectués lors de la campagne de prélèvements A1 indiquent des charges en G.A.M. pouvant atteindre 200 ufc/m³ en ZHI alors que la charge en zone sèche n'excède pas 60 ufc/m³. Par contre l'air s'est avéré exempt d'Entérobactéries. Pour ce type d'usine les prélèvements d'air ne semblent donc pas indiqués pour la surveillance de la qualité microbiologique de l'environnement en Entérobactéries, car ce type de germe n'y semble pas véhiculé par l'air.

Lors de la première campagne de prélèvements (A1) les géloses contact s'étaient avérées peu lisibles pour le P.C.A. et peu efficaces pour le V.R.B.G.. Quant aux écouvillons les dénombrements étaient presque toujours inférieurs au seuil de dilution pour l'ensemble des flores recherchées, sauf les G.A.M..

Lors de la deuxième campagne de prélèvements (A2) une étude comparative a été menée pour évaluer les efficacités de prélèvement respectives de l'éponge et de l'écouvillon. Après avoir rapporté l'ensemble des dénombrements à une surface standard de 25 cm², les résultats indiquent que 15 (79%) dénombrements obtenus à partir des prélèvements à l'éponge sont supérieurs à ceux obtenus à partir des prélèvements à l'écouvillon (tableau 3). Tous les prélèvements à l'éponge ont été positifs en G.A.M., alors que 7 (37%) écouvillons se sont avérés négatifs pour cette recherche aux seuils considérés.

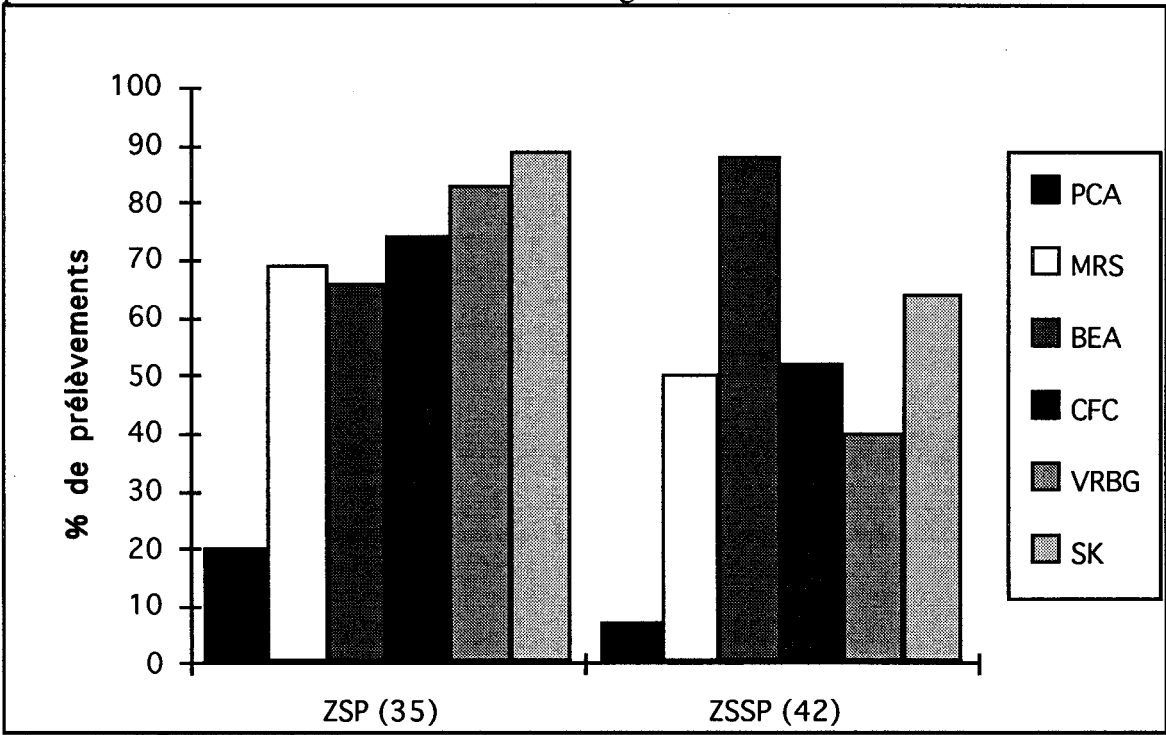
Figures 12, 13 et 14 : Proportions de prélèvements présentant des dénombrements <100 ufc/cm² ou /g pour la zone de production incluant la ZSP et la ZSSP, la ZSNP et la ZHI.



3.1.2.2 - Eléments de confirmation d'une modification de la sectorisation en zone protégée

La distinction au sein de la zone de production d'un ensemble de locaux à trafic de personnel élevé trouve sa justification dans l'étude des résidus, ces locaux présentant dans l'ensemble des charges microbiennes plus élevées que ceux à trafic de personnel restreint (figure 15).

Figure 15 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la proportion de prélèvements de résidus présentant un dénombrement inférieur à 100 ufc/g.



Pour l'étude plus spécifique des Entérobactéries et des coliformes réalisée lors de la deuxième campagne de prélèvements (A2), l'étude des ratios montre que les coliformes thermotolérants représentent une faible partie des Entérobactéries et des coliformes totaux (ratios inférieurs à 0.5 pour plus de 75% des prélèvements), et ces derniers représentent une part importante des Entérobactéries (ratios supérieurs à 0.5 pour 47% à 84% des prélèvements), quelle que soit la zone considérée (tableaux 11.1 et 11.2).

Une différence notable est observée pour le ratio C/E entre zone de production à fort trafic de personnel et zone de production à trafic de personnel restreint, la proportion de prélèvements présentant un ratio inférieur à 0.5 passant de 69% et 67% en ZSP à 43% et 50% en ZSSP.

Tableau 11.1: Proportions (%) de prélèvements par gamme de ratios, par zone et par mode de prélèvement après création d'une ZSSP.

	ZSP						ZSSP					
	C/E		T/E		T/C		C/E		T/E		T/C	
	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.
	(14)	(3)	(14)	(3)	(7)	(1)	(22)	(24)	(22)	(24)	(17)	(21)
> 0,8	23	33	14	0	14	0	38	33	9	0	12	0
0,8-0,5	8	0	0	0	0	0	19	17	0	0	0	9
< 0,5	69	67	86	100	86	100	43	50	91	100	88	91

Ep. : Eponges
Rés. : Résidus
E : Entérobactéries
C : Coliformes
T : Coliformes thermotolérants
(nombre de prélèvements)

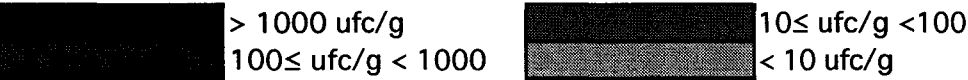
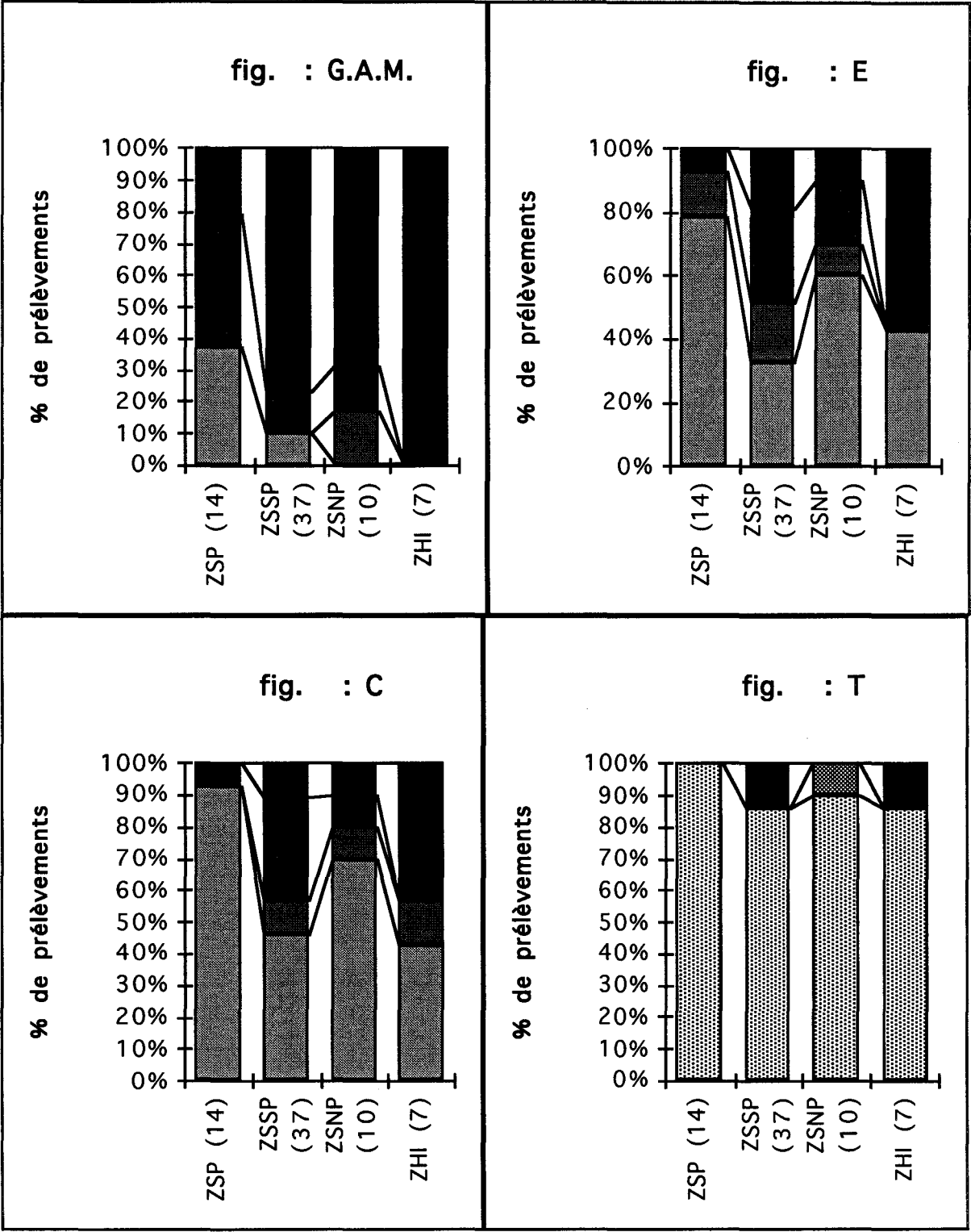
Tableau 11.2 - suite

	ZSNP						ZHI					
	C/E		T/E		T/C		C/E		T/E		T/C	
	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.	Ep.	Rés.
	(22)	(4)	(22)	(4)	(20)	(3)	(15)	(4)	(15)	(4)	(10)	(4)
> 0,8	63	25	14	0	15	0	40	75	14	25	20	25
0,8-0,5	21	25	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
< 0,5	16	50	86	100	85	100	40	25	86	75	80	75

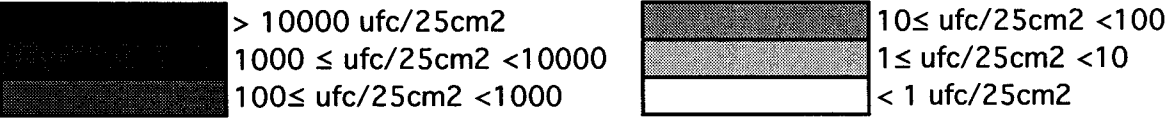
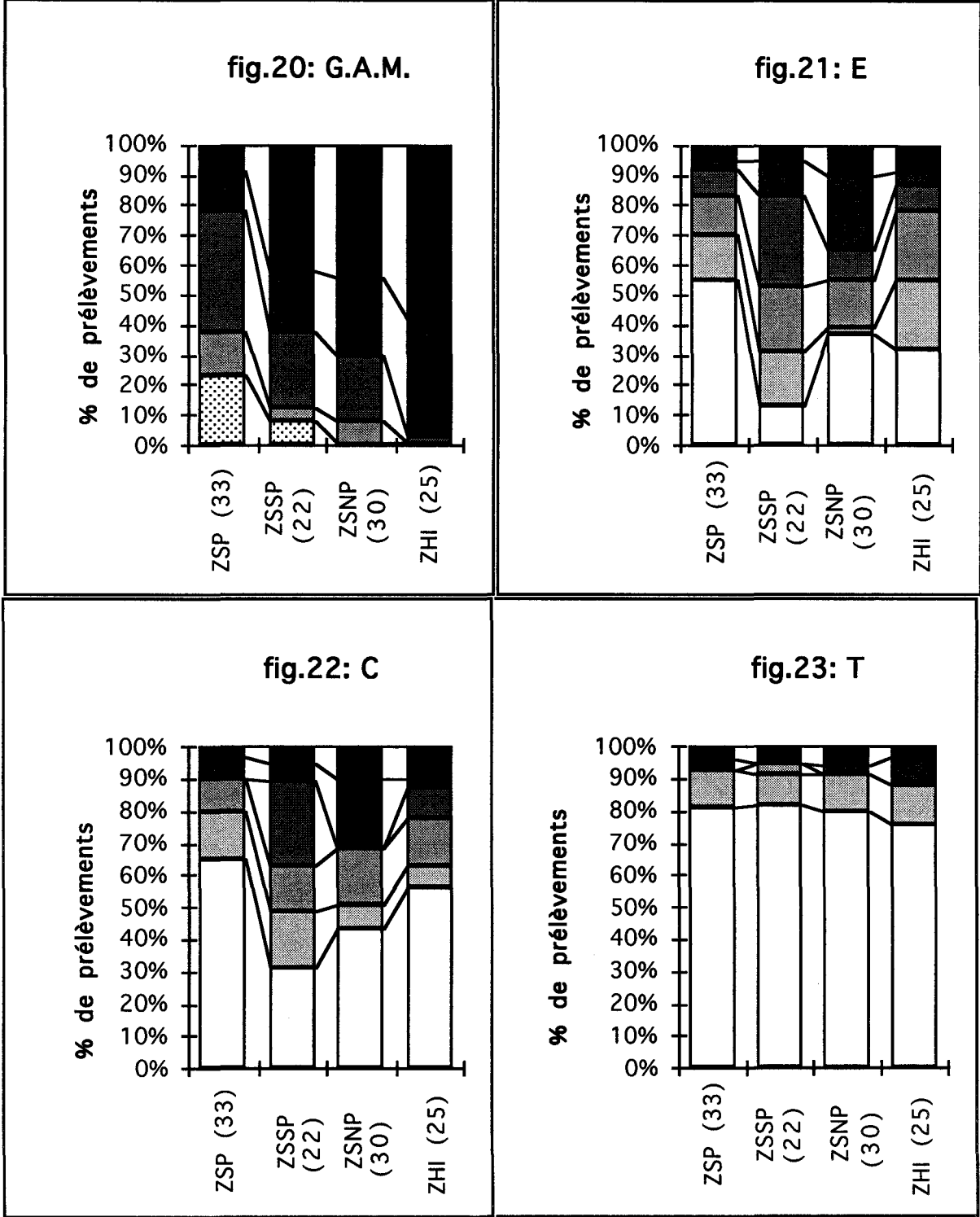
Plus de 70% des prélèvements de résidus ont présenté en ZSP les seuils de dénombrement < 1000 G.A.M./g et < 10 ufc/g en Entérobactéries, coliformes totaux et thermotolérants (figures 16, 17, 18 et 19), et plus de 50% des prélèvements à l'éponge ont présenté en ZSP les seuils de dénombrement < 1000 ufc/25cm² en G.A.M. et < 1 ufc/25cm² en Entérobactéries, coliformes totaux et thermotolérants (figures 20, 21, 22 et 23). L'observation de charges plus élevées en ZSSP qu'en ZSP pour les G.A.M., les Entérobactéries et les coliformes totaux est nette pour l'ensemble des seuils considérés. Les prélèvements de résidus effectués en zone humide présentent les charges microbiennes les plus élevées. Cette observation n'est confirmée que pour les G.A.M. pour les prélèvements de surfaces à l'éponge.

De même que pour l'étude globale de la flore microbienne effectuée lors de la campagne de prélèvements A1, il ressort de la deuxième campagne de prélèvements A2 que les tendances les plus nettes sont obtenues à partir des prélèvements de résidus, les observations observées à partir des prélèvements à l'éponge de surfaces manquant en général de cohérence.

Figures 16, 17, 18 et 19 : Réponse des seuils de dénombrement pour les prélèvements de résidus, par zone et par recherche.



Figures 20, 21, 22 et 23 : Réponse des seuils de dénombrement pour les prélèvements de surfaces à l'éponge, par zone et par recherche.



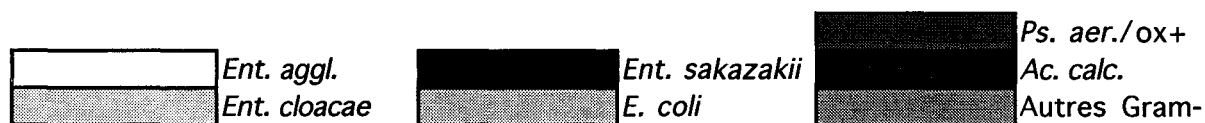
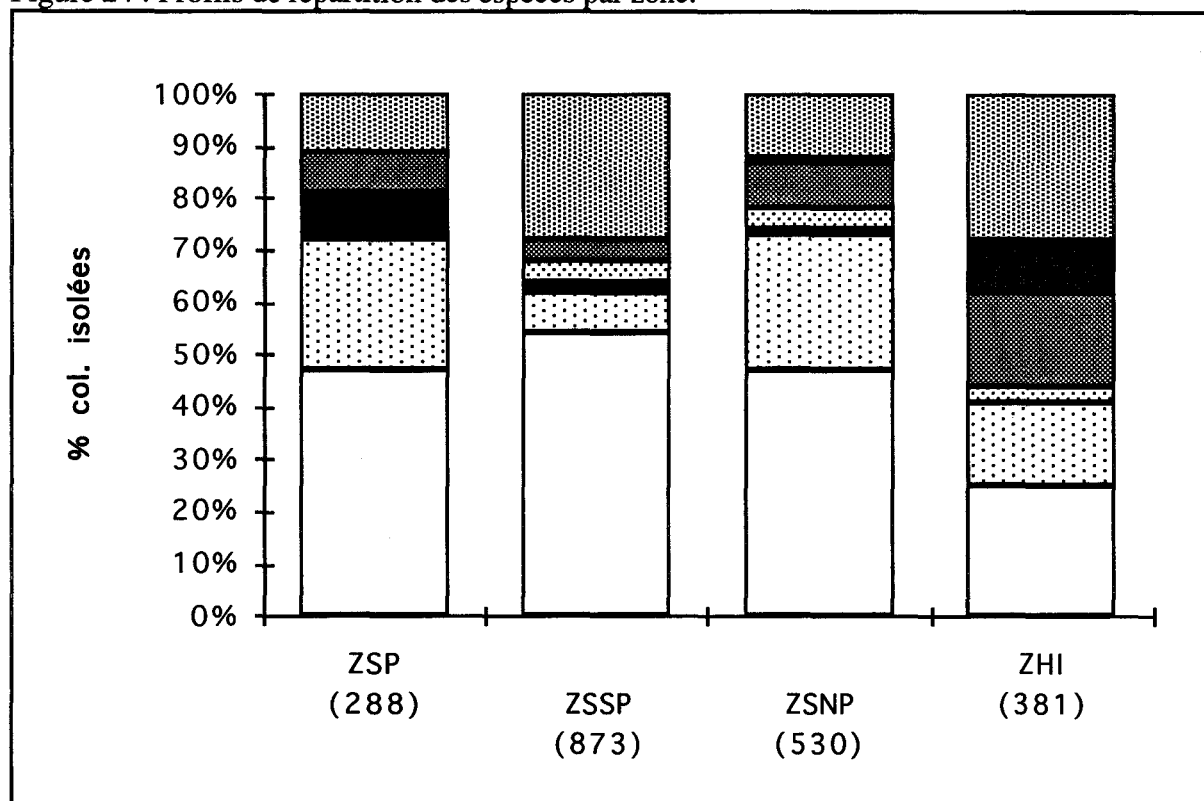
3.1.2.3 - Etude de la diversité sur les Entérobactéries: Observation de l'espèce *Enterobacter sakazakii* en zone protégée

Sur la base des résultats présentés en 3.1.1.4, l'analyse des identifications a été effectuée en nombre de colonies pour chaque zone (figure 24). La proportion d'*Enterobacter agglomerans* est plus forte en zone sèche (près de 50%) qu'en zone humide (25%) où les proportions sont élevées en *Pseudomonas aeruginosa* (20% en ZHI contre 5% à 10% en zone sèche) et en *Acinetobacter calcoaceticus* (10% en ZHI contre 0% en zone sèche).

Les identifications montrent une proportion plus faible d'*Enterobacter* en ZSSP qu'en ZSP (68% contre 82% en ZSP), et plus précisément d'*Enterobacter sakazakii* (4% en ZSSP contre 8% en ZSP) et d'*Enterobacter cloacae* (8% en ZSSP contre 24% en ZSP). L'espèce *Escherichia coli*, absente en ZSP, est trouvée en faibles proportions en ZSSP à un niveau sensiblement égal à ceux observés en ZSNP et en ZHI (3-5%).

A partir de ces identifications le risque microbiologique peut être restreint à l'espèce *Enterobacter sakazakii*, cette espèce étant plus susceptible de représenter un danger pour le consommateur de poudre de lait que l'espèce *Enterobacter cloacae* (voir chapitre 1.3 ; Simmons *et al.*, 1989). Outre la détermination des P.C.M. par la recherche des Entérobactéries, il apparaît donc nécessaire d'étudier précisément la répartition d'*Enterobacter sakazakii* en zone de production pour en contrôler la présence et en éviter la dispersion en zone de production. Quand à l'espèce *Escherichia coli*, son absence en zone de production protégée et sa faible présence dans les autres zones de l'usine en font un indicateur intéressant pour l'évaluation de la maîtrise de la qualité microbiologique de l'environnement.

Figure 24 : Profils de répartition des espèces par zone.



3.2 - ETUDE DU SITE B: FOCALISATION DE L'ETUDE ENVIRONNEMENTALE SUR LA ZONE PROTEGEE

Cette étude s'est appuyée sur les résultats obtenus sur le site B, sous différents aspects :

- les modalités de prélèvements ont été harmonisées, afin de pouvoir mener une analyse statistique de la répartition des germes étudiés et d'être en mesure de proposer des valeurs cibles.

- outre l'étude de la répartition des Entérobactéries utilisées comme indicateurs de la qualité microbiologique de l'environnement, l'intérêt a été porté sur l'espèce *Enterobacter sakazakii*, trouvée en zone de production sur le site A. A cette fin les identifications ont été focalisées sur les colonies provenant de milieu V.R.B.L. incubé 24 h à 44.5°C, le caractère thermotolérant de l'espèce *Enterobacter sakazakii* ayant été confirmé au cours de la campagne de prélèvements A2.

3.2.1 - Répartition statistique des flores étudiées

L'analyse statistique des dénombrements effectués à partir des prélèvements de surface a montré que dans l'ensemble, les locaux de la tour d'atomisation sont parmi les moins chargés en G.A.M., Entérobactéries et coliformes, sauf le 4e, le 5e et le local Post-sécheur (tableaux 12.1 et 12.2). Par contre les coliformes thermotolérants ont été principalement trouvés dans des locaux chauds (2e, 3e, 4e, 5e), ainsi que dans des endroits où les mesures d'hygiène sont moins strictes (sous-sol, stock rdc, 1er humide). Le local Post-sécheur, sans doute insuffisamment isolés du local humide au 1er, figure également parmi les locaux les plus chargés en coliformes thermotolérants. En général, les locaux annexes présentent des charges faibles en ces différents germes. En revanche, les charges du local où se trouve la buse sont parmi les plus élevées en Entérobactéries, coliformes totaux et thermotolérants. Le classement met en évidence que le bas de la cage d'escalier est plus chargé que le haut, sauf pour les coliformes thermotolérants, la partie d'escalier comprise entre le 1er et le 3e étant dans ce cas la plus chargée. Ce classement est fiable, les valeurs p étant inférieures à 0.0001.

Tableau 12.1 : Classement des locaux par rang croissant selon le test de Kruskal-Wallis (sols).

G.A.M. (p<0,0001)	Somme des rangs	Rang moyen	E (p<0,0001)	Somme des rangs	Rang moyen
2e annexe	104,5	20,9	2e annexe	50,0	10,0
5e	199,5	33,2	2e1/2 annexe	174,5	34,9
2e1/2 annexe	191,0	38,2	II	179,5	35,9
Albro	507,0	50,7	7e	463,0	46,3,0
3e	266,5	53,3	Stock totes	475,5	47,6
4e annexe	539,0	53,9	I	252,5	50,5
4e	167,0	55,7	4e annexe	547,0	54,7
5e1/2	229,0	57,2	Emballage	622,5	62,2
2e	316,5	63,3	Albro	646,0	64,6
Stock totes	638,5	63,8	5e1/2	270,0	67,5
7e	669,5	66,9	3e	406,0	81,2
II	336,5	67,3	2e	419,5	83,9
Emballage	694,5	69,4	Sous-sol	848,5	84,8
III	415,5	83,1	IV	443,5	88,7
Stock rdc	852,0	85,2	III	449,0	89,8
I	459,0	91,8	4e	287,0	95,7
IV	467,0	93,4	V	483,0	96,5
Post sécheur	958,0	95,8	Post sécheur	1001,0	100,1
Sous-sol	999,5	99,9	Stock rdc	1014,0	101,4
V	592,5	118,5	1er humide	571,0	114,2
1er humide	693,5	138,7	5e	693,0	115,5

I : escalier 7e -> 5e ; II : palier sous 5e -> 3e ; III : palier sous 3e -> 2e

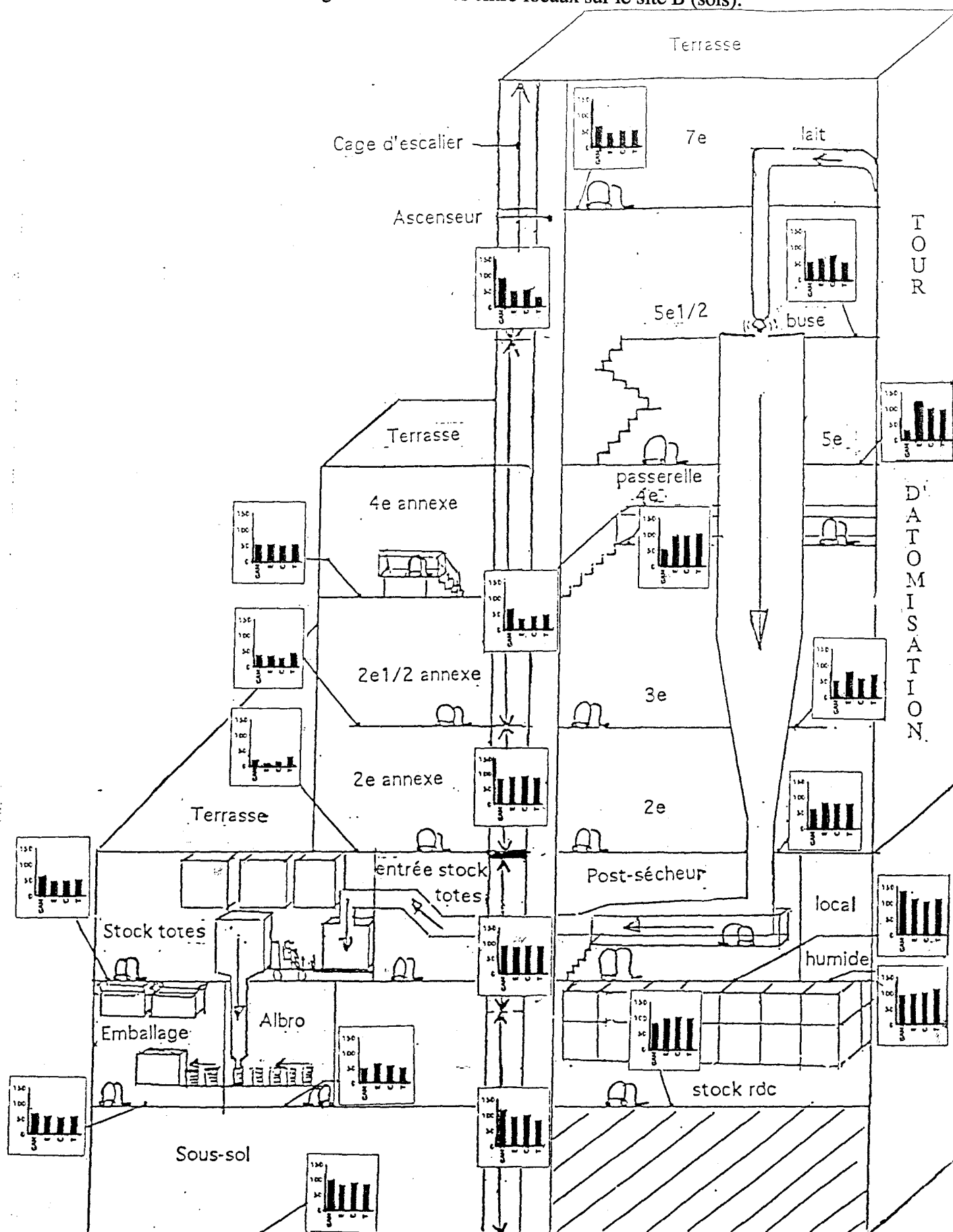
IV : palier sous 2e -> 1er palier sous 1er ; V : 2e palier sous 1er -> sous-sol

Tableau 12.2 - suite

C	Somme	Rang	T	Somme	Rang
(p<0,0001)	des rangs	moyen	(p<0,0001)	des rangs	moyen
2e annexe	77,5	15,5	2e annexe	157,5	31,5
2e1/2 annexe	148,0	29,6	I	157,5	31,5
II	218,0	43,6	2e1/2 annexe	224,0	44,8
Stock totes	488,5	48,8	Albro	490,5	49,0
4e annexe	516,5	51,6	II	245,5	49,1
7e	519,5	51,9	Stock totes	517,5	51,7
I	275,5	55,1	7e	523,0	52,3
Albro	568,0	56,8	4e annexe	555,5	55,6
Emballage	587,0	58,7	5e1/2	223,0	55,7
3e	303,0	60,6	Emballage	621,5	62,1
5e1/2	309,5	77,4	3e	369,5	73,9
2e	404,0	80,8	2e	407,5	81,5
Sous-sol	920,0	92,0	V	424,5	84,9
III	461,0	92,3	III	428,5	85,7
IV	475,0	95,0	Sous-sol	883,0	88,3
4e	293,5	97,8	IV	456,0	91,2
5e	602,5	100,4	5e	574,0	95,7
V	512,5	102,5	Stock rdc	1014,0	101,4
Post sécheur	1037,5	103,7	4e	312,5	104,2
Stock rdc	1045,5	104,6	1er humide	570,0	114,0
1er humide	533,0	106,6	Post sécheur	1141,0	114,1

Les charges microbiennes observées sur les sols des différents locaux de l'usine peuvent être visualisées sur le plan présenté en page suivante (figure 25).

Figure 25 : Comparaisons de charges microbiennes entre locaux sur le site B (sols).



G.A.M. : Germes Aérobie Mésophiles

E : Entérobactéries

C : Coliformes totaux

T : Coliformes thermotolérants

De même que pour les sols, les sacs d'aspirateurs se trouvant dans les locaux de la tour sont assez peu chargés en G.A.M., Entérobactéries et coliformes, sauf le 4e, le 7e, le local Post-sécheur au niveau du sol, et pour les G.A.M. le 4e annexe (tableaux 13.1 et 13.2). Concernant les coliformes thermotolérants, les locaux chauds (4e annexe, 4e, 5e) ainsi que les locaux du 1er présentent les charges les plus élevées. A l'exception du stock rdc, les locaux du 1er présentent des charges microbiennes supérieures à celles des locaux du rez-de-chaussée, sans doute en raison de la libre circulation des véhicules dans le Stock totos ainsi que de la présence d'un local humide. En général, les locaux annexes présentent des charges en ces différents germes très faibles. Ce classement est fiable, les valeurs p étant données inférieures à 0.0001. Les charges microbiennes observées dans le contenu des sacs d'aspirateurs des différents locaux de l'usine peuvent être visualisées sur la figure 26.

La répartition de *Enterobacter sakazakii* dans les différents locaux de l'usine peut être visualisée sur la figure 27, les graphes s'y trouvant ayant été réalisés de la même manière que pour les figures 25 et 26 à partir des rangs trouvés à l'aide du test de Kruskal-Wallis, avec des valeurs p inférieures à 0.0001.

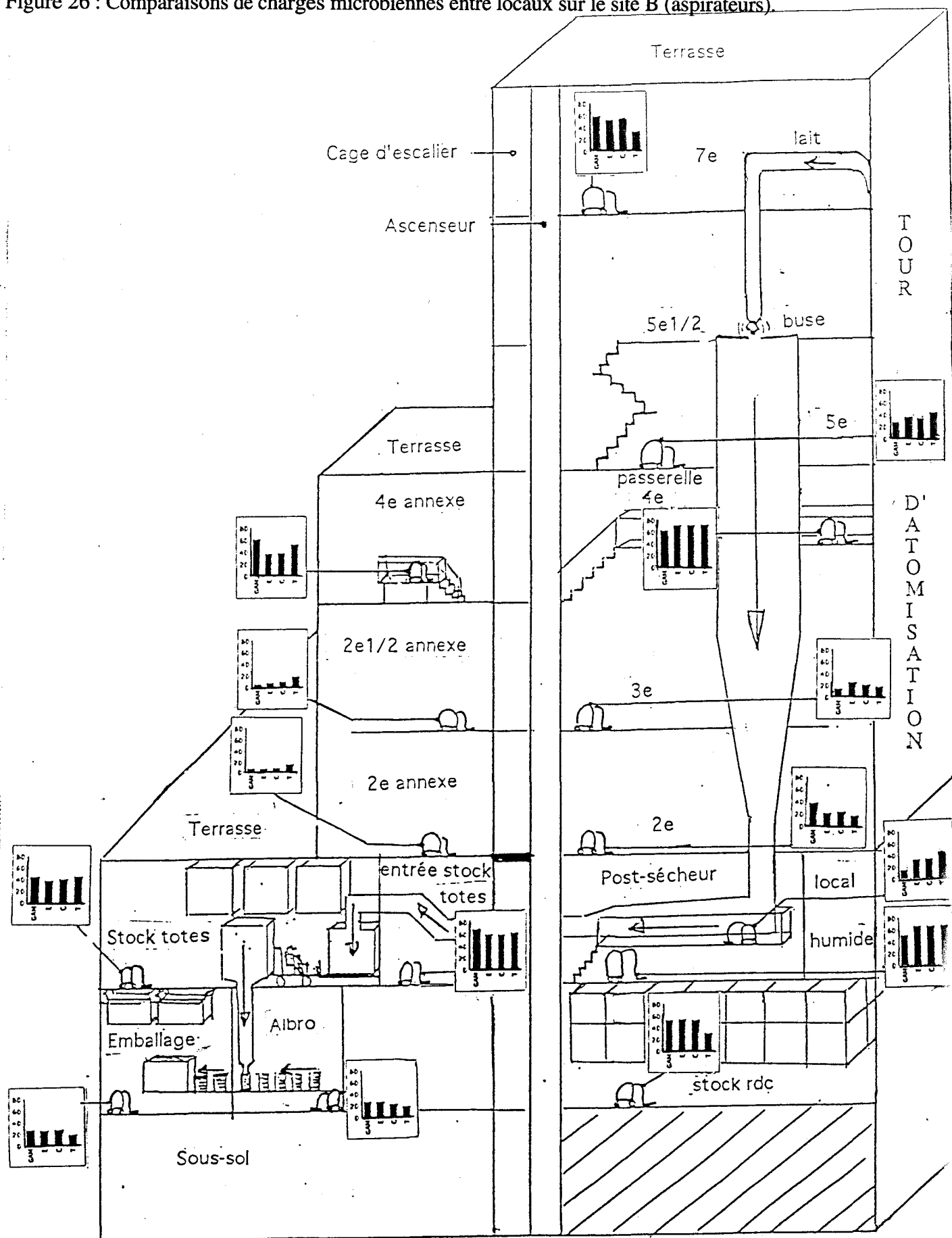
Tableau 13.1 : Classement des locaux par rang croissant selon le test de Kruskal-Wallis (aspirateurs).

G.A.M. (p<0,0001)	Somme des rangs	Rang moyen	E (p<0,0001)	Somme des rangs	Rang moyen
2e annexe	28,0	5,6	2e annexe	40,0	8,0
2e1/2 annexe	39,5	7,9	2e1/2 annexe	40,0	8,0
3e	73,5	14,7	2e	114,0	22,8
Post sécheur passerelle	77,0	15,4	3e	129,0	25,8
Albro	133,0	26,6	Albro	131,0	26,2
Emballage	136,5	27,3	Emballage	131,0	26,2
5e	143,5	28,7	Post sécheur passerelle	164,0	32,8
2e	195,5	39,1	5e	185,0	37,0
Stock totes au fond	224,5	44,9	4e annexe	188,0	37,6
Post sécheur	260,0	52,0	Stock totes au fond	192,5	38,5
Stock rdc	267,0	53,4	7e	266,5	53,3
7e	298,5	59,7	Stock rdc	273,5	54,7
4e annexe	311,0	62,2	Entrée Stock totes	302,0	60,4
4e	315,5	63,1	Post sécheur	334,5	66,9
Entrée Stock totes	347,0	69,4	4e	359,0	71,8

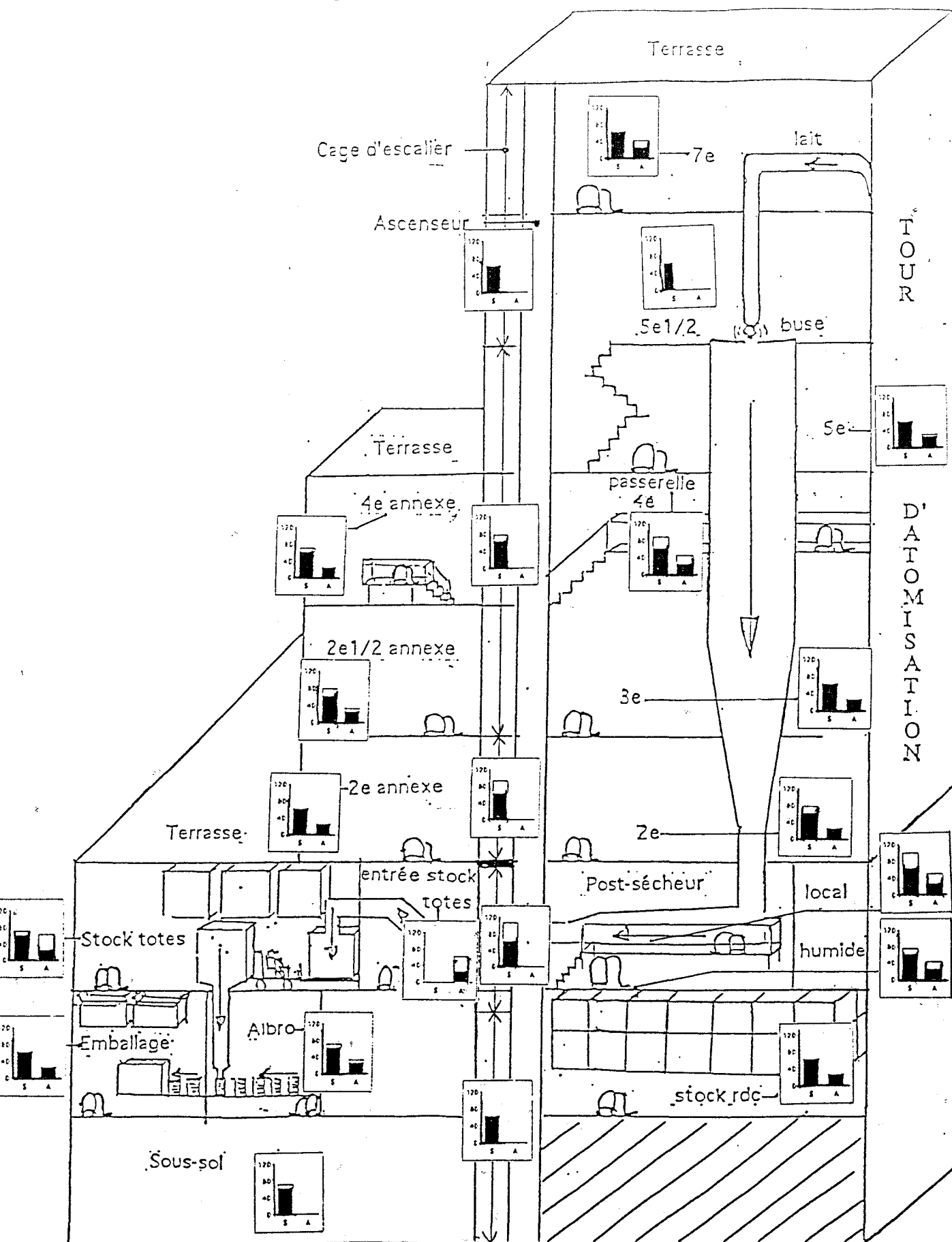
Tableau 13.2 - suite

C (p<0,0001)	Somme des rangs	Rang moyen	T (p<0,0001)	Somme des rangs	Rang moyen
2e annexe	50,0	10,0	2e annexe	92,5	18,5
2e1/2 annexe	50,0	10,0	2e1/2 annexe	92,5	18,5
3e	107,0	21,4	2e	92,5	18,5
Albro	112,5	22,5	3e	92,5	18,5
2e	123,5	24,7	Albro	92,5	18,5
Emballage	137,0	27,4	Emballage	118,0	23,6
Post sécheur passerelle	169,0	33,8	Stock rdc	155,5	31,1
5e	173,5	34,7	7e	163,0	32,6
4e annexe	193,0	38,6	5e	221,0	44,2
Stock totes au fond	208	41,6	Post sécheur passerelle	223,5	44,7
7e	267,5	53,5	Stock totes au fond	229,5	45,9
Stock rdc	267,5	53,5	4e annexe	265,0	53,0
Entrée Stock totes	299,0	59,8	Entrée Stock totes	315,0	63
Post sécheur	333,0	66,6	Post sécheur	336,5	67,3
4e	359,5	71,9	4e	360,5	72,1

Figure 26 : Comparaisons de charges microbiennes entre locaux sur le site B (aspirateurs).



G.A.M. : Germes Aérobie Mésophiles
 E : Entérobactéries
 C : Coliformes totaux
 T : Coliformes thermotolérants

Figure 27 : Comparaison des charges en *Enterobacter sakazakii* entre locaux sur le site B

3.2.2 - Propositions de valeurs de référence

3.2.2.1 - Critères analytiques

Cette étude a montré comme sur le site A que les Entérobactéries sont essentiellement des coliformes, et que les coliformes thermotolérants sont minoritaires :

- les ratios T/E et T/C inférieurs à 0.5 représentent plus de 60% des prélèvements,
- les ratios C/E supérieurs à 0.5 représentant entre 62% et 80% des prélèvements (tableau 14).

Les coliformes thermotolérants recherchés à partir des prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs représentent une plus forte proportion des Entérobactéries et des coliformes en ZSP qu'en ZSSP, les ratios T/E et T/C inférieurs à 0.5 représentant respectivement 60% et 54% des prélèvements en ZSP, 100% et 90% en ZSSP.

Les températures élevées trouvées dans la tour d'atomisation (jusqu'à 60°C) semblent donc favoriser les coliformes thermotolérants par rapport aux autres Entérobactéries. Cette observation était prévisible, mais elle semble impliquer la non-utilisation des coliformes thermotolérants comme indicateurs de mauvaises pratiques dans les locaux de la tour d'atomisation, leur présence n'y étant pas liée aux pratiques mais aux températures élevées de l'environnement. Par contre les ratios observés dans la tour d'atomisation seraient inacceptables en zone de conditionnement, les coliformes thermotolérants y étant naturellement peu présents. Cela signifierait nécessairement une mauvaise pratique ayant amené une contamination fécale par des germes comme *Escherichia coli*.

Tableau 14 : Proportions (%) de prélèvements par gamme de ratios, par zone et par mode de prélèvement après création d'une ZSSP.

	Zone sèche protégée						Zone sèche semi-protégée					
	C/E		T/E		T/C		C/E		T/E		T/C	
	Sols (66)	Aspi. (40)	Sols (66)	Aspi. (40)	Sols (62)	Aspi. (37)	Sols (56)	Aspi (20)	Sols (56)	Aspi. (20)	Sols (54)	Aspi. (20)
> 0,8	62	80	14	22	26	32	79	80	16	0	28	5
0,5-0,8	21	12	9	18	10	14	7	0	9	0	7	5
< 0,5	17	8	77	60	64	54	14	20	75	100	65	90

Aspi. : Aspirateurs
E : Entérobactéries
C : Coliformes
T : Coliformes thermotolérants
(nombre de prélèvements)

Pour les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs, les seuils de dénombrement majoritairement observés sont les suivants :

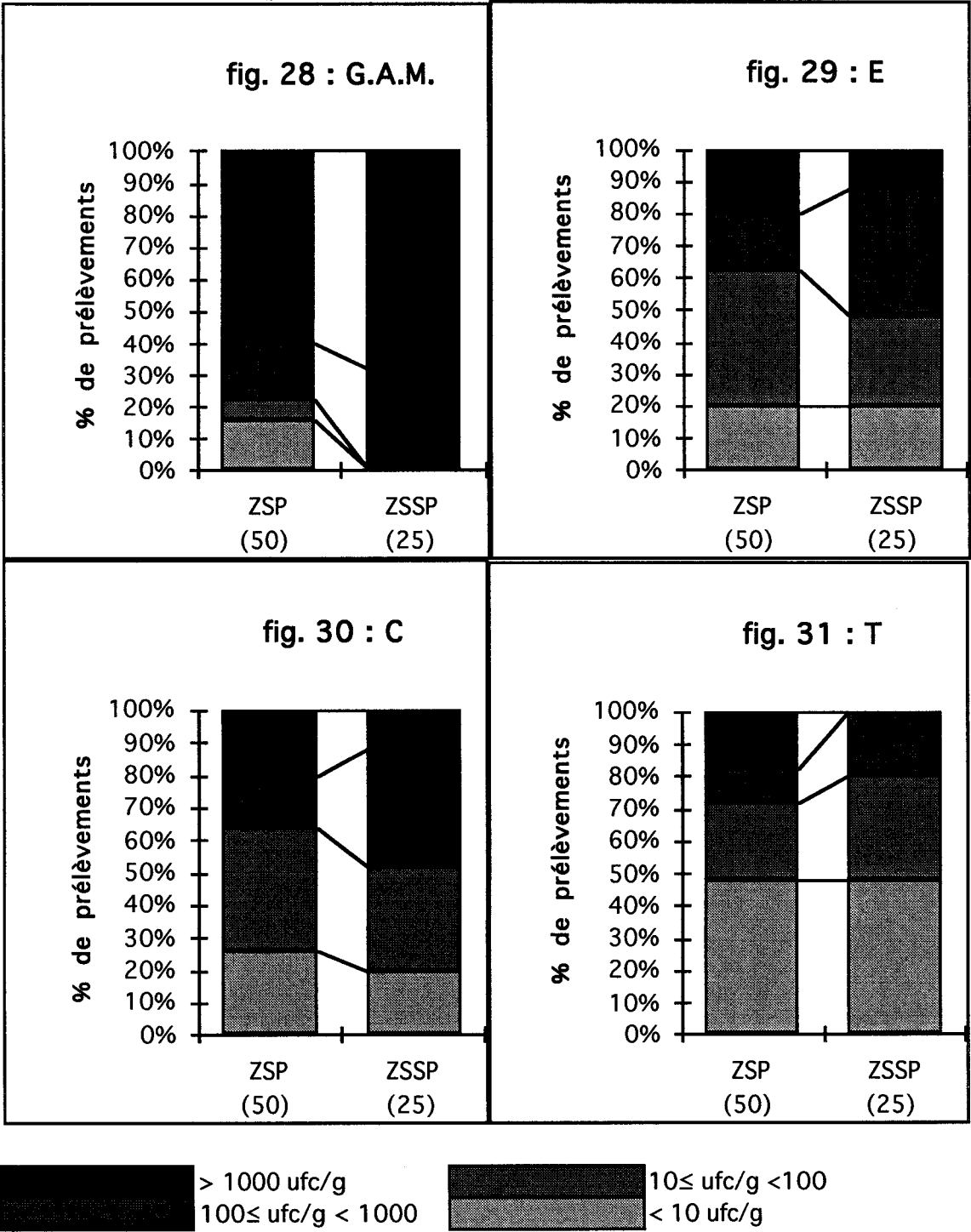
- de < 10000 G.A.M./g à < 100000 G.A.M./g (plus de 80% des prélèvements), la ZSSP étant un peu plus chargée que la ZSP (figure 28).
- < 1000 ufc/g en Entérobactéries et coliformes (plus de 80% des prélèvements) (figures 29 et 30).
- < 100 ufc/g en coliformes thermotolérants (plus de 70% des prélèvements) (figure 31).

Pour les prélèvements à l'éponge, les seuils de dénombrement majoritairement observés sont les suivants :

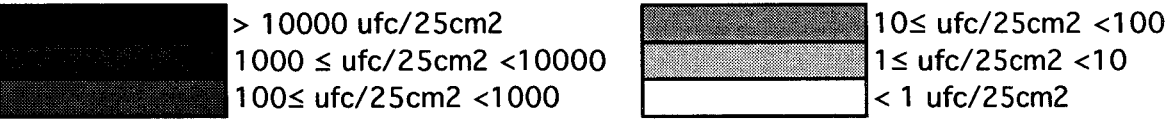
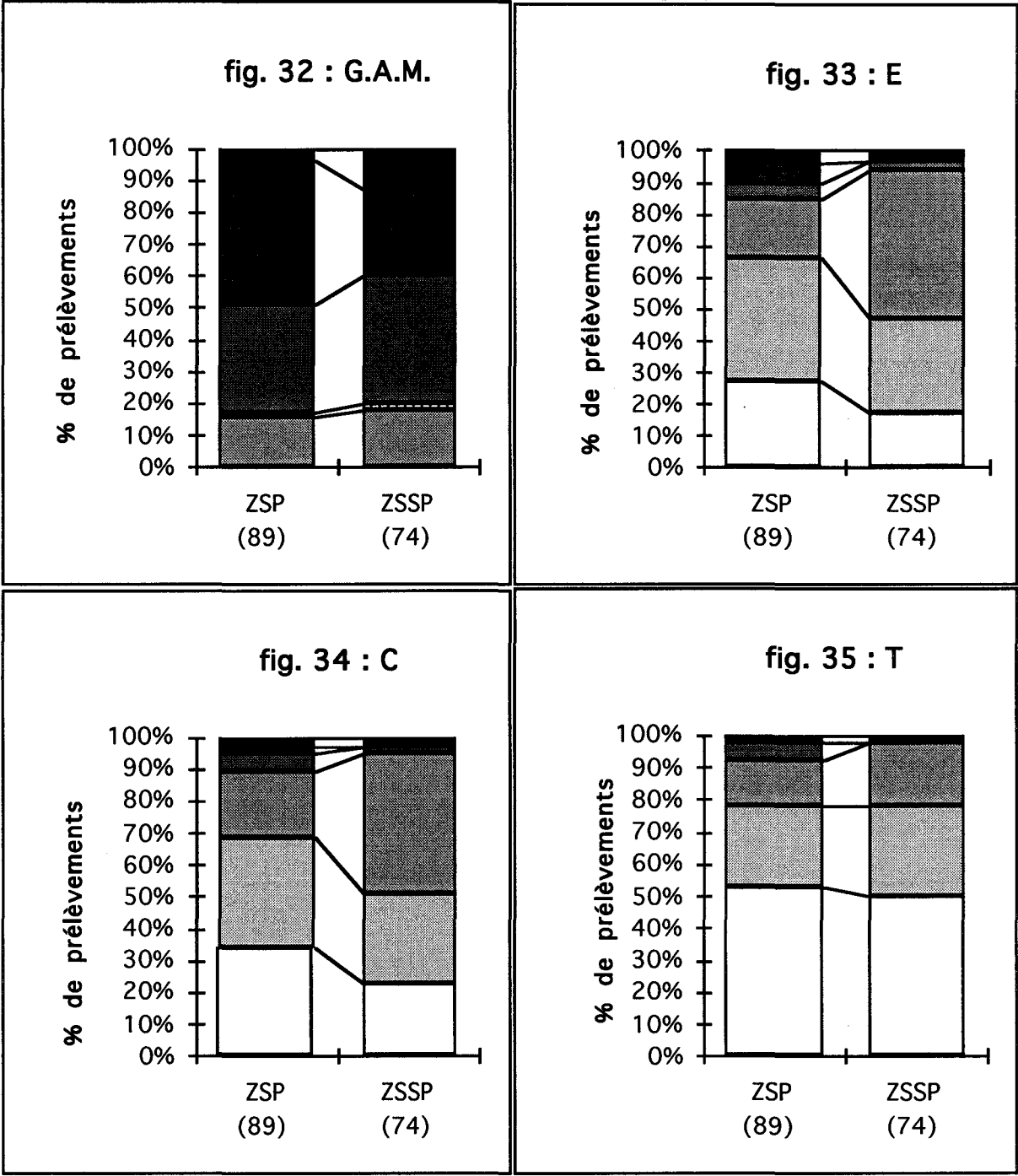
- < 10000 G.A.M./ 25cm^2 (près de 90% des prélèvements) (figure 32).
- < 100 ufc/ 25cm^2 en Entérobactéries et coliformes (près de 90% des prélèvements) (figures 33 et 34).
- < 10 ufc/ 25cm^2 en coliformes thermotolérants (près de 80% des prélèvements) (figure 35).

On peut proposer ces valeurs comme critères analytiques, avec 80% à 90% des dénombrements qui ne dépassent pas ces seuils.

Figures 28, 29, 30 et 31 : Incidence de la création d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement pour les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs.



Figures 32, 33, 34 et 35 : Incidence de la définition d'une ZSSP sur la réponse des seuils de dénombrement pour les prélèvements de surfaces de sols à l'éponge.



3.2.2.2 - Critères indicatifs

L'étude des dénombrements en *Enterobacter sakazakii* a montré des niveaux de dénombrement élevés dans l'aspirateur ($1,1.10^3$ ufc/g) et sur le sol (60 ufc/ 25cm^2) de la passerelle au 4e, dans l'aspirateur au sol (280 ufc/g) et sur la passerelle (110 ufc/g) ainsi que sur le sol sous la passerelle au fond à droite (50 ufc/ 25cm^2) au local Post-sécheur, et dans l'aspirateur du local entrée stock totes (290 ufc/g) (tableau 15).

Tableau 15 : Localisation et dénombrement d'*Enterobacter sakazakii* à partir du milieu VRBL incubé 24 h à 44.5°C .

Local	Type de prélèvement	Lieu	Dénombrement
7e	Aspirateur	local	10/g, 20/g
5e	Aspirateur	local	10/g
4e	Aspirateur	local	11000/g, 4000/g
	Sol	au fond passerelle	$60/25\text{cm}^2$
		local annexe, 2 marche vers passerelle	$1/25\text{cm}^2$
Escalier	Sol	palier devant local annexe 4e	$1/25\text{cm}^2$
		rebord marche 2e palier sous 3e	$2/25\text{cm}^2$
		rebord marche 3e palier sous 3e	$6/25\text{cm}^2$
2e1/2	Sol	local annexe, coin au fond à droite	$4/25\text{cm}^2$
	Aspirateur	local	2/g (1)
2e	Sol	passerelle	$3/25\text{cm}^2$
Escalier	Sol	rebord marche en haut palier 2e	$5/25\text{cm}^2$
		rebord marche, 1er palier sous 2e	$6/25\text{cm}^2$
Post sécheur	Sol	1er palier passerelle	$2/25\text{cm}^2$
		passerelle supérieure côté opposé	$3/25\text{cm}^2$
		sous passerelle vers le fond à droite	$50/25\text{cm}^2$
	Aspirateur	sur la passerelle	110/g, 7/g, 15/g
		sur le sol	280/g, 10/g
Stock totes	Aspirateur	local entrée	210/g, 110/g, 290/g, 250/g
		au fond	20/g, 20/g, 10/g, 30/g, 13/g
	Sol	au fond à droite devant autre atelier	$11/25\text{cm}^2$
Albro	Aspirateur	local	2/g (1)
Escalier	Sol	rebord marche 1er palier sous 1er	$1/25\text{cm}^2$
Sous-sol	Sol	interface côté véhicules, 5m	$1/25\text{cm}^2$

(1) après enrichissement sur eau peptonée tamponnée 24h à 37°C

En termes de prélèvements positifs en *Enterobacter sakazakii*, l'efficacité des prélèvements de sols à l'aide d'éponges est de 10% (15/143). Par contre 29% (22/75) des prélèvements d'aspirateurs sont positifs en *Enterobacter sakazakii*, ces prélèvements appartenant à 60% des 15 aspirateurs contrôlés.

Lorsque l'espèce *Enterobacter sakazakii* est identifiée, elle est en général majoritaire. En effet, les moyennes des proportions respectives des germes identifiés dans les prélèvements contenant *Enterobacter sakazakii* sont de 58% pour *Enterobacter sakazakii*, 12% pour *Serratia plymuthica*, 8% pour *Enterobacter agglomerans*, 5% pour *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* et 17% pour d'autres germes à Gram négatif. Il convient de souligner que 35% des prélèvements présentant *Enterobacter sakazakii* ne contenaient pas d'autre germe.

A partir de ces observations les critères indicatifs suivants peuvent être retenus pour la zone de production :

- < 10/g dans les aspirateurs à raison d'un minimum de trois prélèvements par aspirateur et de 5 colonies identifiées par prélèvement à partir du milieu VRBL incubé 24 h à 44.5°C.

- < 20/25cm² sur les sols à partir d'un prélèvement à l'éponge et d'un minimum de 5 colonies identifiées par prélèvement incubé 24 h à 44.5°C.

Ces valeurs, ainsi que les seuils majoritairement observés pour les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs et de surfaces de sols à l'éponge, n'ont pas le caractère impératif des critères obligatoires, mais leur dépassement net et répété pourrait signifier une mauvaise maîtrise de la qualité microbiologique de l'environnement, et en particulier une déficience dans le contrôle de la présence de l'espèce *Enterobacter sakazakii*. Il conviendrait alors d'appliquer certaines mesures correctives touchant notamment à la fréquence des nettoyages et du changement de sacs d'aspirateurs, et éventuellement de réviser les pratiques de nettoyage, notamment à l'intérieur de l'égron à partir de la passerelle du 4e ainsi qu'à l'intérieur du post-sécheur.

3.2.3 - Etude de la diversité sur les coliformes thermotolérants

Pour les sols on observe les proportions suivantes (figure 36) :

- environ 30% des colonies ont été identifiées comme *Enterobacter agglomerans*,
- environ 15% ont été identifiées comme *Enterobacter cloacae*,

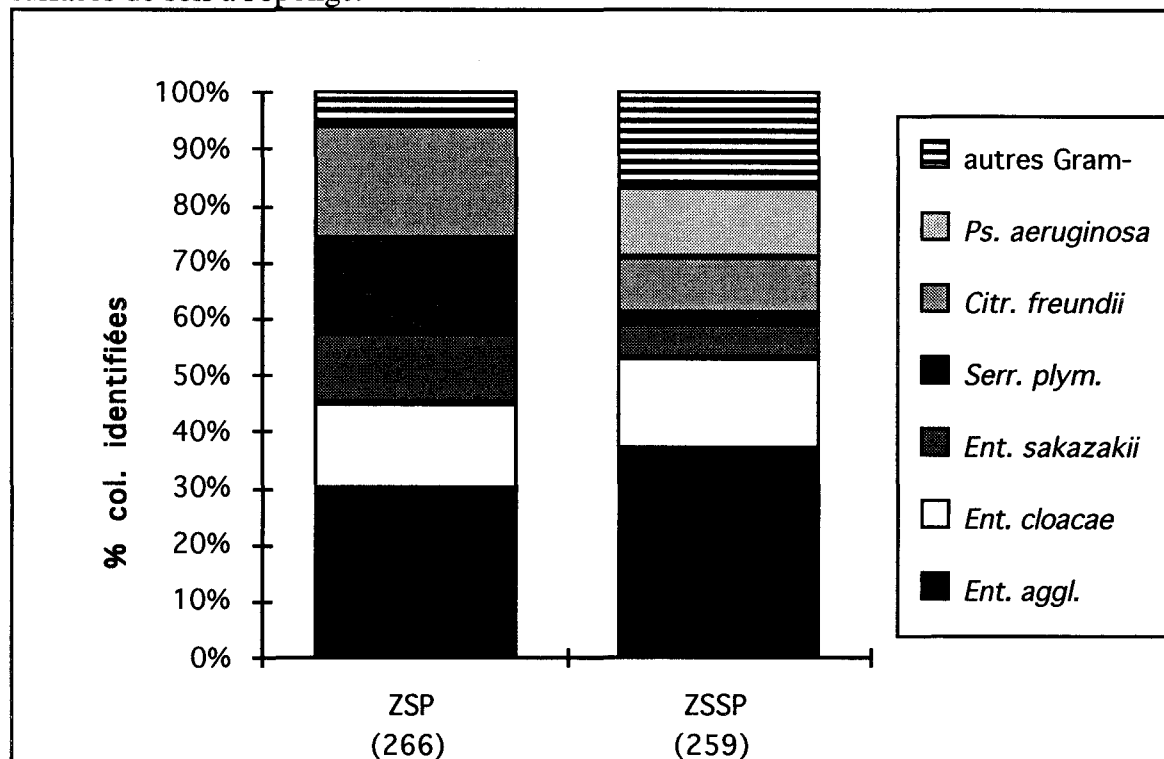
Des proportions plus faibles en ZSSP qu'en ZSP sont observées pour les espèces suivantes :

- *Enterobacter sakazakii* (4% en ZSSP contre 10% en ZSP),
- *Serratia plymuthica* (2% en ZSSP contre 15% en ZSP),
- *Citrobacter freundii* (10% en ZSSP contre 20% en ZSP).

Quand à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, non observée en ZSP, elle présente en ZSSP une proportion de 12% .

On observe donc que le genre *Enterobacter* représente environ 60% des colonies thermotolérantes identifiées à partir des prélèvements de surfaces à l'éponge.

Figure 36 : Proportions des différentes espèces identifiées avec une ZSSP pour les prélèvements de surfaces de sols à l'éponge.



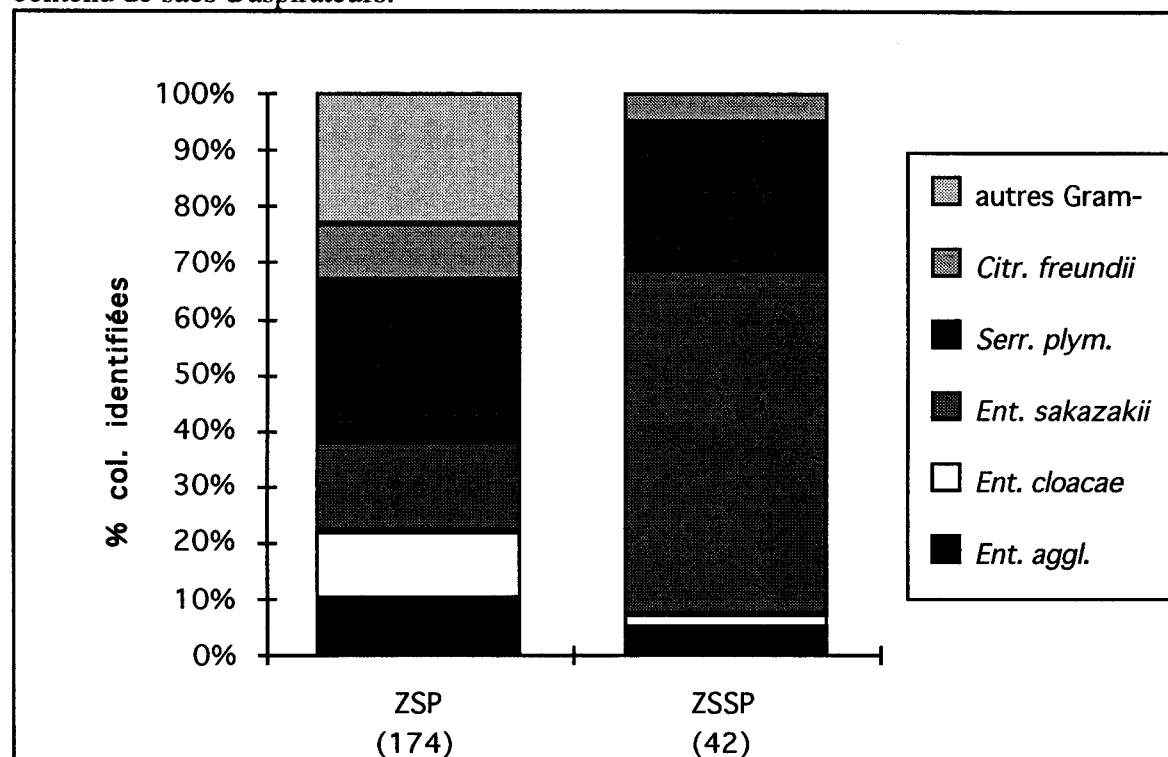
Pour les aspirateurs on constate des proportions plus faibles en ZSSP qu'en ZSP pour les espèces suivantes (figure 37) :

- *Enterobacter agglomerans* (3% en ZSSP contre 10% en ZSP),
- *Enterobacter cloacae* (2% en ZSSP contre 12% en ZSP).

Par contre une proportion très élevée en *Enterobacter sakazakii* est observée en ZSSP (60% contre 16% en ZSP).

Quand à l'espèce *Serratia plymuthica*, elle représente environ 25% des colonies identifiées.

Figure 37 : Proportions des différentes espèces identifiées avec une ZSSP pour les prélèvements du contenu de sacs d'aspirateurs.



Il ressort de ces résultats que les sols sont plus chargés que les aspirateurs en *Enterobacter agglomerans*, alors que les aspirateurs sont plus chargés que les sols en *Enterobacter sakazakii* et en *Serratia plymuthica*. Globalement le genre majoritairement observé est *Enterobacter* (40% à 70% des colonies thermotolérantes identifiées).

3.3 - CARACTERISATION DE SOUCHES D'*ENTEROBACTER SAKAZAKII* EN RELATION AVEC L'ENVIRONNEMENT

3.3.1 - Répartition des profils VITEK en usine

La cage d'escalier semble véhiculer l'espèce *Enterobacter sakazakii* dans les locaux adjacents, la plupart des profils VITEK se retrouvant au même niveau géographique pour les locaux et la cage d'escalier (tableaux 16.1 et 16.2). C'est notamment le cas pour les profils 3221750372, 3321754362 et 3321750372, observés au niveau du local annexe 2e1/2 et dans la cage d'escalier entre le 2e et le 3e. On observe cependant que l'ensemble des profils dominants se retrouve au local Post-sécheur et au stock totes, c'est-à-dire au niveau du 1er étage.

Les distinctions observées entre profils ont essentiellement trait aux tests Indoxyl- β -D-Glucoside (2e chiffre en 2 ou 3), Inositol (7e chiffre en 0 ou 4), Arginine (9e chiffre en 6 ou 7) et Ornithine (10e chiffre en 0 ou 2). On observe que 52% (55/106) des souches présentent un profil Inositol positif, 56% (59/106) présentent un profil Indoxyl- β -D-Glucoside positif, 61% (65/106) présentent un profil Arginine positif, et 87% (92/106) présentent un profil Ornithine positif. Si l'on occulte le test Indoxyl- β -D-Glucoside, on observe deux grands groupes de profils: 39% (42/106) des souches présentent un profil Inositol positif/Arginine négatif, et 48% (51/106) présentent un profil Inositol négatif/Arginine positif.

Ces caractéristiques biochimiques peuvent être spécifiques d'une provenance industrielle, et plus précisément de l'environnement d'une tour d'atomisation. Cependant la finalité de cette technique est avant tout d'obtenir une identification fiable et rapide, mais on ne peut associer un profil VITEK spécifiquement à un local ou à un groupe restreint de locaux. La caractérisation de souches doit donc être menée à l'aide de techniques dont le pouvoir discriminant a déjà été éprouvé, comme la ribotypie ou, comme nous le verrons plus loin, l'analyse des acides gras membranaire par C.P.G..

Tableau 16.1 : Localisation des profils VITEK d'*Enterobacter sakazakii*.

Profil VITEK	Local	Nombre et type de prélèvements positifs	Total de prélèvements positifs/type/profil	Nombre de souches/profil
3221750372	3e palier sous 3e	1 sol	4 sols/7 prélèvements de 5 aspirateurs	30
	en haut palier 2e	1 sol		
	local annexe 2e1/2	1 sol		
	1er palier sous 2e	1 sol		
	post sécheur	1 aspirateur sur la passerelle		
		1 aspirateur au sol		
	local entrée stock totes	3 dans 1 aspirateur		
	stock totes	3 sols 2 dans 1 aspirateur		
3321754362	5e	1 aspirateur	5 sols/5 prélèvements de 5 aspirateurs	26
	4e	1 aspirateur		
	2e palier sous 3e	1 sol		
	local annexe 2e1/2	1 aspirateur		
	passerelle 2e	1 sol		
	post sécheur	2 sols		
		1 aspirateur au sol		
	stock totes	1 sol 1 aspirateur		
3321750372	3e palier sous 3e	1 sol	4 sols/6 prélèvements de 3 aspirateurs	18
	local annexe 2e1/2	1 sol		
	en haut palier 2e	1 sol		
	1er palier sous 2e	1 sol		
	post sécheur	1 aspirateur au sol		
	local entrée stock totes	2 dans 1 aspirateur		
	stock totes	3 dans 1 aspirateur		

Tableau 16.2 - suite

Profil VITEK	Local	Nombre et type de prélèvements positifs	Total de prélèvements positifs/type /profil	Nombre de souches /profil
3221754362	4e	1 sol	7 sols/3 prélèvements	15
		1 aspirateur	de 3 aspirateurs	
	local annexe 4e	1 sol		
	2e	1 sol		
	post sécheur	2 sols		
	stock totes	1 sol		
		1 aspirateur		
	albro	1 aspirateur		
	sous-sol	1 sol		
3321754370	7e	2 dans 1 aspirateur	3 sols/ 6 prélèvements	12
	post sécheur	1 sol	de 4 aspirateurs	
		1 aspirateur au sol		
	stock totes	1 aspirateur		
	local entrée stock totes.	2 dans 1 aspirateur		
	2e palier sous 3e	1 sol		
	1er palier sous 1er	1 sol		
3321754762	4e	1 aspirateur	1 prélèvement d'1 aspirateur	1
3221750370	4e	1 sol	1 sol	1
3331750372	4e	1 sol	1 sol	1
3321650372	3e palier sous 3e	1 sol	1 sol	1
3231754372	post sécheur	1 aspirateur sur la passerelle	1 prélèvement d'1 aspirateur	1
7321754370	stock totes	1 aspirateur	1 prélèvement d'1 aspirateur	1

3.3.2 - Répartition des profils de ribotypie en usine

Les ribotypages réalisés à Campden sur 20 souches montrent pour les 18 souches provenant du site B des regroupements géographiques concernant certains ribogroupes (tableau 17), notamment le ribogroupe 10005 qui est observé majoritairement au stock totes (3 souches sur 4), et le ribogroupe 10006 qui n'a été observé qu'au niveau du 2e.

Pour l'ensemble des 20 souches étudiées on a observé une réponse inositol constante par ribogroupe, les ribogroupes inositol positif correspondant plutôt à des souches provenant de locaux se trouvant dans la tour d'atomisation, et les ribogroupes inositol négatif correspondant plutôt à des souches provenant des locaux se trouvant au niveau du 1er étage (Post-sécheur, stock totes).

Les souches provenant de l'usine A sont d'un autre ribogroupe (10022) que celles trouvées sur le site B, ce qui laisse supposer que l'on puisse déterminer l'usine d'origine d'une souche par cette méthode. Cependant ces observations demandent à être corroborées par de plus amples analyses, le nombre de souches traitées étant faible.

Tableau 17 : Classement de souches d'*Enterobacter sakazakii* par ribogroupe (A2 +B).

Lieu	Type de prélèvement	Ribogroupe	Inositol
2e, passerelle près du ventilateur	Sol	10001	positif
4e annexe, entrée passerelle	Sol	10001	positif
2e1/2 annexe	Aspirateur	10001	positif
Albro	Aspirateur	10001	positif
Stock totes devant porte	Sol	10011	positif
5e	Aspirateur	10011	positif
4e	Aspirateur	10011	positif
Stock totes au fond	Aspirateur	10011	positif
2e palier sous 3e	Sol	2847	positif
Post-sécheur, palier passerelle	Sol	2847	positif
1er palier sous 1er	Sol	2847	positif
7e	Aspirateur	2847	positif
2e1/2 annexe, coin au fond	Sol	10005	négatif
Entrée stock totes	Aspirateur	10005	négatif
Stock totes au fond	Aspirateur	10005	négatif
Stock totes au fond	Aspirateur	10005	négatif
Palier en haut escalier 2e	Sol	10006	négatif
1er palier sous 2e	Sol	10006	négatif
Post-sécheur, bouche d'égoût (C2)	Eponge	10022	négatif
Ascenseur, au centre (C2)	Résidu	10022	négatif

3.3.3 - Effet de la température environnementale sur la composition en acides gras membranaires

Les 96 souches identifiées comme *Enterobacter sakazakii* par l'A.M.S. Vitek ont donné la même identification en premier choix par la C.P.G. Le pourcentage moyen d'identification des 96 souches est de 84.7% avec une gamme de variation comprise entre 64.0% et 94.1%. Une fiche de résultat d'une analyse d'*Enterobacter sakazakii* par la C.P.G. est présentée en annexe 4, ainsi que la visualisation des pics d'acides gras correspondant à cette analyse en annexe 5.

Le profil moyen des 96 souches étudiées ne présente pas de différence notable avec celui de la souche référencée AHF 57.33, dont l'origine est de la poudre de lait (tableaux 18.1, 18.2 et 18.3), excepté un taux de 16:1 ω 7c plus faible (respectivement 20.4% et 21.9%). Par contre la souche indole positive référencée 192 CIP 103581 (Collection Institut Pasteur) présente de plus forts taux en 12:0 (respectivement 3.1% et 1.6%) et 16:1 ω 7c (respectivement 23.9% et 21.9%), et un taux plus faible en 14:0 (respectivement 5.6% et 8.3%). Enfin le profil moyen de la base de données du M.I.S. présente un taux plus faible en acides gras saturés (respectivement 35.8% et 39.5%), ainsi qu'un taux plus élevé en sommes caractéristiques (respectivement 39.7% et 36.5%), notamment en sommes caractéristiques 7 (respectivement 32.2% et 28.0%).

L'étude des gammes de températures (respectivement 20°C-30°C ; 30°C-40°C ; 40°C-50°C) montre une fréquence plus élevée en 15:0 (15.0% ; 2.5% ; 6.5%) pour la gamme de températures 20°C-30°C, une fréquence plus faible en 18:0 (60.0% ; 20.0% ; 50.0%) et l'absence de 19:0 Cyclo ω 8c (7.5% ; 0.0% ; 6.5%) pour la gamme de températures 30°C-40°C, et une fréquence plus élevée en 17:0 (7.5% ; 5.0% ; 12.5%) pour la gamme de températures 40°C-50°C (tableaux 18.1, 18.2 et 18.3). La combinaison des deux critères température et trafic de personnel montre pour la gamme de températures 20°C-30°C des fréquences plus élevées en zone de conditionnement pour les 18:0 et 19:0 Cyclo ω 8c (respectivement 68.7% et 9.4%, contre 25.0% et 0.0% en zone de production).

Tableau 18.1 : Proportions des différents acides gras membranaires de souches référencées d'*Enterobacter sakazakii* ainsi que de souches provenant d'un environnement industriel selon la température et le trafic de personnel.

Nature des acides gras	20 - 30°C								
	Zone de production, trafic restreint (8 souches)			Zone de conditionnement, trafic important (32 souches)			Total (40 souches)		
	fréq.	moy.	écart	fréq.	moy.	écart	fréq.	moy.	écart
Saturés	100,0%	38,9	38,1-39,7	100,0%	39,9	38,7-41,1	100,0%	39,7	38,7-41,1
dont 12:0	100,0%	1,6	1,3-1,8	100,0%	1,6	1,34-1,8	100,0%	1,6	1,3-1,8
14:0	100,0%	8,7	8,2-9,1	100,0%	9,0	8,1-9,4	100,0%	9,0	8,1-9,4
15:0	12,5%	0,0	0,0-0,3	15,6%	0,0	0,0-0,4	15,0%	0,0	0,0-0,4
16:0	100,0%	28,5	26,1-29,2	100,0%	29,0	27,8-30,4	100,0%	28,9	26,1-30,4
17:0	12,5%	0,0	0,0-0,3	6,2%	0,0	0,0-0,4	7,5%	0,0	0,0-0,4
18:0	25,0%	0,1	0,0-0,4	68,7%	0,3	0,0-0,6	60,0%	0,2	0,0-0,6
Insaturé									
16:1 ω7c	100%	22,8	21,7-23,4	100,0%	22,1	20,0-23,4	100,0%	22,2	20,0-23,4
Cyclo	87,5%	0,79	1,0-1,3	100,0%	1,3	0,8-2,0	97,5%	1,2	0,0-2,0
dont 17:0 Cyclo	87,5%	0,79	1,0-1,3	100,0%	1,3	0,8-2,0	97,5%	1,2	0,0-2,0
19:0 Cyclo ω8c	0,0%	0,0	0,0	9,4%	0,0	0,0	7,5%	0,0	0,0-0,3
Inconnu	100,0%	0,7	0,7-0,9	90,6%	0,7	0,0-0,8	92,5%	0,7	0,0-0,9
dont 14.503	100,0%	0,8	0,7-0,9	90,6%	0,7	0,0-0,8	92,5%	0,7	0,0-0,9
13.961	0,0%	0,0	0,0	3,1%	0,0	0,0	2,5%	0,0	0,0-0,6
Sommes caractéristiques	100,0%	36,7	35,2-37,9	100,0%	36,1	34,9-37,1	100,0%	36,1	34,9-37,9
dont 3	100,0%	8,4	7,9-9,1	100,0%	8,6	7,4-9,5	100,0%	8,6	7,9-9,5
7	100,0%	28,3	27,3-29,1	100,0%	27,4	26,1-29,0	100,0%	27,6	26,1-29,1

^aLa position de la double liaison peut être établie en comptant à partir du methyl (ω) de la chaîne carbonée.

^bLes acides gras notés "inconnu" ne sont pas répertoriés dans la banque de données. Les chiffres 14.503 et 13.961 correspondent à l'ECL, ou Equivalent Chain Length, valeur calculée pour chaque pic obtenu et comparée avec les ECL des acides gras méthylés de souches référencées se trouvant dans la banque de données.

^cLes sommes caractéristiques représentent des groupes de deux ou trois acides gras qui n'ont pu être séparés par la C.P.G. La somme caractéristique 3 contient les acides gras 16:1 iso I et/ou 14:0 3OH. La somme caractéristique 7 contient au moins un des isomères suivants: 18:1 ω7c, 18:1ω9t, 18:1ω9c et/ou 18:1 ω12t (les isomères *cis* et *trans* sont indiqués par les suffixes c et t, respectivement).

Tableau 18.2 - suite

30-40°C										
Nature des acides gras	Zone de production, trafic restreint (28 souches)			Zone de conditionnement, trafic important (12 souches)			Total (40 souches)			
		fréq.	moy.	écart	fréq.	moy.	écart	fréq.	moy.	écart
Saturés		100,0%	39,5	38,2-40,3	100,0%	38,4	36,6-40,2	100,0%	39,1	36,6-40,3
dont	12:0	100,0%	1,6	1,4-1,7	100,0%	1,7	1,5-1,8	100,0%	1,6	1,4-1,8
	14:0	100,0%	8,7	8,1-9,5	100,0%	8,7	8,4-9,0	100,0%	8,7	8,1-9,5
	15:0	3,6%	0,0	0,0-0,3	0,0%	0,0	0,0	2,5%	0,0	0,0-0,3
	16:0	100,0%	29,0	28,2-29,8	100,0%	28,0	26,2-29,8	100,0%	28,7	26,2-29,8
	17:0	7,1%	0,0	0,0-0,3	0,0%	0,0	0,0	5,0%	0,0	0,0-0,3
	18:0	39,3%	0,2	0,0-0,4	25,0%	0,1	0,0-0,5	20,0%	0,1	0,0-1,0
Insaturé		100,0%	21,6	20,1-23,4	100,0%	22,6	20,7-23,6	100,0%	21,9	20,1-23,6
16:1 ω7c		100,0%	21,6	20,1-23,4	100,0%	22,6	20,7-23,6	100,0%	21,9	20,1-23,6
Cyclo		100,0%	1,49	1,10-2,02	91,67%	0,87	0,0-1,62	97,5%	1,3	0,0-2,1
dont 17:0 Cyclo		100,0%	1,49	1,10-2,02	91,67%	0,87	0,0-1,62	97,5%	1,3	0,0-2,1
19:0 Cyclo ω8c		0,0%	0,0	0,0	0,0%	0,0	0,0	0,0%	0,0	0,0
Inconnu		92,9%	0,7	0,7-0,8	91,7%	0,7	0,0-0,8	92,5%	0,7	0-0,8
dont	14.503	92,9%	0,7	0,7-0,8	91,7%	0,7	0,0-0,8	92,5%	0,7	0-0,8
	13.961	0,0%	0,0	0,0	0,0%	0,0	0,0	0,0%	0,0	0,0
Sommes		100,0%	36,7	35,1-38,9	100,0%	37,3	35,7-39,0	100,0%	36,9	35,1-39,0
caractéristiques										
dont	3	100,0%	8,5	7,9-9,0	100,0%	8,5	7,4-9,0	100,0%	8,5	7,4-9,0
	7	100,0%	28,2	26,2-30,9	100,0%	28,6	27,7- 30,2	100,0%	28,3	26,2-30,9

Tableau 18.2 - suite

40-50°C							
Nature des acides gras	Zone de production,trafic restreint (28 souches)			Total (96 souches)			
	fréq.	moy	écart	fréq.	moy.	écart	
Saturés	100,0%	40,1	38,7-42,2	100%	39,5	36,6-42,2	
dont	12:0	100,0%	1,6	1,5-1,8	100,0%	1,6	1,3-1,8
	14:0	100,0%	8,8	8,3-9,3	100,0%	8,8	8,1-9,5
	15:0	6,2%	0,0	0,0-0,1	8,3%	0,0	0,0-0,4
	16:0	100,0%	29,2	28,5-30,6	100,0%	28,9	26,1-30,5
	17:0	12,5%	0,0	0,0-0,2	7,3%	0,0	0,0-0,4
	18:0	50,0%	0,2	0,0-0,8	41,7%	0,2	0,0-1,0
Insaturé	100,0%	21,1	19,6-22,5	100,0%	21,9	19,6-23,6	
16:1 ω7c	100,0%	21,1	19,6-22,5	100,0%	21,9	19,6-23,6	
Cyclo	100,0%	1,7	0,8-2,3	97,9%	1,3	0,0-2,3	
dont 17:0 Cyclo	100,0%	1,7	0,8-2,3	97,9%	1,3	0,0-2,3	
19:0 Cyclo ω8c	6,2%	0,0	0,0-0,2	4,2%	0,0	0,0-0,3	
Inconnu	87,5%	0,7	0,0-0,9	91,7%	0,7	0,0-0,9	
dont	14.503	87,5%	0,7	0,0-0,9	91,7%	0,7	0,0-0,9
	13.961	0,0%	0,0	0,0	1,0%	0,0	0,0-0,6
Sommes	100,0%	36,8	34,7-37,4	100,0%	36,5	34,7-39,0	
caractéristiques							
dont	3	100,0%	8,4	7,7-8,9	100,0%	8,5	7,4-9,5
	7	100,0%	28,0	26,6-29,0	100,0%	28,0	26,1-30,9

L'étude des rapport acides gras saturés/acides gras insaturés et C16:0/C16:1 ω7c (tableau 19) montre des ratios plus élevés dans la gamme de températures 40°C-50°C (respectivement 1,90 et 1,40) que dans la gamme de températures 20°C-40°C (respectivement 1,79 et 1,30). Cette observation doit cependant être modérée par le fait que le nombre de souches provenant de la gamme de températures 40°C-50°C est relativement faible (16 souches contre 80 pour la gamme de températures 20°C-40°C).

Tableau 19 : Effet de la température ambiante des lieux de prélèvement sur le ratio acides gras totaux saturés/insaturés et acides gras hexadecanoïques saturé/insaturé pour des souches d'*Enterobacter sakazakii*.

Gamme de températures (nombre de souches)	AG saturés/AG insaturés		16:0/16:1 ω7c	
	moyenne	écart	moyenne	écart
20°C-30°C (40)	1,79	1,64-2,03	1,30	1,19-1,52
30°C-40°C (40)	1,79	1,55-1,99	1,30	1,11-1,44
40°C-50°C (16)	1,90	1,76-2,15	1,40	1,27-1,56
TOTAL (96)	1,81	1,55-2,15	1,32	1,11-1,56
souche test AHF 57.33	1,95	-	1,44	-
souche test 192 CIP 103581	1,60	-	1,19	-

AG : Acide Gras.

La comparaison effectuée avec les profils des souches ribotypées (tableau 17) indique qu'au profil 10011 correspond un ratio acides gras saturés/acides gras insaturés supérieur à 1,90 (tableau 20). La ribotypie est une technique de typage dont la fiabilité est reconnue. Or, 2 des 4 souches présentant le ribogroupe 10011 provenaient de locaux présentant une température élevée, le 4e et le 5e. La coïncidence de tendances entre certains résultats obtenus par ribotypie et par C.P.G. pourrait constituer un élément d'argumentation en faveur de l'intérêt de cette dernière technique comme outil de caractérisation de souches provenant de l'environnement.

Tableau 20 : Proportions respectives des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés pour des ribogroupes de souches d'*Enterobacter sakazakii* provenant d'un site industriel.

ribogroupe (nombre de souches)	AG saturés/AG insaturés		16:0/16:1 ω7c	
	Moyenne	Ecart	Moyenne	Ecart
2847 (4)	1,75	1,67-1,83	1,29	1,24-1,34
10011 (4)	1,96	1,92-2,03	1,45	1,40-1,52
10001 (4)	1,85	1,78-1,92	1,37	1,32-1,42
10005 (4)	1,77	1,64-1,89	1,27	1,19-1,35
10006 (2)	1,76	1,70-1,83	1,29	1,22-1,36

AG : Acide Gras.

DISCUSSION

4 - DISCUSSION

4.1 - NATURE DE L'ENVIRONNEMENT DES USINES ETUDIEES

4.1.1 - Flore identifiée

En 1988, Muytjens *et al.* examinèrent 141 différentes poudres de lait provenant de 35 pays et trouvèrent que 52.5% contenaient des membres de la famille *Enterobacteriaceae*. L'espèce *Enterobacter sakazakii* était troisième en fréquence (15%) après *Enterobacter agglomerans* (27%) et *Enterobacter cloacae* (23%), soit un total de 65% pour ces trois espèces. Les identifications de colonies issues du milieu VRBG ont déterminé la présence de ces trois espèces dans des proportions proches de 50% pour *Enterobacter agglomerans*, 15% pour *Enterobacter cloacae*, et 2% pour *Enterobacter sakazakii*, soit un total de 67%. L'ordre est donc le même que celui observé par Muytjens *et al.* ainsi que la somme des proportions de ces trois espèces, mais le pourcentage en *Enterobacter agglomerans* est deux fois plus élevé alors que les pourcentages en *Enterobacter cloacae* et surtout en *Enterobacter sakazakii* sont plus faibles.

L'observation d'une similitude entre la répartition des espèces d'Entérobactéries dans l'environnement de production et celle du produit relatée par Muytjens *et al.* met en évidence une relation forte entre le produit et l'environnement de production, et confirme la nécessité de contrôler ce dernier pour garantir la sécurité du produit.

Il convient de noter qu'hormis dans des locaux présentant un faible niveau hygiénique (local stockage au rez-de-chaussée, sous-sol), les espèces *Klebsiella oxytoca* et *Klebsiella pneumoniae* n'ont été identifiées que dans le local Post-sécheur et le local humide, ces deux pièces n'étant séparées que par une porte. Cette observation confirme l'influence de l'environnement sur la répartition des espèces microbiennes, le genre *Klebsiella* étant plutôt trouvé dans des environnements humides.

4.1.2 - Réalité d'une modification de la sectorisation en zone de production

Plusieurs éléments plaident en faveur de la réalité d'une zone à trafic de personnel élevé présentant un niveau hygiénique intermédiaire en zone de production : des charges microbiennes plus élevées, à l'exception des entérocoques dont le niveau est constant dans toute la zone sèche, une proportion plus forte des coliformes totaux et plus faible des coliformes thermotolérants par rapport aux Entérobactéries, et une répartition différente des espèces identifiées. L'absence d'*Escherichia coli*, de *Pseudomonas aeruginosa* et du genre *Klebsiella* dans la zone de production à faible trafic de personnel indique que ces germes, observés en zone de conditionnement, ne font pas partie de l'environnement de la zone de production et que leur présence serait signe de mauvaises pratiques amenant notamment la présence d'eau.

L'augmentation des fréquences de certains acides gras, notamment les 18:0 et 19:0 Cyclo ω 8c, pour les souches d'*Enterobacter sakazakii* trouvées en zone de production et dans la gamme de températures 20°C - 30°C, est un élément nouveau susceptible de présenter un intérêt non négligeable comme marqueur d'activité du lieu d'origine d'une souche d'*Enterobacter sakazakii*, et pouvant peut-être s'appliquer à d'autres souches de coliformes. Cependant cette application ne peut être envisagée que si une étude portant sur la stabilité de ces critères est réalisée, notamment lorsqu'une souche est repiquée plusieurs fois en laboratoire.

Ces observations montrent une influence des conditions environnementales sur la répartition des flores microbiennes, notamment les conditions de trafic et de température ; elles indiquent que la signification de l'observation de germes à caractère indicatif doit être mise en relation avec leur présence dans l'environnement, comme cela a été observé pour les coliformes thermotolérants qui, favorisés par les températures élevées trouvées dans la tour d'atomisation, y perdent leur connotation fécale.

4.1.3 - Niveaux hygiéniques observés

4.1.3.1 - Résidus

Pour la poudre de lait les normes produits sont ≤ 50000 G.A.M./g et ≤ 10 coliformes/g (Codex, 1991). Les seuils observés à partir des prélèvements de résidus de poudre de lait contenus dans les sacs d'aspirateurs étaient compris entre < 10000 et < 100000 G.A.M./g, et < 1000 coliformes/g. Cependant l'apparente importance des dénombrements de coliformes ne doit pas être considérée comme étant révélatrice d'une mauvaise maîtrise de la qualité microbiologique de l'environnement, un facteur 100 entre la norme produit et les dénombrements observés sur des résidus de poudre de lait au contact de l'environnement ne paraissant pas démesuré.

4.1.3.2 - Surfaces

Dans des salles protégées en production de plats cuisinés, le risque pour la salubrité du produit est faible pour < 5 G.A.M./25cm², moyen pour < 50 G.A.M./25cm², et fort pour < 250 G.A.M./25cm² (CNEVA et SDHA - DGAL, 1991). Cependant les standards varient suivant les process industriels, le risque d'altération du produit différant suivant sa nature. D'autre part il n'est pas exclu que la sensibilité des différentes méthodes de prélèvement diffère, les prélèvements réalisés à l'aide d'éponges s'étant montrés plus sensibles au cours de notre étude que ceux réalisés à l'aide d'écouvillons. Tenant compte du fait qu'aucun incident n'a été signalé durant les campagnes de prélèvement, on peut considérer que dans des unités de production de poudre de lait, le risque est négligeable pour un seuil de dénombrement compris entre < 10000 et < 100000 G.A.M./25cm².

4.1.3.3 - Air

Concernant la qualité de l'air, en industrie de fabrication de poudre de lait les critères sont $< 200 \text{ cfu/m}^3$ pour un air de bonne qualité, et $> 2000 \text{ cfu/m}^3$ (Radmore et Lück, 1984) ou $> 1250 \text{ cfu/m}^3$ (Hedrick et Heldman, 1969) pour un air de mauvaise qualité. Les charges microbiennes observées au cours de cette étude se situaient toutes sous le seuil $< 200 \text{ cfu/m}^3$. Cela correspond avec les dénombrements observés par Kleiss (1992) à l'aide du préleveur RCS sur un site de production de poudre de lait, mais les moyennes des dénombrements observés en 1989 par Kang et Frank à l'aide du même préleveur (de 1095 cfu/m^3 à 2011 cfu/m^3) et par Radmore et Lück en 1984 à l'aide du préleveur Sartorius MD2 (1800 cfu/m^3) sont plus élevées. D'autre part, sur 209 échantillons d'air prélevés sur 31 sites de production de poudre de lait, Radmore et Lück n'en ont observé que quatre positifs en Entérobactéries. Sur les 46 prélèvements d'air que nous avons effectués à l'aide du préleveur Ochlovar, aucun n'a été positif en Entérobactéries. Sous réserve de différences possibles de sensibilité des méthodes de prélèvement, cette observation révèle un niveau hygiénique de l'air élevé et signifie une bonne maîtrise de la qualité de l'air. Le risque microbiologique par contamination aérienne du produit est donc faible.

Mossel (1967) recommande l'usage d'une échelle mobile adaptée au type de process industriel pour maîtriser la présence des *Enterobacteriaceae*. Les valeurs observées au cours de cette étude peuvent être prises comme référence pour établir à l'usage des standards hygiéniques. Cependant ces standards devront être adaptés aux conditions de production (présence de travaux, production intense ou réduite...).

4.2 - DETERMINATION DE POINTS POUVANT CONSTITUER DES P.C.M.

L'étude des P.C.M. ne fait intervenir que les locaux par lesquels passe le produit. Ne sont donc pas concernés les locaux annexes, le stock rez-de-chaussée, le sous-sol et la cage d'escalier. Il convient cependant de ne pas négliger le risque de contamination horizontale à partir des locaux annexes et de la cage d'escalier, notamment entre le 2e et le 4e où les charges microbiennes sont assez élevées et où *Enterobacter sakazakii* a été trouvé. Les endroits où ont été observées des charges microbiennes élevées ne sont pas nécessairement des P.C.M., si le produit est correctement isolé de l'environnement. Cela est normalement le cas dans la tour d'atomisation, alors que dans les locaux de conditionnement (stock totes, local Albro) le risque d'une contamination du produit par l'environnement n'est pas exclu. Ces derniers locaux semblent donc devoir être l'objet d'attentions particulières (contrôles répétés, modification des procédures de nettoyage). Cependant il convient de maîtriser la dispersion des Entérobactéries dans les locaux de la tour d'atomisation afin d'en éviter la colonisation et d'éviter une contamination du produit en cas de dysfonctionnement du procédé.

L'étude statistique indique que pour les Entérobactéries et les coliformes, les lieux à surveiller sont le 7e, le 5e où se trouve la buse d'atomisation, la passerelle 4e, le local Post-sécheur et les locaux entrée stock totes et stock totes.

Pour *Enterobacter sakazakii* les lieux pouvant constituer des points critiques sont la passerelle 4e, le local Post-sécheur, les locaux stock totes et entrée stock totes, et dans une moindre mesure le local Albro où le produit est à l'air libre mais où les charges en *Enterobacter sakazakii* ne sont pas trop élevées.

4.3 - PROPOSITION D'UNE METHODOLOGIE DE SURVEILLANCE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE L'ENVIRONNEMENT

4.3.1 - Contrôle du respect des bonnes pratiques hygiéniques par la recherche d'*Escherichia coli*

Dans les unités de production de lait en poudre traitées dans cette étude, l'espèce *Escherichia coli* n'a été identifiée que sur quelques prélèvements susceptibles de la contenir, comme des semelles de sabots ou des surfaces de sols en zone humide. A partir de cette investigation de l'environnement, nous pouvons affirmer que *Escherichia coli* ne fait pas partie de la flore habituelle du type d'atelier traité, mais peut s'y trouver si les règles d'hygiène ne sont pas respectées. Sa recherche peut donc être proposée dans le cadre d'un plan de contrôle de l'hygiène de l'environnement, sa présence sur la chaîne de production étant directement liée à de mauvaises pratiques.

Le test de Mackenzie constitue une épreuve satisfaisante mais à la condition formelle d'être réalisé dans des conditions extrêmement strictes de température. Les tests haute température ont été proposés pour la première fois par Eijkmann en 1904, mais la température de 44°C - 44.5°C n'est pas forcément la meilleure car elle élimine des souches d'origine fécale (Leclerc et Haslay, 1993). Au-dessous de 44°C, et surtout à partir de 42°C, des espèces comme *Klebsiella oxytoca* donnent des gaz en bouillon bilié et de l'indole en eau peptonée, exactement comme les *Escherichia coli* (Jacquet et Coiffier, 1978). La méthode "Canadian Health Protection Branch" stipule une température d'incubation de 45°C pour l'énumération de coliformes fécaux, compromis entre 44.5°C (grande sensibilité) et 45.5°C (grande spécificité) (Weiss *et al.*, 1983). Selon Francis *et al.* (1974), la température de 44.5°C est la meilleure pour le comptage d'*E. coli*. Un gain de temps peut être obtenu s'il y a addition de L-tryptophane au milieu B.L.B.V.B., le délai de 8 h étant alors suffisant pour qu'une colonie de *Escherichia coli* donne une culture abondante avec production de gaz et d'indole (Richard, 1985). Cependant ce milieu n'est pas validé. Afin de lever toute ambiguïté, notamment par rapport à certaines souches de *Klebsiella oxytoca* gaz positif et d'*Enterobacter sakazakii* indole positif, Jacquet et Coiffier (1978) préconisent l'incubation 24 h à 37°C d'un tube d'eau peptonée ainsi que d'un tube de bouillon au malonate de sodium. La dualité "indole+, malonate-" est caractéristique de l'espèce *Escherichia coli*.

Récemment un milieu sélectif a été mis au point pour la recherche d'*Escherichia coli*, le milieu Rapid' *E. coli* (Restaino *et al.*, 1990; Ogden et Watt, 1991). Ce milieu permet la recherche directe et le dénombrement de ce germe dans les produits destinés à l'alimentation humaine ou animale, les colonies d'*Escherichia coli* apparaissant bleues après clivage du substrat chromogène par la β -D-glucuronidase, enzyme qu'à part *Escherichia coli* seules quelques espèces de *Salmonella* et de

Shigella possèdent. Le prix d'une boîte contenant ce milieu est proche de 3 Francs. Si le test de Mackenzie semble fiable, il présente par rapport à ce milieu l'inconvénient de ne pas permettre d'effectuer de dénombrement, et d'autre part il revient plus cher (environ 10 Francs par test). L'utilisation préférentielle du milieu Rapid' *E. coli* semble donc indiquée pour contrôler la présence d'*Escherichia coli* tout au long du process.

4.3.2 - Contrôle de la présence d'*Enterobacter sakazakii*

Seuls 10% des prélèvements de surfaces de sols se sont montrés positifs pour la présence de ce germe, alors que ce chiffre était de 29% pour les 75 prélèvements de sacs d'aspirateurs appartenant à 9 des 15 aspirateurs étudiés, soit 60% des aspirateurs étudiés. Ainsi l'accumulation de poudre de lait dans un espace restreint favoriserait la présence de ce germe, connu pour avoir été précédemment isolé de préparations lactées déshydratées. Ces résultats plaident nettement en faveur de l'investigation préférentielle des sacs d'aspirateurs par rapport aux prélèvements de sols dans le cadre de la recherche d'*Enterobacter sakazakii* dans un environnement industriel similaire à celui traité dans cette étude. Il est nécessaire d'effectuer au moins 3 prélèvements par aspirateur, le pourcentage de prélèvements positifs dans les neuf aspirateurs où ont été trouvés ce germe étant de 46%, ce pourcentage variant de 20% à 100%.

Le caractère thermotolérant de *Enterobacter sakazakii*, précédemment décrit par Farmer *et al.* en 1980, est ici très nettement confirmé. Cette observation semble indiquer que le milieu V.R.B.L. à 44.5°C est le plus adapté pour la recherche de ce germe. Sur ce milieu et pour les deux usines étudiées *Enterobacter sakazakii* s'est trouvé en proportion majoritaire dans les prélèvements où il a été identifié.

4.4 - APPRECIATION DE LA FIABILITE DES TECHNIQUES UTILISEES

4.4.1 - Prélèvements de surface à l'éponge

La principale limite de ce test est le caractère aléatoire de la charge microbienne des surfaces traitées à l'éponge et à l'écouvillon (Tebbutt, 1991), même si ce biais a pu être réduit en choisissant des surfaces très voisines et dont l'emplacement correspondait aux mêmes conditions de trafic de personnel. Sous réserve de cette limite, les résultats semblent indiquer une meilleure efficacité de prélèvement des éponges, ce qui va dans le sens de l'affirmation du Guide Pratique d'Hygiène Hospitalière (Taibi, 1989) selon lequel l'écouvillonnage n'a qu'une valeur qualitative et ne rend absolument pas compte de la contamination réelle. Des travaux récents ont suggéré que les bactéries se trouvent surtout sous forme de biofilm plutôt que seules (Brouillaud-Delattre et Cerf, 1993). L'écouvillonnage pourrait casser ces colonies. L'efficacité de prélèvement des bactéries limiterait la sensibilité de cette méthode (Taibi, 1989). Par contre l'éponge, en raison de son humidité résiduelle et de sa bonne préhension, permet d'appliquer une pression plus forte qu'avec un écouvillon et possède

une efficacité de prélèvement élevée. L'utilisation préférentielle de l'éponge pour l'étude de surfaces de grande dimension comme les sols semble recommandée, l'écouvillon restant irremplaçable pour les prélèvements effectués dans des recoins ou à l'intérieur d'appareils.

4.4.2 - Milieux de culture

La similitude des identifications effectuées à partir des milieux V.R.B.G. à 37°C et V.R.B.L. à 30°C provient de ce que l'essentiel des Entérobactéries identifiées appartient au groupe des coliformes. Cette observation s'applique également aux dénombrements effectués à partir de ces deux milieux, notamment pour les seuils de dénombrement $< 1000 \text{ ufc}/25\text{cm}^2$ et $< 1000 \text{ ufc/g}$. De même que le dénombrement des Entérobactéries procure une alternative au dénombrement des coliformes quand ceux-ci sont absents de la flore étudiée (Brodsky, 1994), lorsque ces derniers sont très largement majoritaires comme observé dans notre étude, il est préférable de les dénombrer plutôt que les Entérobactéries. Cette remarque coïncide avec de précédents résultats obtenus à partir de camembert (Heim *et al.*, 1987). Les résultats des dénombrements et des identifications soulignent l'intérêt que présente le milieu V.R.B.L. à 44.5°C dans la mise en évidence de germes entériques (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*) ainsi que de souches d'*Enterobacter sakazakii* provenant d'un environnement industriel.

Pour les contrôles du laboratoire concernant cette dernière espèce, la méthodologie proposée est de la rechercher dans les aspirateurs à raison d'un minimum de trois prélèvements par aspirateur et de cinq colonies identifiées par prélèvement, et d'utiliser le milieu V.R.B.L. à 44.5°C, ce germe se développant particulièrement bien dans ces conditions. La présence d'un pigment jaune sur gélose nutritive est un élément essentiel dans la recherche de ce germe.

Il est intéressant de noter que malgré la bile présente dans les milieux deux genres inattendus s'y développent: *Pseudomonas* sur VRBG à 37°C et VRBL à 30°C, dans des proportions identiques (10%) ; et *Acinetobacter* sur les deux milieux et aux trois températures étudiés, dans les mêmes proportions (4%). Si les Entérobactéries et notamment les coliformes sont favorisés par ces milieux, ils ne représentent donc pas la totalité des micro-organismes s'y développant.

4.4.3 - A.M.S. VITEK

Plusieurs études comparatives ont rapporté des efficacités d'identification par l'A.M.S. de souches cliniques de 88.8% après 5 h d'incubation et de 95% après 8 h (Jorgensen *et al.*, 1983), de 98.2% (Bailey *et al.*, 1985), de 97% pour *E. coli* et 93.8% pour les Entérobactéries (Knight *et al.* 1990), de 86% (Plorde *et al.*, 1986), de 86% pour des germes à Gram négatif fermentants et non-fermentants et de 94% après réalisation de tests complémentaires (Macias *et al.*, 1995), de 92.4% après 10 h et 96.1% après 18 h (Robinson *et al.* 1995). L'identification des bacilles entériques demande 8 h (Barry *et al.*, 1982). Lors de notre étude la concordance d'identification avec le système API 20E pour les bacilles à Gram négatif en général a été de 79% (161/203) (Kleiss *et al.*, 1995), et plus spécifiquement de 81% (160/198) pour les Entérobactéries et 100% pour *E. coli*, ce qui est

satisfaisant pour des souches de l'environnement pouvant présenter des caractéristiques biochimiques atypiques. La fiabilité de l'A.M.S. semble aussi bonne que celle du système API 20E, pour lequel les pourcentages d'identification rapportés ont été de 82% à l'espèce (Cox et Mercuri, 1978), 85% au genre et 75% à l'espèce (Van Vuuren *et al.*, 1981), 90.7% à l'espèce sur des souches cliniques après 5 h d'incubation en utilisant un index d'identification modifié et 96.8% en 48 h après réalisation de tests additionnels (Jorgensen *et al.*, 1983), 86% à l'espèce et 91% au genre (Cox *et al.*, 1983), 87.7% à l'espèce en 24 h et 96.3% en 48 h après réalisation de tests additionnels (O'hara *et al.*, 1992), 77% à l'espèce en 24 h et 96% en 48 h après réalisation de tests additionnels (O'hara *et al.*, 1993), 79% pour des germes à Gram négatif fermentants et non-fermentants et 93% après réalisation de tests complémentaires (Macias *et al.*, 1995), 90.3% à l'espèce (Robinson *et al.*, 1995).

Le traitement de 3200 souches en 12 semaines avec un pourcentage élevé de souches identifiées confirme la rapidité de traitement de l'A.M.S. Il convient de préciser que le genre *Citrobacter* identifié par l'A.M.S., et plus précisément l'espèce *Citrobacter diversus*, n'a pas été identifiée comme telle par le système API 20E, ce dernier proposant l'espèce *Escherichia hermannii*. Mis à part le genre *Citrobacter*, l'ensemble des genres rencontrés au cours de cette étude présente des seuils moyens d'identification satisfaisants. L'A.M.S. ne contient pas l'espèce *Rahnella aquatilis* dans sa base de données et l'identifie comme *Enterobacter agglomerans* (Alballaa *et al.*, 1992), bien que l'absence de pigment exclue toute confusion (Hoppe *et al.*, 1993). Il est vrai que cette espèce, saprophyte de l'environnement, exceptionnellement isolée chez l'homme immunodéprimé (Harrell *et al.*, 1989 ; Alballaa *et al.*, 1992 ; Maraki *et al.*, 1994) et chez l'animal, n'a été décrite qu'en 1989 par Richard comme ayant des caractères bactériologiques très proches d'*Enterobacter agglomerans* biogroupe G1.

L'observation d'une forte proportion en *Serratia plymuthica* parmi les coliformes thermotolérants isolés dans les sacs d'aspirateurs doit être modérée par le fait que l'identification par galerie API 20E de l'unique profil de *Serratia plymuthica* ainsi que du seul profil de *Citrobacter freundii* trouvés au cours de cette étude ait donné *Enterobacter agglomerans*. Si la déficience de la base de données de l'A.M.S. Vitek pour ces deux espèces était établie, on pourrait alors affirmer que les coliformes thermotolérants identifiés dans les aspirateurs sont composés pour 75% à 95% du genre *Enterobacter*, l'espèce *Enterobacter agglomerans* étant majoritaire en zone de production (50%) et l'espèce *Enterobacter sakazakii* étant majoritaire en zone de conditionnement (64%).

En conclusion, si l'on excepte le genre *Citrobacter* et l'espèce *Rahnella aquatilis*, l'A.M.S. semble être un outil fiable pour l'identification de coliformes issus de l'environnement et pour le traitement d'un grand nombre de souches bactériennes en un laps de temps relativement court, notamment dans le cas d'études écologiques.

4.4.4 - Galeries API 20E

La base de données API 20 E s'est avérée déficiente dans l'identification des souches inositol négatives d'*Enterobacter sakazakii*, confondant cette espèce avec *Enterobacter amnigenus* bien que les colonies soient pigmentées en jaune. L'observation de ce pigment est un caractère essentiel dans l'observation de *Enterobacter sakazakii* (Goullet et Picard, 1986).

L'étude comparative sur les températures d'incubation laisse supposer que la température de 30°C est préférable pour l'identification de coliformes (présumés) provenant d'un environnement industriel, en particulier lorsque la présence des espèces *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Ewingella americana* et *Rahnella aquatilis* est suspectée. La norme française NF V 08 015 (Recueil de Normes Françaises, 1993) recommande une température d'incubation de 30°C pour la détection et l'énumération des coliformes provenant d'un environnement technologique, et une température d'incubation de 35°C ou 37°C lorsqu'il s'agit de la santé publique. Mossel *et al.* ont montré en 1986 que les coliformes psychrotrophes n'étaient pas inhibés à 37°C mais que leur croissance était meilleure à 30°C. La température de 30°C est celle qui a été retenue pour l'incubation de la galerie API 20EC, spécifique des coliformes (Renaud *et al.*, 1990).

4.4.5 - Analyses des acides gras membranaires par la C.P.G.

Les identifications par C.P.G. ont été entreprises pour tester les capacités d'identification de cette méthode et pour tenter de mettre en évidence des relations entre les profils d'acides gras membranaires et la température des sites de prélèvement des souches. Cette série d'identifications n'a été envisagée qu'après avoir achevé l'exploitation des divers résultats obtenus au cours de cette étude écologique. Par conséquent les souches identifiées avaient déjà subi plusieurs repiquages : une fois sous forme de spots pour les transporter, deux à trois fois pour les purifier en vue d'identification par l'A.M.S. Vitek, une fois pour les conserver en tube de Félix et les transporter, enfin une à deux fois pour les isoler et obtenir des quadrants nets en vue d'identification C.P.G., soit un total de cinq à sept repiquages. Il semble inévitable qu'une dérive du profil en acides gras se soit produite, interdisant une analyse phylogénétique des résultats et en limitant l'exploitation au dégagement de tendances par l'étude des moyennes de pourcentages en acides gras et de leurs fréquences, à l'exemple de Huys *et al.* (1994).

4.4.5.1 - Identification d'*Enterobacter sakazakii*

L'efficacité d'identification du M.I.S. peut être jugée excellente pour l'espèce *Enterobacter sakazakii*, la concordance avec les identifications obtenues par l'A.M.S. Vitek étant de 100%. Ce résultat ne va pas dans le sens des observations de Bergan et Sorheim (1984) selon lesquels l'intérêt de la C.P.G. est de distinguer les bactéries oxydantes des bactéries non oxydantes parmi les bactéries

à Gram négatif, cette méthode ne permettant pas une identification fiable des espèces appartenant à la famille des Entérobactéries, trop homogènes dans leur composition en acides gras.

Le profil moyen de la base de données du M.I.S. présente des différences avec le profil moyen des 96 souches analysées, notamment un taux en acides gras saturés plus faible, laissant supposer qu'il faudrait effectuer une réactualisation de cette base de données concernant l'espèce *Enterobacter sakazakii*, par exemple en distinguant une base de données "souches sauvages" et une base de données "souches industrielles". Les taux rencontrés en acides gras insaturés concordent avec l'assertion de Silbert et Vagelos (1967) selon lesquels ce taux doit représenter environ 20% des acides gras totaux pour un bon fonctionnement de la membrane.

4.4.5.2 - Appréciation de l'origine d'une souche d'*Enterobacter sakazakii*

L'application d'une température supérieure à la température de destruction provoque des lésions cellulaires. Certaines cellules seront détruites alors que d'autres seront seulement stressées. Selon Brissonnet *et al.* (1994), il est important de distinguer deux sortes de traitements: ceux capables d'induire une mutation, (stress oxydatif, nutritionnel, chimique, thermique) et ceux ne provoquant que des lésions (stress osmotique). En réponse à un stress thermique, les microorganismes synthétisent des protéines de choc thermique et diminuent fortement la synthèse des autres protéines (Neidhart et Vanbogelen, 1981; Lindquist et Craig, 1988). L'étude présente se proposait d'étudier l'effet, non d'un stress, mais d'une mutation induite par la température sur la composition en acides gras de la membrane microbienne. Les cellules bactériennes modifient la composition de leurs lipides pour maintenir la fluidité de leur membrane en fonction de leur phase de croissance mais également en fonction des variations de la température (Drucker, 1977).

Dans le cadre d'une démarche de type H.A.C.C.P., il peut être nécessaire de déterminer rapidement l'origine d'une souche bactérienne dans une unité de production (Notermans *et al.*, 1994a). L'augmentation du ratio acides gras saturés/acides gras insaturés lorsque la température ambiante s'élève concorde avec de précédentes observations selon lesquelles une élévation de température entraîne une augmentation progressive du taux en acides gras saturés, notamment en C16, et une diminution correspondante du taux en acides gras insaturés (Marr et Ingraham, 1962 ; Cronan et Gelmann, 1975 ; Cronan, 1978 ; Fukunaga *et al.*, 1995). Les ratios acides gras saturés/acides gras insaturés et C16:0/C16:1 ω 7c de la souches AHF 57.33 provenant de poudre de lait sont élevés (respectivement 1.95 et 1.44), ce qui indique que cette souche pourrait avoir contaminé le produit au cours de la production dans un local à haute température. Par contre, la souche référencée 192 CIP 103581 présente des ratios plus faibles (respectivement 1.60 et 1.19) que ceux des 96 souches (respectivement 1.81 et 1.32) ; cette souche atypique ne présente un intérêt que par le fait qu'elle est positive pour un maximum de caractères biochimiques, notamment l'indole, mais elle n'a aucun rapport avec des souches industrielles.

Cette technique peut être envisagée dans la détermination de l'origine de souches d'*Enterobacter sakazakii* dans des unités de production de poudre de lait par rapport à la température

des locaux, afin d'établir la source d'une contamination par ce germe et d'appliquer rapidement des mesures correctives dans le cadre d'un plan H.A.C.C.P.

4.4.6 - Ribotypie

Une relation a pu être envisagée entre une température environnementale élevée et l'observation du ribogroupe 10011, mais le nombre insuffisant de souches traitées ne permet pas d'émettre un jugement sur cette technique. Cependant la ribotypie représente un outil très discriminant pour l'investigation d'incidents nosocomiaux causés par *Enterobacter cloacae* (Haertl et Bandlow, 1993 ; Weisher *et al.*, 1993 ; Weisher et Kolmos, 1993 ; Grattard *et al.*, 1994), *Pseudomonas aeruginosa* (Blanc *et al.*, 1993) ou *Citrobacter* (Morgan *et al.*, 1992).

CONCLUSION

5 - CONCLUSION

5.1 - OBSERVATIONS RECUEILLIES

Cette étude a permis d'établir que dans ce genre d'usine, les charges de l'ensemble des flores considérées (G.A.M., Entérobactéries, coliformes totaux, coliformes thermotolérants, staphylocoques, pseudomonas, flore lactique) augmentent graduellement à mesure que l'on s'éloigne de la zone de production, à l'exception des entérocoques dont le niveau très faible est constant dans toute la zone sèche. Les Entérobactéries peuvent être utilisées comme germes indicateurs de la maîtrise de la qualité microbiologique de l'environnement industriel, leur présence étant fonction du niveau hygiénique de l'environnement. Les Entérobactéries trouvées en zone de production sont essentiellement des coliformes. La présence de coliformes thermotolérants dans cette zone de production avec un indice de présence élevé peut être corrélée avec une adaptation des coliformes aux hautes températures rencontrées dans les locaux de la tour d'atomisation (jusqu'à 60°C), cette catégorie de germes ne peut donc pas être utilisée comme indicateur de mauvaises pratiques hygiéniques. L'identification des espèces trouvées sur le milieu V.R.B.L. incubé 24 h à 44.5°C a permis d'observer que certaines espèces non entériques pouvaient s'y développer, telles *Enterobacter agglomerans* ou *Enterobacter sakazakii*. Cette observation confirme le caractère abusif de l'appellation coliformes fécaux pour les coliformes thermotolérants.

L'étude de la répartition des différentes espèces de coliformes identifiées a fait apparaître que le genre prédominant est *Enterobacter*, et les espèces majoritaires sont *Enterobacter agglomerans* et dans une moindre mesure *Enterobacter cloacae*, l'espèce *Enterobacter sakazakii* se trouvant en troisième position. Ce dernier germe, qu'il convient de surveiller particulièrement en raison de sa pathogénicité opportuniste, a été trouvé dans certains locaux de la tour d'atomisation (local Post-sécheur, passerelle du 4e, cage d'escalier). De manière générale les sacs d'aspirateurs favorisent le développement ou la concentration d'*Enterobacter sakazakii*. L'analyse des acides gras membranaires par la C.P.G. peut être envisagée comme outil de caractérisation de souches d'*Enterobacter sakazakii*, espèce utilisée comme modèle pour cette étude. Enfin l'absence ou la très faible présence des genres *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Klebsiella* dans la zone de production, et plus précisément des espèces *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca*, indique que ces germes ne font pas partie de l'environnement de cette zone et que leur présence serait signe de mauvaises pratiques amenant notamment la présence d'eau.

L'utilisation d'un plan statistique a permis d'effectuer des comparaisons fiables entre locaux, les prélèvements ayant été effectués de manière représentative. La répétition des prélèvements dans un même local ainsi que l'harmonisation des types et des modalités de prélèvements sont des conditions indispensables pour dégager des tendances de manière fiable. Grâce à cette démarche, des relations entre les charges microbiennes et l'environnement ont pu être avancées : une température élevée ou des mesures d'hygiène moins strictes en liaison avec la présence de coliformes thermotolérants (présence de carton, d'eau) ; la présence d'eau ou le trafic de personnel corrélées avec des dénombrements élevés pour l'ensemble des recherches effectuées (G.A.M., Entérobactéries,

coliformes totaux et thermotolérants). La présence de ces différents groupes de germes dans des locaux très chauds (jusqu'à 60°C), en particulier la présence d'*Enterobacter sakazakii*, implique qu'une contamination post-atomisation n'est pas impossible si le produit est insuffisamment isolé de l'environnement.

5.2 - PERSPECTIVES

A partir des hypothèses observées pour l'usine B sur les résultats quantitatifs des différentes flores recherchées, une étude statistique ciblée sur les lieux susceptibles d'être des Points Critiques à Maîtriser serait à réaliser pour observer les effets de mesures correctives avec un suivi mensuel de l'évolution des charges microbiennes. L'aspirateur semble être un moyen particulièrement intéressant d'investigation de l'environnement, concentrant la contamination des surfaces dans un espace clos. Les seuils à appliquer seraient de < 10000 G.A.M./g à < 100000 G.A.M./g, < 1000 ufc/g en Entérobactéries et coliformes totaux, et < 100 ufc/g en coliformes thermotolérants. Dans la mesure où les résultats des dénombrements et des identifications en Entérobactéries et coliformes sont en général très proches, dans ce type d'usine il semble inutile d'effectuer ces deux recherches en parallèle.

L'impact des conditions environnementales sur la proportion des acides gras membranaires d'*Enterobacter sakazakii* par C.P.G. devra être précisé sur quelques souches provenant de divers environnements dont la température aura été mesurée précisément au moment du prélèvement, et qui n'auront été repiquées qu'une ou deux fois afin d'éviter toute variation des profils en acides gras. L'excellente capacité d'identification du M.I.S. pour ce germe permet d'éviter la confirmation par galerie API 20E. Il est regrettable pour l'interprétation des résultats qu'aucune souche d'*Enterobacter sakazakii* n'ait été isolée du produit au cours de cette étude, la seule référence étant en l'occurrence la souche AHF 57.33 provenant de l'Institut Pasteur de Paris. Il paraît indispensable d'effectuer une recherche active à partir du milieu V.R.B.L. à 44.5°C (présence de pigment après repiquage sur T.C.S. à 30°C) afin de pouvoir effectuer des comparaisons de profils d'acides gras entre les souches provenant du produit et les souches issues d'environnements présentant diverses températures.

Au niveau industriel, les retombées de cette étude se situent dans l'application des résultats obtenus sur des sites de production présentant des caractéristiques d'organisation de locaux et des pratiques semblables à celles des deux usines traitées, notamment la méthodologie de surveillance de l'environnement microbiologique, les modalités de prélèvement et les seuils de dénombrement à appliquer dans la détermination des Points Critiques à Maîtriser concernant les G.A.M., les Entérobactéries, les coliformes totaux et thermotolérants, et plus précisément *Enterobacter sakazakii*.

Enfin une étude plus lourde serait à entreprendre sur animaux afin d'évaluer la pathogénicité des souches d'*Enterobacter sakazakii* éventuellement trouvées dans le produit, mais également celle de souches trouvées dans l'environnement afin de définir avec précision le risque qu'elles présentent et de cibler sur d'éventuelles souches réellement pathogènes les mesures de sécurité.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ALBALLAA S. R., S. M. HUSSEIN QADRI, O. AL-FURAYH and K. AL-QATARY. 1992. Urinary tract infection due to *Rahnella aquatilis* in a renal transplant patient. J. Clin. Microbiol. 30:2948-2950.
- ALVAREZ A. J., M. P BUTTNER and L. D. STETZENBACH. 1995. PCR for bioaerosol monitoring: Sensitivity and environmental interference. Appl. Environ. Microbiol. 61:3639-3644.
- ANON. 1976. API Analytical Profile Index for *Enterobacteriaceae* and other Gram negative bacteria. New York: Analytab Products Inc.
- ANON. 1995. Commentaires sur les critères microbiologiques. Dans Aide à la mise en place d'un système d'assurance de la qualité. Annexe 3. SYNAFAP (Syndicat National des Fabricants de Produits Cuisinés), pp 214-215.
- ANSTEY N. M. 1992. Use of cefotaxime for treatment of *Acinetobacter* infections. Clin. Infect. Dis. 15:374-375.
- ANSTEY N. M., B. J. CURRIE and K. M. WITHNALL. 1992. Community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in the northern territory of Australia. Clin. Infect. Dis. 14:83-91.
- ARSENI A., E. MALAMON LADAS, C. KOUTSIA, M. XANTHON and E. TRIKKA. 1987. Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. J. Hosp. Infect. 9:143-150.
- BABB J. R., A. J. HALL, R. MARLIN and G. A. J. AYLIFFE. 1989. Bacteriological sampling of postmortem rooms. J. Clin. Pathol 42: 682-688.
- BAILEY J. S., N. A. COX, J. E. THOMSON and D. Y. C. FUNG. 1985. Identification of *Enterobacteriaceae* in foods with the Automicrobic sytem. J. Food Protect. 48:147-149.
- BAKER D. A. 1995. Application of modelling in HACCP plan development. Int. J. Food Microbiol. 25:251-261.
- BARNES D. J., S. NARAQI and J. D. IGO. 1988. Community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in adults in Papua New Guinea. Rev. Infect. Dis. 10:636-639.

- BARRY A. L., T. L. GAVAN, R. E. BADAL and M. J. TELENSON. 1982. Direct comparison of two mechanised systems for identification of Gram-negative bacilli. *American J. Clin. Pathol.* 78:462-470.
- BENBOUGH J. E., A. M. BENNETT and S. R. PARKS. 1993. Determination of the collection efficiency of a microbial air sampler. *J. Appl. Bacteriol.* 74:170-173.
- BERGAN T. and K. SORHEIM. 1984. Gas-liquid chromatography for the assay of fatty acid composition in Gram-negative bacilli as an aid to classification. *Meth. Microbiol.* 15:345-362.
- BIERING G., S. KARLSSON, N. C. CLARK, K. E. JONSDOTTIR, P. LUDVIGSSON and O. STEINGRIMSSON. 1989. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol.* 27:2054-2056.
- BILLIAU V., C. BEUSCART, O. LEROY, P. J. DUJARDIN, G. BEAUCAIRE, C. CHIDIAC et Y. MOUTON, GROUPE SES. 1989. Septicémies à *Enterobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter* ou *Pseudomonas*. *Pathol. Biol.* 37:39-42.
- BISS M. E. and S. C. HATHAWAY. 1995. Microbiological and visible contamination of lamb carcasses according to preslaughter presentation status: implications for HACCP. *J. Food Protect.* 58:776-783.
- BLANC D. S., H. H. SIEGRIST, R. SAHKI. and P. FRANCILOLO. 1993. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa*: Discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. *J. Clin. Microbiol.* 31:71-77.
- BLOOD R. M. and G. D. W. CURTIS. 1995. Media for 'total' *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 26:93-115.
- BODEY G. P., L. S. ELTING and S. RODRIGUEZ. 1991. Bacteremia caused by *Enterobacter*: 15 year of experience in a cancer hospital. *Rev. Infect. Dis.* 13:550-558.
- BOLOGNA I., A. MARCIANA, M. DARAIO and S. GLEICH. 1984. Infant feeding formula contaminated by *Enterobacter cloacae*. *Infect. Control* 5:115.
- BOUVET P. J. M. and P. A. D. GRIMONT. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:228-240.

- BRENNER D. J. 1981. The genus *Enterobacter*. In: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schleger (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Vol. 2, Springer-Verlag, New-York, NY, pp. 1173-1180.
- BRISSENET F., M. BOUIX, G. LOISEAU, A. RUSSEL et J. Y. LEVEAU. 1994. Le stress bactérien et ses conséquences en génie de l'hygiène. *I.A.A.* 111:106-114.
- BRODSKY M. H. 1994. The use of microbial indicators in HACCP assessment of food safety. *Dans Sécurité Alimentaire 94, Compte-rendu de la troisième conférence internationale*
- BROUILLAUD-DELATTRE A. et O. CERF. 1993. Le biofilm: une réalité industrielle. *Rev. Lait. Fr.* 528, 30-31.
- BROUILLAUD-DELATTRE A., A. KOBILINSKY et O. CERF. 1994. Méthode de mesure de l'efficacité des procédés de nettoyage et de désinfection des surfaces ouvertes. *Lait* 74:79-88.
- BROWN C. and R. J. SEIDLER. 1973. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl. Microbiol.* 25:900-904.
- BRUNET D. 1988. Les guides pratiques des C.H.R., Cafés, Hôtels, Restaurants - Hygiène et restauration. Ed. B.P.I., 3e édition.
- BRYAN F. L. 1983. Epidemiology of milk-borne diseases. *J. Food Prot.* 46:637-649.
- BUTTNER M. P. and L. D. STETZENBACH. 1993. Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:219-226.
- CASEWELL M. W., J. F. COOPER and M. WEBSTER. 1981. Enteral feeds contaminated with *Enterobacter cloacae* as a cause of septicemia. *Brit. Med. J.* 282:973.
- CATTEAU M., J. C. AUBY et M. CATSARAS. 1981. Système Spiral et analyse bactériologique des plats cuisinés. *Rec. Méd. Vét.* 157:735-739.
- CERF O. et B. CARPENTIER. 1992. Un point critique pour la maîtrise de l'hygiène: l'environnement des ateliers. *Dans Microbiologie Prédictive et HACCP, Compte-rendus de la deuxième conférence internationale ASEPT, ASEPT Editeur* 169-180.
- CHEFTEL J.-C. et H. CHEFTEL. 1976. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. *Dans Ingénieurs praticiens, Vol. 1. Technique et Documentation Editeur.*

CLARK N. C., B. C. HILL, C. M. O'HARA, O. STEINGRIMSSON and R. C. COOKSEY. 1990. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13:467-472.

CNEVA (Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires) et SDHA - DGAL (Sous-Direction de l'Hygiène Alimentaire de la Direction Générale de l'Alimentation). 1991. Salles microbiologiquement maîtrisées appliquées aux plats cuisinés et produits équivalents. ASPEC Editeur, p. 56.

Codex. 1991. Codex Alimentarius Commission. Draft principles and application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system. *Dans* Codex Alimentarius Commission Document Alinorm 93/13 appendix VI.

COSTERTON J. W., K.-J. CHENG, G. G. GEESEY, T. I. LADD, J. C. NICKEL, M. DASGUPTA and T. J. MARIE. 1987. Bacterial biofilms in nature. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:435-464.

COX N. A. and A. J. MERCURI. 1978. Comparison of two minikits (API and R-B) for identification of *Enterobacteriaceae* isolated from poultry and meat products. *J. Food Protect.* 41:107-110.

COX N. A., J. S. BAILEY and J. E. THOMSON. 1983. Evaluation of five miniaturized systems for identifying *Enterobacteriaceae* from stock cultures and raw foods. *J. Food Protect.* 46:914-916.

COX L. J., N. KELLER and M. VAN SCHOTHORST. 1988. The use and misuse of quantitative determination of *Enterobacteriaceae* in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol., Sympos. suppl.*:237S-249S.

CRONAN J. E. 1978. Molecular biology of bacteriological membrane lipids. *Ann. Rev. Biochem.* 47:163-189.

CRONAN J. E. and E. P. GELMANN. 1975. Physical properties of membrane lipids. *Biol. Relev. Regul.* 39:232-256.

DAJOZ R. 1971. Précis d'écologie, Editions Dunod, 434 p.

DAUPHIN A., et J. C. DARBORD. 1988. L'eau à l'hôpital/Hygiène de l'alimentation à l'hôpital, *Dans* Editions Médicales Internationales, Technique et Documentation, Hygiène Hospitalière Pratique - APMIF - Lavoisier Editeur. 475-575.

DAVIES R. R. et W. C. NOBLE. 1962. Dispersal of bacterial on desquamated skin. *Lancet* 2:1295-1297.

DE CHAMPS C., M. P. SAUVANT, C. CHANAL, D. SIROT, N. GAZUY, R. MALHURET, J. C. BAGUET and G. SIROT. 1989. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum- β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 27:2887-2890.

DE CHAMPS C., C. HENQUELL, D. GUELON, D. SIROT, N. GAZUY and J. SIROT. 1993. Clinical and bacteriological study of nosocomial infections due to *Enterobacter aerogenes* resistant to imipenem. *J. Clin. Microbiol.* 31:123-127.

DE RAUTLIN DE LA ROY Y., M. ARDUIN, O. CASTEL et B. GRIGNON. 1983. Ensemencement et dénombrement des bactéries par un procédé semi-automatisé: le "Spiral system". *Feuillets Biol.* 24:41-44.

DIJKSHOORN L. and J. VAN DER TOORN. 1992. *Acinetobacter* species: which do we mean?. *Clin. Infect. Dis.* 15:748-749.

DIJKSHOORN L., A. VAN OOYEN, W. J. C. HOP, M. THEUNSS and M. F. MICHEL. 1990. Comparison of clinical *Acinetobacter* strains using a carbon source growth assay. *Epidemiol. Infect.* 104:443-453.

DOYLE M. P. 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 12:289-302.

DRUCKER D. B. 1977. Gas-liquid chromatography chemotaxonomy. *Meth. Microbiol.* 9:83-123.

ECHEVERRIA P., B. A. HARRISSON, C. TIRAPAT and A. Mc FARLAND. 1983. Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:32-36.

EIJKMAN C. 1904. Die Garungsprobe über 46°C als Hilfsmittel bei der Trinkwasser Untersuchung. *Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig.* 37:742.

FALKINER F. R. 1992. *Enterobacter* in hospital. *J. Hosp. Infect.* 20:137-140.

FARMER J. J., M. A. ASBURY, F. W. HICKMAN, D. J. BRENNER and the ENTEROBACTERIACEAE Study Group. 1980. *Enterobacter sakazakii*: A new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:569-584.

FARMER J. J., B. R. DAVIS and F. W. HICKMAN. 1976. Detection of *Serratia* outbreaks in hospital. *Lancet*:455-459.

FARMER J. J., B. R. DAVIS, F. W. HICKMAN-BRENNER, A. MC WORTHER, G. P. HUNTLEY-CARTER, M. A. ASBURY, C. RIDDLE, H. G. WATHEN-GRADY, C. ELIAS, G. R. FANNING, A. G. STEIGERWALT, C. M. O'HARA, G. K. MORRIS, P. B. SMITH and D. J. BRENNER. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 21:46-76.

FLYNN D. M., R. A. WEINSTEIN, C. NATHAN, M. A. GASTON and S. A. KABINS. 1987. Patients endogenous flora as the source of "nosocomial" *Enterobacter* in cardiac surgery. *J. Infect. Dis.* 156:363-368.

Food and Drug Administration, and Milk Industry Foundation International Ice Cream Association. 1988. Recommended guidelines for controlling environmental contamination in dairy plants. *Dairy Food Sanit.* 8:52-56.

FOTEDAR R., U. BANERJEE, J. C. SAMANTRAY and SHRINIWAS. 1992. Vector potential of hospital houseflies with special reference to *Klebsiella* species. *Epidemiol. Infect.* 109:143-147. potential of *Escherichia coli* in enteral feeds to cause food poisoning: a study under simulating ward conditions. *J. Hosp. Infect.* 5:155-163.

FRANCILLON C., B. DUNN, S. GABELLON, S. KRUPP and P. FRANCIOLI. 1988. Infections à *Pseudomonas aeruginosa* d'origine environnementale dans un centre de brûlés. *Swiss Med.* 10:24.

FRANCIS D. W., J. T. PEELER and R. M. TWEDT. 1974. Rapid method for detection and enumeration of fecal coliforms in fresh chicken. *Appl. Microbiol.* 27:1127-1130.

FRENEY J., P. J. M. BOUVET and C. TIXIER. 1989. Identification et détermination de la sensibilité aux antibiotiques de 31 souches cliniques d'*Acinetobacter* autres que *A. baumannii*. *Ann. Biol. Clin.* 47:41-44.

FUKUNAGA K., M. WADA, M. HONJO, Y. SETAISHI, N. HAYASHINAKA, Y. TAKADA and J. NISHIKAWA. 1995. Effects of temperature and salt on lipid and fatty acid compositions of a bacterium isolated from the bottom layer of lake Vanda, Antarctica. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41:191-205.

- GABIS D. A., R. S. FLOWERS, D. EVANSON and R. E. FAUST. 1989. A survey of 18 dry dairy product processing plant environments for *Salmonella*, *Listeria* and *Yersinia*. J. Food Prot. 52:122-124.
- GALLAGHER P. G. 1990. *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. Rev. Infect. Dis. 12:808-812.
- GARZAROLI C., M. BATTISTELLA and G. RONDININI. 1994. Enterobacteria in dairy products: source and sensitivity to disinfectants. Microbiol.-Al.-Nutr. 12:185-193.
- GASTON M. A. 1988. *Enterobacter*: an emerging nosocomial pathogen. J. Hosp. Infect. 11:197-208.
- GOLDIE F. J. 1988. Farley Health Products - a case history. Brit. Food J. 90:20-21.
- GOULLET P. and B. PICARD. 1986. Characterization of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter sakazakii* by electrophoretic polymorphism of acid phosphatase, esterases, and glutamate, lactate and malate dehydrogenases. J. Gen. Microbiol. 132:3105-3112.
- GRADON J. D., E. K. CHAPNICK and L. I. LUTWICK. 1992. Infective endocarditis of a native valve due to *Acinetobacter* - Case report and review. Clin. Infect. Dis. 14:1145-1148.
- GRAHAM D. R., R. L. ANDERSON, F. E. ARIEL, N. J. EHRENKRANZ, B. ROWE, H. R. BOER and R. E. DIXON. 1981. Epidemic nosocomial meningitis due to *Citrobacter diversus* in neonates. J. Infect. Dis. 144:203-209.
- GRAHAM D. R. and J. D. BAND. 1981. *Citrobacter diversus* brain abscess and meningitis in neonates. JAMA 245:1923-1925.
- GRATTARD F., B. POZZETTO, P. BERTHELOT, I. RAYET, A. ROS, B. LAURAS and O. G. GAUDIN. 1994. Arbitrarily primed PCR, ribotyping, and plasmid pattern analysis applied to investigation of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. J. Clin. Microbiol. 32:596-602.
- GREENE V. W., D. VESLEY, R. G. BOND and G. S. MICHAELSEN. 1962. Microbiological contamination of hospital air. Appl. Microbiol. 10:561-566.
- GUTHERTZ L. S. and R. L. OKOLUK. 1978. Comparison of miniaturized multitest systems with conventional methodology for identification of *Enterobacteriaceae* from foods. Appl. Environ. Microbiol. 35:109-112.

- GWYNN C. M. and R. H. GEORGE. 1973. Neonatal *Citrobacter* meningitis. Arch. Dis. Childhood 48:455-458.
- HAERTL R. and G. BANDLOW. 1993. Epidemiological fingerprinting of *Enterobacter cloacae* by small-fragment restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. J. Clin. Microbiol. 31:128-133.
- HARRELL L. J., M. L. CAMERON and C. M. O'HARA. 1989. *Rahnella aquatilis*, an unusual Gram-negative rod isolated from the bronchial washing of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. 27:1671-1672.
- HAWKINS R. E., C. R. LISSNER and J. P. SANFORD. 1991. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. South. Medic. J. 84:793-795.
- HEDRICK T. I. and D. R. HELDMAN. 1969. Air quality in fluid and manufactured milk product plants. J. Milk Food Technol. 32:265-269.
- HEIM E., W. SCHMIDT-LORENZ und H. SPIELLMANN. 1987. Coliformen-Situation in einer Camembert-Käserei. Schweiz. Milchw. Forschung 16:13-20.
- HERSON D. S., B. MCGONIGLE, M. A. PAYER and K. H. BAKER. 1987. Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. Appl. Env. Microbiol. 53:1178-1180.
- HILDEBRANDT G., L. BÖHMER and S. DAHMS. 1995. Three-class attributes plans in microbiological quality control: A contribution to the discussion. J. Food Protect. 58:784-790.
- HOPPE J. E., M. HERTER S. ALEKSIC, T. KLINGEBIEL and D. NIETHAMMER. 1993. Catheter-related *Rahnella aquatilis* bacteremia in a pediatric bone marrow transplant recipient. J. Clin. Microbiol. 31:1911-1912.
- HUMPHREYS H. 1992. Microbes in the air-when to count (the role of air sampling in hospitals). J. Med. Microbiol. 37:81-82.
- HUYS G., M. VANCANNEYT, R. COOPMAN, P. JANSSEN, E. FALSSEN, M. ALTWEGG and K. KERSTERS. 1994. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:651-658.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Microbiological Societies). 1988. Application of the HACCP System to Ensure Microbiological Safety and Quality. *Dans* Micro-organisms in food, Vol. 4. Blackwell Scientific Publications Editeur. 241-245.

IKEMOTO S., H. KURAISHI, K. KOMAGATA, R. AZUMA, T. SUTO and H. MUROOKA. 1978. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas species*. J. Gen. Appl. Microb. 24:199-213.

ILSI-Europe (International Life Sciences Institute-Europe). 1993. HACCP: a single guide to understanding and applying the Hazard Analysis Critical Control Point concept. ILSI Press, Washington DC.

ISENBERG H. D., T. L. GAVAN, P. B. SMITH, A. SONNENWIRTH, W. TAYLOR, W. J. MARTIN, D. RHODEN and A. BALOWS. 1980. Collaborative investigation of the AutoMicrobic System for *Enterobacteriaceae* biochemical card. J. Clin. Microbiol. 11:694-702.

IZARD D., C. RICHARD and H. LECLERC. 1983. DNA relatedness between *Enterobacter sakazakii* and other members of the genus *Enterobacter*. Ann. Microbiol. 134 A:241-245.

JACQUET J. et O. COIFFIER. 1978. Différenciation rapide des colonies de colibacilles parmi les colonies de coliformes. Lait 573-574:111-117.

JOLY-GUILLOU M. L., E. BERGOGNE-BEREZIN and J. F. VIEU. 1990. Epidémiologie et résistance aux antibiotiques des *Acinetobacter* en milieu hospitalier, bilan de 5 années. Presse Médic. 19:357-361.

JORGENSEN J. H., J. E. JOHNSON, G. A. ALEXANDER, R. PAXSON and G. L. ALDERSONM. 1983. Comparison of automated and rapid manual methods for the same-day identification of *Enterobacteriaceae*. Americ. J. Clin. Pathol. 79:683-687.

Journal officiel de la République Française. 1991. Hygiène alimentaire - Textes généraux - 1488-I.

JOUE J. L. 1993. La qualité microbiologique des aliments: Produits laitiers, p.11-37/232-281 *Dans* Polytechnica Europe Media Dupplication (ed.), La qualité microbiologique des aliments - Maîtrise et critères.

JUNI E. 1978. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. Annual Rev. Microbiol. 32:349-371.

KANG Y.-J. and J. F. FRANK. 1989. Biological aerosols: a review of air borne contamination and its measurement in dairy processing plants. J. Food Protect. 52:512-524.

KHAN M. R., M. A. BASHAR, U. K. SHAHA and Z. RAHIM. 1985. Presence of fecal coliform bacteria in the cone ice-cream samples. Bangladesh J. Bot. 14:95-96.

KLEINMAN M. B., S. D. ALLEN, P. NEAL and J. REYNOLDS. 1981. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. J. Clin. Microbiol. 14:352-354.

KLEISS T. 1992. Staphylococci in a whey powder plant environment. An ecological survey as a contribution to HACCP studies. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Université de Zürich.

KLEISS T., P. DEBERGHES, M. DURRER, Y. FUHRER and J.-L. CORDIER. 1995. Identification of environmental staphylococci and coliforms by the Vitek Auto Microbic System. Food Microbiol. 12:199-202.

KLEISS T., M. VAN SCHOTHORST, J.-L. CORDIER and F. UNTERMANN. 1994. Staphylococci in a whey powder plant environment: an ecological survey as a contribution to HACCP studies. Food Control 5:196-199.

KLINE M. W. 1988. *Citrobacter* meningitis and brain abscess in infancy: epidemiology, pathogenesis, and treatment. J. Pediatr. 113:430-474.

KLINE M. W., S. L. KAPLAN, E. P. HAWKINS and E. O. MASON. 1988a. Pathogenesis of brain abscess formation in an infant rat model of *Citrobacter diversus* bacteremia and meningitis. J. Infect. Dis. 157:106-112.

KLINE M. W., E. MASON and S. L. KAPLAN. 1988b. Characterization of *Citrobacter diversus* strains causing neonatal meningitis. J. Infect. Dis. 157:101-105.

KLINE M. W., E. O. MASON and S. L. KAPLAN. 1989. Epidemiologic marker system for *Citrobacter diversus* using outer membrane protein profiles. J. Clin. Microbiol. 27:1793-1796.

KNIGHT M. T., D. W. WOOD, J. F. BLACK, J. GOSNEY, R. O. RIGNEY and J. R. AGIN. 1990. Gram-Negative Identification card for identification of *Salmonella*, *Escherichia coli*, and other *Enterobacteriaceae* isolated from foods: collaborative study. J. Assoc. Anal. Chem. 73:729-733.

KNITTEL M. D. 1975. Occurrence of *Klebsiella pneumoniae* in surface waters. Appl. Microbiol. 29:595-597.

- KOLMOS H. J., A. LERCHE, K. KRISTOFFERSEN and V. D. ROSDAHL. 1994. Pseudo-outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* HIV-infected patients undergoing fiberoptic bronchoscopy. Scandinavian J. Infect.Dis. 26:653-658.
- KORNACKI J. L. and E. H. MARTH. 1982. Foodborne illness caused by *Escherichia coli*: A review. J. Food Prot. 46:1061-1067.
- LAMBERT P. A. 1988. *Enterobacteriaceae*: composition, structure and function of the cell envelope. J. Appl. Bacteriol. Sympos. Suppl.:21S-34S.
- LAMBERT-ZECHOWSKY N., E. BINGEN, E. DENAMUR, N. BRAHIMI, P. BRUN, H. MATHIEU and J. ELION. 1992. Molecular analysis provides evidence for the endogenous origin of bacteremia and meningitis due to *Enterobacter cloacae* in an infant. Clin. Infect. Dis. 15:30-32.
- LAMOUREUX J. C. 1994. Les infections à l'hôpital: Un bilan inquiétant. La Rech. 266:702-705.
- LE PENNEC M. P., Y. PEAN, A. BOISIVON, J. BEJOT, L. BERARDI-GRASSIAS, A. EME, B. HACQUARD, J. MORICE et M. ROUCHON. 1990. Epidémiologie et résistance aux antibiotiques d'*Acinetobacter* dans 9 hôpitaux généraux d'Ile-de-France. Presse Médic. 19:1505.
- LECLERC H., F. GAVINI et C. OGER. 1981. Les indicateurs bactériens dans le contrôle bactériologique de l'eau: exigences et limites. J. Français d'Hydrol. 12, fasc. 2:213-228.
- LECLERC H. et C. HASLAY. 1993. Microbiologie des Eaux d'Alimentation, Dans Technique et Documentation. Contrôle Bactériologique. Lavoisier Editeur. 93-123.
- LEWIS M. L., J. R. STEPHENSON, J. GERNER, F. AFSHAR and S. TABAQCHALI. 1989. A hospital outbreak of *Serratia marcescens* in neurosurgical patients. Epidemiol. Infect. 102:69-74.
- LIDWELL O. M., W. C. NOBLE and G. W. DOLPHIN. 1959. The use of radiation to estimate the numbers of microorganisms in airborne particles. J. Hyg. (Cambridge) 57:299-308.
- LINDQUIST S. et E. A. CRAIG. 1988. The heat shock proteins. Ann. Rev. Genet. 22:631-677.
- LÜCK H. and B. LATEGAN. 1983. Comparison of tests for determining the number of total coliforms and faecal coliforms in milk products. South Afr. J. Dairy Technol. 15:7-9.
- LUQUET F. M. 1985. Laits et produits laitiers - Vaches, Brebis, Chèvres, Vol. 2. Technique et Documentation Editeur.

- MACIAS E. A., M. F. DAVILA, G. K. ADAMS and J. D. BARRY. 1995. Comparison of five commercial systems for identification of Gram-negative clinical isolates. Abstracts of the 95th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington Conventional Center, Washington D.C., C-309, p. 54.
- MAHASNEH A. M. and F. A. HASWAH. 1981. Microbial contamination of ice cream in the city of Amman. *Jordan Medic. J.* 15:65-72.
- MANI S., S. C. EDBERG and J. E. PATTERSON. 1992. Community-acquired bacteremia due to multiresistant *Enterobacter* in a patient with urosepsis. *Clin. Infect. Dis.* 15:565-566.
- MARAKI S., G. SAMONIS, E. MARNELAKIS and Y. TSELENTIS. 1994. Surgical wound infection caused by *Rahnella aquatilis*. *J. Clin. Microbiol.* 32:2706-2708.
- MARR A. G. and J. L. INGRAHAM. 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 84:1260-1267.
- MCCORMACK R. C. and C. M. KUNIN. 1966. Control of a single source nursery epidemic due to *Serratia marcescens*. *Pediatr.* 37:750-755.
- MCCRACKEN G. H. and S. G. MIZE. 1976. A controlled study of intrathecal antibiotic therapy in gram-negative enteric meningitis of infancy: report of the neonatal meningitis cooperative study group. *J. Pediatr.* 89:66-72.
- MCKENZIE E.F.N., E. N. TAYLOR and V. E. GILBERT. 1948. Recent experiences in the rapid identification of *Bacterium coli*, type I. *J. Gen. Microbiol.* 2:197-204.
- MONROE P. W. and W. L. TIFT. 1979. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*). *J. Clin. Microbiol.* 10:850-851.
- MONTGOMERIE J. Z., P. B. DOAK, D. E. M. TAYLOR, J. D. K. NORTH and W. J. MARTIN. 1970. *Klebsiella* in faecal flora of renal-transplant patients. *Lancet* 2:787-791.
- MORGAN M. G., C. STUART, A. T. LEANORD, M. ENRIGHT and G. E. COLE. 1992. *Citrobacter diversus* brain abscess: case reports and molecular epidemiology. *J. Med. Microbiol.* 36:273-178.
- MOSS C. W., and S. B. DEES. 1975. Identification of microorganisms by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of cellular fatty acids. *J. Chromatogr.* 112:595-604.

- MOSS, C. W. 1981. Gas-liquid chromatography as an analytical tool in microbiology. *J. Chromatogr.* 203:337-347.
- MOSSEL D. A. A. 1967. Ecological principles and methodological aspects of the examination of foods and feeds for indicator microorganisms. *J. A. O. A. C.* 50:91-104.
- MOSSEL D. A. A. 1978. Index and indicator organisms - a current assessment of their usefulness and significance. *Food Technol. Australia* 30:212-219.
- MOSSEL D. A. A. 1982. Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. *Antonie van Leeuwenhoek* 48:609-611.
- MOSSEL D. A. A., H. VAN DER ZEE, A. P. HARDON and P. VAN NETTEN. 1986. The enumeration of thermotrophic types amongst the *Enterobacteriaceae* colonizing perishable foods. *J. Appl. Bacteriol.* 60:289-295.
- MULLER-SERIEYS C., J. B. LESQUOY, E. PEREZ, A. FICHELE, B. BOUJEOIS, M. L. JOLY-GUILLOU and E. BERGOGNE-BEREZIN. 1989. Infections nosocomiales à *Acinetobacter*. *Presse Médic.* 18:107-110.
- MUYTJENS H. L., J. VAN DER ROS-VAN DE REPE and H. A. M. VAN DRUTEN. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the α -glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *Int. J. Clin. Microbiol.* 20:684-686.
- MUYTJENS H. L., H. ROELOFS-WILLEMSE and G. H. J. JASPAR. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 26:743-746.
- MUYTJENS H. L., H. C. ZANEN, H. J. SONDERKAMP, L. A. KOLLEE, I. K. WACHSMUTH and J. J. FARMER. 1983. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* 18:115-120.
- MUYTJENS H. L. and L. A. A. KOLLEE. 1990. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9:372-373.
- NEIDHART F. C. and R. A. VANBOGELEN. 1981. Positive regulatory gene for temperature-controlled proteins in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100:894-900.
- NICHOLSON D. P. and J. A. KOEPKE. 1979. The AutoMicrobic System for urines. *J. Clin. Microbiol.* 10:823-833.

NIKAIDO H. and M. VAARA. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49:1-32.

NOTERMANS S., G. GALLHOFF, M. H. ZWIETERING and G. C. MEAD. 1994a. The HACCP concept specification of criteria using quantitative risk assessment. *Food Microbiol.* 11:397-408.

NOTERMANS S., M. H. ZWIETERING and G. C. MEAD. 1994b. The HACCP concept: identification of potential hazardous micro-organisms. *Food Microbiol.* 11:203-214.

NORIEGA F.R., K.L. KOTLOFF, M.A. MARTIN and R.S. SCHWALBE. 1991. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9:447-449.

O'HARA C. M., D. L. RHODEN and J. MILLER. 1992. Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*: A new look at an old product. *J. Clin. Microbiol.* 30:123-125.

O'HARA C. M., F. C. TENOVER and J. M. MILLER. 1993. Parallel comparison of API 20E, Vitek GNI, Microscan Walk/Away rapid ID, and Becton Dickinson Cobas Micro ID-E/NF for identification of members of the family *Enterobacteriaceae* and common Gram-negative, non-glucose-fermenting bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 31:3165-3169.

OGDEN I. D. and A. J. WATT. 1991. An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 13:212-215.

OGER C. et H. LECLERC. 1977. Essai de nouveaux tests "haute température" pour la mise en évidence des coliformes fécaux et des *E. coli* dans les eaux. *Microbiol.* 3: 47-55.

OHSUGI T., K. SHIMODA, K. MAEJIMA, N. KAGIYAMA, H. TAKAGI and T. NOMURA. 1993. Isolation of *Acinetobacter calcoaceticus* from the gastrointestinal tracts of SCID mice. *Lab. Animals* 27:226-228.

ORSKOV I. 1984. Genus V. *Klebsiella*. In: N.R. Krieg and J.G. Holt (Eds.), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1, Williams and Wilkins, London, pp. 461-465.

OTENHAJMER I., Z. MIJACEVIC and R. ASANIN. 1989. Incidence of pathogenic *E. coli* strains in milk and milk products. *ACTA Veterinaria* 39:127-137.

- PHIL D. 1981. The Microbiology of Milk. *Dans Dairy Microbiology*, Vol. 1. R. K. Robinson Editeur.
- PICARD B. and P. GOULLET. 1990. Epidemiological typing of *Acinetobacter* strains by esterase electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 72:229-234.
- PLORDE J. J., J. A. GATES, L. G. CARLSON and F. C. TENOVER. 1986. Critical evaluation of the Automicrobic sytem Gram-Negative Identification card for identification of glucose-nonfermenting Gram-negative rods. *J. Clin. Microbiol.* 23:251-257.
- PORNULL K. J., E. GORANSSON, A. S. RYTTING and K. DORNBUSCH. 1993. Extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in European septicaemia isolates. *J. Antimicrob. Chemotherapy* 32:559-570.
- POSTUPA R. and E. ALDOVA. 1984. *Enterobacter sakazakii*: A Tween 80 esterase-positive representative of the genus *Enterobacter* isolated from powdered milk specimens. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immun.* 28:435-440.
- POWERS E. M. 1976. Microbiological criteria for food in military and federal specifications. *J. Milk Food Technol.* 39:55-58.
- PRITCHARD T. J., C. M. BELIVEAU, K. J. FLANDERS and C. W. DONNELLY. 1995. Environmental surveillance of dairy processing plants for the presence of *Yersinia* species. *J. Food Protect.* 58:395-397.
- RADMORE K. and H. LÜCK. 1984. Microbial contamination of dairy factory air. *S. Afr. J. Dairy Technol.* 16:119-123.
- RADMORE K., W. H. HOLZAPFEL and H. LÜCK. 1988. Proposed guidelines for maximum acceptable air-borne microorganism levels in dairy processing and packaging plants. *Int. J. Food Microbiol.* 6:91-95.
- RAMADE F.. 1981. *Ecologie des ressources naturelles. Ecologie appliquée et sciences de l'environnement* 4. Masson Editeur, p. 5-14.
- RAO D. V. and K. R. G. RAO. 1983. Incidence of *Klebsiella* in foods and water. *J. Food Sci. Technol.* 20:265-268.
- Recueil de Normes Françaises. 1993. Contrôle de la qualité des produits alimentaires, contrôle microbiologique - AFNOR-DGCCRF. Louis-Jean Editeur, p. 85, 113, 193-205.

RENAUD F., J. FRENEY, F. GAVINI, J. M. BOEUFGRAS and J. FLEURETTE. 1990. Comparaison de deux systèmes d'identification d'entérobactéries coliformes nouvellement décrites ou rarement rencontrées en clinique. *Ann. Biol. Clin.* 48:111-115.

RESTAINO L., E. W. FRAMPTON and R. H. LYON. 1990. Use of the chromogenic substrate 5-bromo-4 chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) for enumeration *Escherichia coli* on 24 hours from ground beef. *J. Food Protect.* 53:508-510.

RICHARD C. 1985. Un milieu permettant l'identification rapide et économique des colonies lactose+ de *Escherichia coli* : le bouillon lactose bilié vert brillant tryptophane. *Ann. Institut Pasteur/Microbiol.* 136B:249-252.

RICHARD C. 1988. *Enterobacteriaceae*: genres et espèces en 1988. *Ann. Biol. Clin.* 46:781-785.

RICHARD C. 1989. Nouvelles *Enterobacteriaceae* rencontrées en bactériologie médicale: *Moellerella wisconsensis*, *Koserella trabulsii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia fergusonii*, *Enterobacter asbitiae*, *Rahnella aquatilis*. *Ann. Biol. Clin.* 47:231-236.

RICHARD C. 1994. A propos de la définition des *Enterobacteriaceae*. *Technique et Biologie* 4:96-103.

RILEY L. W., R. S. REMIS, S. D. HELGERSON, H. B. MCGEE, J. G. WELLS, B. R. DAVIS, R. J. HEBERT, E. S. OLCOTT, L. M. JOHNSON, N. T. HARGRETT, P. A. BLAKE and M. L. COHEN. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England J. Med.* 308:681-685.

ROBERTS R. G., S. T. RAYMOND and R. J. McLAUGHLIN. 1989. Evaluation of mature apple fruit from Washington State for the presence of *Erwinia amylovora*. *Plant Dis.* 73:917-921.

ROBINSON A., Y. S. MCCARTER and J. TETREAULT. 1995. Comparison of crystal enteric/nonfermenter system, API 20E system, and Vitek Automicrobic System for identification of Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 33:364-370.

ROHMER P. Mai 1995. HACCP : méthodologie et applications pour les produits appertisés. *IAA*:279-282.

ROSSET P., G. POUMEYROL, E. MORELLI and N. CHASSANG. 1992. Qualité microbiologique des appareils de production de café-boisson: surfaces et café moulu utilisé. *Microbiol.-Al.-Nutr.* 10:279-282.

ROSZAK D. B. and R. R. COLWELL. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51:365-379.

RYAN C. A., R. V. TAUXE, G. W. HOSEK, J. G. WELLS, P. A. STOESZ, H. W. MCFADDEN, P. W. SMITH, G. F. WRIGHT and P. A. BLAKE. 1986. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: Clinical, epidemiological, and pathological findings. *J. Infect. Dis.* 154:631-638.

SAITO H., L. ELTING, G. P. BODEY and P. BERKEY. 1989. *Serratia* bacteremia: Review of 118 cases. *Rev. Infect. Dis.* 11:912-920.

SAMONIS G., E. ANAISSIE, L. ELTING and G. P. BODEY. 1991. Review of *Citrobacter* bacteremia in cancer patients over a sixteen-year period. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:479-485.

SCHLEIFER K.-H. and E. KRAEMER. 1980. Selective medium for isolating staphylococci. *Zentralbl. Bakteriол. Hyg. I. Abt. Orig. C1*:270-280.

SCHWAB A. H., A. SCHWARZENTRUBER, B. A. WENTZ and R. B. READ. 1982. Microbiological quality of dry-milk mixes and milk substitute infant formulas. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:389-391.

SCULLY R. E., M.D., E. J. MARK, M.D., W. F. Mc NEELY, M.D. and B. Mc NEELY. 1993. Case records of the Massachusetts general hospital. *New Engl. J. Medicine* 329:714-721.

SEIDLER R. J. 1981. The genus *Klebsiella* (Nonmedical aspects). In: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows and H. G. Schlegler (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Vol. 2, Springer-Verlag, New-York, NY, pp. 1166-1172.

SEIDLER R. J., M. D. KNITTEL and C. BROWN. 1975. Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. *Appl. Microbiol.* 29:819-825.

SEIFERT H., R. BAGINSKI, A. SCHULZE and G. PULVERER. 1993. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl. Bakteriол.* 279:544-552.

SHAYEGANI M., P. S. MAUPIN and D. Mc GLYNN. 1978. Evaluation of the API 20E system for identification of nonfermentative Gram-negative bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 7:539-545.

SILBERT D. F. and P. R. VAGELOS. 1967. Fatty acid mutant of *E. coli* lacking a β -hydroxydecanoyl thioester dehydrase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 58:1579-1586.

SILLIKER J. H. and D. A. GABIS. 1975. A cellulose sponge sampling technique for surfaces. J. Milk Food Technol. 38:504.

SIMONSEN B., F. L. BRYAN, J. H. B. CHRISTIAN, T. A. ROBERTS, R. B. TOMPKIN and J. H. SILLIKER. 1987. Prevention and control of food-borne salmonellosis through application of HACCP. Int. J. Food Microbiol. 4:227-247.

SIMMONS B. P., M. S. GELFAND, M. HAAS, L. METTS and J. FERGUSON. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. Infect. Control. Hospit. Epidemiol. 10:398-401.

SORIANO A. L., R. J. RUSSELL, D. JOHNSON, R. LAGOS, I. SECHTER and J. G. MORRIS. 1991. Pathophysiology of *Citrobacter diversus* neonatal meningitis: comparative studies in an infant mouse model. Infect. Immun. 59:1352-1358.

STAMM W. E., C. A. KOLFF, E. M. DONES, R. JAVARIZ, R. L. ANDERSON, J. J. FARMER and H. R. DE QUINONES. 1976. A nursery outbreak caused by *Serratia marcescens*-scalp-vein needles as a portal of entry. J. Pediatr. 89:96-99.

STEAD D. E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:281-295.

TAIBI C. L. 1989. Méthodes de mesure et sources de contamination / Transmission des micro-organismes. Dans Guide pratique d'hygiène hospitalière - L'infection existe, sa prévention aussi. C.R.E.P.H.A. LYON. CLT Editeur. 29-198.

TALBOT H. W., J. E. MORROW and R. J. SEIDLER. 1977. Nutritional factors associated with the presence of *Klebsiella* in the environment. Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. 77:262.

TAMMINGA S. K., R. R. BEUMER and E. H. KAMPELMACHER. 1980. Bacteriological examination of ice-cream in the Netherlands: Comparative studies on methods. J. Appl. Bacteriol. 49:239-253.

TAYLOR G. J. S. and J. P. LEEMING J.P. 1993. A method for multiple synchronous collection of airborne organisms and the effects on colony counts of various processing procedures. J. Appl. Bacteriol. 74:174-180.

TAYLOR W. R., W. L. SCHELL, J. G. WELLS, K. CHOI, D. E. KINNUNEN, P. T. HEISER and A. G. HELSTAD. 1982. A foodborne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. New England J. Med. 18:1093-1095.

TEBBUTT G. M. 1988. Laboratory evaluation of disposable and reusable disinfectant cloths for cleaning food contact surfaces. Epidemiol. Infect. 101:367-375.

TEBBUTT G. M. 1991a. Development of standardized inspections in restaurants using visual assessments and microbiological sampling to quantify the risks. Epidemiol. Infect. 107:393-404.

TEBBUTT G. M. 1991b. An assessment of cleaning and sampling methods for food-contact surfaces in premises preparing and selling high-risk foods. Epidemiol. Infect. 106:319-327.

TEBBUTT G. M. and J. M. SOUTHWELL. 1989. Comparative study of visual inspections and microbiological sampling in premises manufacturing and selling high-risk foods. Epidem. Inf. 103:475-486.

THECCANAT G., L. HIRSCHFIELD and H. ISENBERG. 1991. *Serratia marcescens* meningitis. J. Clin. Microbiol. 29:822-823.

THEN R. L., R. L. CHARNAS, H. P. KOCHER, M. MANNENBERG, U. ROTH LISBERGER and J. STOCKER. 1988. Biochemical characterization of type A and type B β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. Rev. Infect. Dis. 10:714-720.

THORN P. S., M. S. HIEKHAFER, P. WHITTEN and K. J. DONHAM. 1992. Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. Appl. Environ. Microbiol. 58:2543-2551.

THURM V. and B. GERICKE. 1994. Identification of infant food as a vehicle in a nosocomial outbreak of *Citrobacter freundii*: epidemiological subtyping by allozyme, whole-cell protein and antibiotic resistance. J. Appl. Bacteriol. 76:553-558.

TJERNBERG I. and J. URSING. 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS 97:595-605.

TREMOLIERES J., Y. SERVILLE, R. JACQUOT et H. DUPIN. 1980. Les Aliments. Dans Manuel d'Alimentation Humaine, Tome 2. E.S.F. Editeur.

TULLUS K., B. BERGLUND, B. FRYKLUND, I. KUHN and L. G. BURMAN. 1988. Epidemiology of fecal strains of the family *Enterobacteriaceae* in 22 neonatal wards and influence of antibiotic policy. J. Clin. Microbiol. 26:1166-1170.

URMENYI A. M. C. and A. W. FRANKLIN. 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. Lancet:313-315.

VAN LOOSDRECHT M. C. M., J. LYKLEMA, W. NORDE and A. J. B. ZEHNDER. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. Microbiol. Rev. 54:75-87.

VAN SCHOTHORST M. and S. JONGENEEL. 1992. HACCP, product liability, and due diligence. Food Control 3:122-124.

VAN VUUREN H. J. J., K. KERSTERS, J. DE LEY and D. F. TOERIEN. 1981. The identification of *Enterobacteriaceae* from breweries : combined used and comparison of API 20E system, gel electrophoresis of proteins and gas chromatography of volatile metabolites. J. Appl. Bacteriol. 51:51-65.

VOGEL L. C., L. FERGUSON and S. P. GOTOFF. 1978. *Citrobacter* infections of the central nervous system in early infancy. J. Pediatr. 93:86-88.

VON WIESE W. 1986. Ein Vergleich microbiologischer Qualitätsstandards und Spezifikationen, die im internationalen Handel mit Säuglings- und Kleinkindernahrung angewandt werden. Arch. Lebensmittelhyg. 37:109-128.

WALTER M. V., B. MARTHI, V. P. FIELAND and L. M. GANIO. 1990. Effect of aerosolization on subsequent bacterial survival. Appl. Environ. Microbiol. 56:3468-3472.

WATT K. F. 1973. Principles of environmental sciences, Editions Mac Graw Hill, 320 p.

WEISCHER M. and H. J. KOLMOS. 1993. Ribotyping of selected isolates of *Enterobacter cloacae* and clinical data related to biotype, phage type, O-serotype, and ribotype. APMIS 101:879-886.

WEISCHER M., H. J. KOLMOS, M. E. KAUFMANN and V. T. ROSDAHL. 1993. Biotyping, phage typing, and O-serotyping of clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. APMIS 101:838-844.

WEISS K. F., N. CHOPRA, P. STOTLAND, G. W. RIEDEL and S. MALCOLM. 1983. Recovery of fecal coliforms and of *Escherichia coli* at 44.5, 45.0 and 45.5°C. J. Food Protect. 46:172-177.

- WELLS J. G., B. R. DAVIS, I. K. WACHSMUTH, L. W. RILEY, R. S. REMIS, R. SOKOLOW and G. K. MORRIS. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J. Clin. Microbiol. 18:512-520.
- WESTH H., J. J. CHRISTENSEN, J. BLOM and W. FREDERIKSEN. 1990. Fatal septicaemia with *Selenomonas sputigena* and *Acinetobacter calcoaceticus*. APMIS 99:75-77.
- WESTPHAL, O., K. JANN and K. HUMMELSPACH. 1983. Chemistry and immunochemistry of bacterial lipopolysaccharides as cell wall antigens and endotoxins. Progress in Allergy 33:9-39.
- WILLIAMS R. E. A., A. G. GIBSON, T. C. AITCHISON, R. LEVER and R. M. MACKIE. 1990. Assessment of a contact-plate sampling technique and subsequent quantitative bacterial studies in atopic dermatitis. Brit. J. Dermatol. 123:493-501.
- WILLIAMS W. W., J. MARIANO, M. SPURRIER, H. D. DONNELL, R. L. BRECKENRIDGE, R. L. ANDERSON, I. K. WACHSMUTH, C. THORNSBERRY, D. R. GRAHAM, D. W. THIBEAULT and J. R. ALLEN. 1984. Nosocomial meningitis due to *Citrobacter diversus* in neonates: new aspects of the epidemiology. J. Infect. Dis. 150:229-235.
- WILLIS J. and J. E. ROBINSON. 1988. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. Pediatr. Infect. Dis. J. 7:196-199.
- WILSON G. S. and A. A. MILES. 1964. Principles of bacteriology and immunity, Vol. 1, 5th ed., W. W. C. Topley and G. S. Wilson. Arnold Editeur, London, p. 827.
- WOODHALL M. 1989. The application of hazard analysis and critical control point system to milk powder manufacture. J. Society Dairy Technol., Sympos. paper 42:102-105.
- ZEITOUN A. A. M., J. M. DEBEVERE and D. A. A. MOSSEL. 1994. Significance of *Enterobacteriaceae* as index organisms for hygiene on fresh untreated poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in a modified atmosphere. Food microbiol. 11:169-176.
- ZINGESSER J. A., G. S. BIRKHEAD, M. MAMOLEN and R. L. VOGT. 1990. Air sampling for *Legionella*. JAMA 264:2625-2626.

ANNEXES

ANNEXES

- 1) Dénombrements A1.
- 2) Dénombrements A2.
- 3) Dénombrements B.
- 4) Enregistrement d'une identification d'*Enterobacter sakazakii* en chromatographie phase gazeuse.
- 5) Graphe correspondant à l'annexe 4.

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VPOG	SK	BEA	MGS	CFC	EP	FC
ZONE SECHE PROTEGEE										
I - TOUR 4ème 1/2	1	1 - Air 18/1	7							
	2	1 - Air 18/1		0						
	3	2 - Résidu 18/1 capot de protection des treuils descente passerelle	3 000	<10	10	<10	10	200	<10	<10
	4	2 - Résidu 18/1 aspirateur	3 600	<10	10	1 400	3 000	2 000	<10	<10
	5	2 - Résidu 18/1 aspirateur	2 300	<10	<10	300	700	2 000	<10	<10
	283	1 - Air 20/1	15							
	284	1 - Air 20/1		0						
	286	2 - Résidu 20/1 poudre graisse sur chaîne d'entraînement du ventilateur	<10	<10	10	10	<10	10	<10	<10
	289	2 - Résidu 20/1 lait sec aggloméré sur manche racloir	1 600	2 000	200	200	4 000	4 000	<200	<200
	290	2 - Résidu 20/1 intérieur carter courroies d'entraînement	<20	<20	20	<20	<20	400	<20	<20
	291	2 - Résidu 20/1 lait sec aggloméré sur diaphragme sous buse	400	80	4	4	<4	160	<4	<4
III - TOUR 4ème	6	1 - Air 18/1	21							
	8	1 - Air 18/1		0						
	7	3 - Eponge 18/1 bord fenêtre 300 cm2	72 000	<10	10	<10	10	<80	<10	<10
	9	3 - Eponge 18/1 caniveau devant ascenseur 300 cm2	180 000	<10	10	74 000	110 000	<80	<10	<10
	10	3 - Eponge 18/1 bouche d'égout au fond à droite 450 cm2	480	<10	10	<10	1 600	<10	<10	<10
	11	2 - Résidu 18/1 près mur Ouest sous descente évacuation d'eau	64 000	<10	<10	100	10	<10	<10	<10
	12	2 - Résidu 18/1 sous tuyauterie arrivée lécithine gorge arrondie bordure ciment 50 cm	100	<10	<10	10	10	<10	<10	<10
	13	2 - Résidu 18/1 aspirateur	1 000	<10	<10	10	10	<10	<10	<10
	29	2 - Résidu 18/1 poils de balai	6 000	<40	40	<40	40	<40	<40	<40
	285	2 - Résidu 20/1 sur ventilateur extracteur Nord	120	<6	6	<6	6	<6	<6	<6
	288	2 - Résidu 20/1 sur ventilateur extracteur Sud	640	<4	480	80	640	<4	<4	<4
	294	2 - Résidu 20/1 écailles de peinture provenant du support du treuil	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	14	1 - Air 18/1	26							
	15	1 - Air 18/1		0						
IV - TOUR 3ème	16	3 - Eponge 18/1 chemin de câble à gauche de l'entrée	960	<10	<10	10	10	800	<10	<10
	17	2 - Résidu 18/1 dessus prise d'air extérieur au fond à droite	1 000	<10	10	10	10	<10	<10	<10
	18	3 - Eponge 18/1 800 cm2 eau de condensation de batterie de refroidissement d'air	1,6E+06	67 000	30 000	160 000	1,3E+06	<80	<10	<10
	19	3 - Eponge 18/1 1400 cm2 traces sèches condensation batterie de refroidissement d'air	960	<10	<10	10	<10	<80	<10	<10
	20	2 - Résidu 18/1 aspirateur	400	<10	<10	300	300	<10	<10	<10
	21	4 - Rodac 18/1 poignée couvercle tamis du fond (près du trou)	16							
	22	4 - Rodac 18/1 poignée couvercle tamis du fond (près du trou)		0						
	23	4 - Rodac 18 /1 poignée couvercle tamis près entrée	45							
	24	4 - Rodac 18 /1 poignée couvercle tamis près entrée		0						
	25	2 - Résidu 18/1 sur 1/2 capot tamis près entrée	50	<10	10	10	<10	<10	<10	<10
	28	2 - Résidu 18/1 gant sur poste de stockage de matériel	32 000	<200	<200	200	50 000	<200	<200	<200
	297	1 - Air 20/1	15							
	298	1 - Air 20/1		0						
V - TOUR 2ème	26	1 - Air 18/1	40							
	27	1 - Air 18/1		0						
	32	3 - Eponge 18/1 300 cm2 bord fenêtre droite	<80	<10	10	10	<10	<80	<10	<10
	33	2 - Résidu 18/1 sur batterie de post séchage	10 000	3 800	<20	<20	<20	<20	<20	<20
	34	2 - Résidu 18/1 prise d'air bleue	4 000	<20	<20	600	20	<20	<20	<20
	35	2 - Résidu 18/1 buse d'aspirateur	250 000	1 000	100	90 000	200 000	<1 10	<100	<100
	36	3 - Eponge 18/1 1400 cm2 3 marches d'escalier	13 000	<10	10	17 000	24 000	<80	<10	3 200

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VIBG	SK	BEA	MFG	CFC	DP	PC
VI - POST SECHEUR	39	2 - Résidu 18/1 sur poutrelle métallique	1 200	<10	48 000	6 000	<10	1 200	<10	<10
	40	3 - Eponge 18/1 1000 cm2 bouche d'égoût à gauche	14 000	<10	10	6 400	10 000	<80	<10	<10
	41	3 - Eponge 18/1 300 cm2 caniveau devant ascenseur	160 000	<10	16 000	48 000	50 000	<80	<10	<10
	42	3 - Eponge 18/1 1000 cm2 gorge arrondie sur mur intérieur	2,6E+06	10 000	68 000	1,1E+06	1,3E+06	7 200	<10	800
	299	2 - Résidu 20/1 dans carter protection entrainement ventilateur recyclage poudre	900	6	3	420	120	120	<3	<3
	300	1 - Air 20/1	25							
	301	1 - Air 20/1		0						
	302	2 - Résidu 20/1 arbre moteur recyclage et grille protection	1 100	4 800	560	8 800	11 000	160	<4	<4
	30	1 - Air 18/1	50							
	31	1 - Air 18/1		0						
	37	1 - Air en contrebas 18/1	11							
	38	1 - Air en contrebas 18/1		0						
	43	1 - Air 18/1	32							
	44	1 - Air 18/1		0						
	45	2 - Résidu 18/1 résine epoxy entrée	3 200	<10	10	300	10	<10	<10	<10
	46	1 - Air au fond 18/1	6							
	47	1 - Air au fond 18/1		0						
	48	2 - Résidu 18/1 poussières sur chemin de câbles à gauche	1 000	<10	10	600	10	<10	<10	<10
	49	3 - Eponge 18/1 2000 cm2 pied installation centrale	16000	10	4000	800	10	<80	<10	<10
	50	3 - Eponge 18/1 3500 cm2 dessous piétement au fond	24 000	10	16 000	10	10	<80	<10	<10
	51	4 - Rodac 18/1 couvercle aval au fond	10							
	52	4 - Rodac 18/1 couvercle aval au fond		0						
	53	4 - Rodac 18/1 couvercle amont au fond	255							
	54	4 - Rodac 18/1 couvercle amont au fond		18						
	55	1 - Air 18/1 en haut échelle au fond	44							
	56	1 - Air 18/1 en haut échelle au fond		0						
	57	2 - Résidu 18/1 pied avant droit au fond	200	<20	20	<20	20	<20	<20	<20
	58	4 - Rodac 18/1 couvercle caoutchouc en aval du tamis vers 1er	55							
	59	4 - Rodac 18/1 couvercle caoutchouc en aval du tamis vers 1er		0						
	60	4 - Rodac 18/1 couvercle aval en contrebas	25							
	61	4 - Rodac 18/1 couvercle aval en contrebas		0						
	62	3 - Eponge 18/1 1500 cm2 bouche d'égoût devant entrée	3,0E+06	200 000	<10	1,0E+06	3,0E+06	430 000	<10	24000
	63	3 - Eponge 18/1 1500 cm2 bouche d'égoût à gauche	1,6E+06	90 000	48 000	640 000	190 000	160 000	<10	<10
	64	3 - Eponge 18/1 2000 cm2 bord de trou sous tôle en métal coin gauche au fond	8 000	10	10	10	10 L	<80	<10	<10
	65	3 - Eponge 18/1 1200 cm2 3 marches d'escalier	400 000	<10	60 000	55 000	64 000	9 600	36 000	5 600
	66	3 - Eponge 18/1 3000 cm2 poutrelle parallèle au post sécheur près entrée	140 000	10	12 000	2 400	10	<80	10	<10
	67	1 - Air 18/1 vers 1er	4							
	68	1 - Air 18/1 vers 1er		0						
	69	2 - Résidu 18/1 passerelle métallique au fond	5 200	<20	<20	20	20	<20	<20	<20
	70	3 - Eponge 18/1 coulée dépôts divers post sécheur au fond	2 000	<10	10	10	10	<80	<10	<10
	71	3 - Eponge 18/1 bouche d'égoût en contrebas	24 000	<10	8 000	2 400	10	<80	<10	<10
	304	2 - Résidu 20/1 sur bouchon métallique tête amont au fond	1 800	<200	200	200	<200	<200	<200	<200
	305	5 - Ecouvillon 20/1 rebord bouchon de vidange au fond	12 000	<12	12	<12	13000 L	<12	<12	<12
	306	2 - Résidu 20/1 dessus tête amont	16 000	<100	<100	<100	<100	1 000	<100	<100
	307	1 - Air 20/1	20							
	308	1 - Air 20/1		0						
	309	2 - Résidu 20/1 dessus tête amont	480 000	<200	200	<200	200 000	<200	<200	<200
	310	3 - Eponge 20/1 eau résiduelle sur joint de hublot	<80	<10	<10	<10	<10	<80	<10	<10

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VRDG	SK	DEA	M'S	CFC	EP	FC
	311	2 - Résidu 20/1 carter protège axe écluse sortie égron	320	2 300	4	<4	400	1 400	<4	<4
	312	1 - Air 20/1 au fond	7							
	313	1 - Air 20/1 au fond		0						
	314	2 - Résidu 20/1 sur bouchon métallique et joint dessus refroidisseur	Moisissures	<30	30	<30	<30	<30	<30	<30
	315	2 - Résidu 20/1 tuyau dessus post sécheur	7 000	8 400	20	20	5 200	<20	<20	<20
	316	2 - Résidu 20/1 écailles peinture rail support treuil couvercle post refroidisseur	200	10	<10	<10	200	200	<10	<10
	317	1 - Air 20/1 vers 1er	20							
	318	1 - Air 20/1 vers 1er		1						
II - ESCALIER/ASCENSEUR	168	3 - Eponge 19/1 sol coin gauche au fond ascenseur 400 cm2	110 000	<10	<10	800	10	<80	<10	<10
	282	2 - Résidu 20/1 escalier vers terrasse mouches	2800	<20	2400	<20	2400	<20	<20	<20
	287	3 - Eponge 20/1 escalier d'accès 4ème 1/2 coulées sur mur gauche niveau câblage	<80	<10	<10	<10	<10	<80	<10	<10
	295	2 - Résidu 20/1 sas sortie terrasse mouches dans cage d'escalier	48 000	<100	<100	<100	21000 L	2000	<100	<100
	296	2 - Résidu 20/1 escalier 4ème dessus cabine douches poutrelle côté câblage	4 800	4 000	10	200	1 200	600	<10	<10
	303	2 - Résidu 20/1 balayures sol ascenseur	1 600	<4	1 800	160	2 200	240	<4	<4
	319	2 - Résidu 20/1 escalier 1er et 2ème étage balayures sur marches	130 000	8 800	56 000	17 000	80 000	5 800	<10	800
VII - STOCK TOTES	72	1 - Air 18/1 passerelle 1 1/2 ->1er	1							
	73	1 - Air 18/1 passerelle 1 1/2 ->1er		0						
	74	3 - Eponge 18/1 pas de porte vers 1er	220 000	<10	100 000	18 000	10	<80	10	5 600
	75	4 - Rodac 18/1 porte de séparation 1er 1/2 -> 1er côté 1er	17							
	76	4 - Rodac 18/1 porte de séparation 1er 1/2 -> 1er côté 1er		0						
	77	3 - Eponge 18/1 1 m2 pas de porte devant salle de contrôle	190 000	10	88 000	2 400	130 000	2 400	10	1 600
	78	3 - Eponge 18/1 1/4 surface roue Fenwick n°18	37 000	<10	3 200	800	4 000	8 000	<10	<10
	79	1 - Air 18/1 1 1/2 ->1er	7							
	80	1 - Air 18/1 1 1/2 ->1er		0						
	81	2 - Résidu 18/1 rebord mur et tuyauterie à gauche porte 1 1/2 -> 1er	1 200	<10	<10	10	10	<10	<10	<10
	82	2 - Résidu 18/1 sac poubelle	3 500	30	10	10	10	1 500	10	<10
	83	3 - Eponge 18/1 300 cm2 tuyau de remplissage big-bag	Moisissures	<10	1 600	<10	10	<80	<10	<10
	84	3 - Eponge 18/1 fenêtre porte de contrôle 1m2	800	<10	<10	<10	<10	<80	<10	<10
	85	1 - Air 18/1	14							
	86	1 - Air 18/1		0						
	87	2 - Résidu 18/1 support de marche + piètement plateforme 1 1/2 -> 1er	96 000	80	88 000	96 000	20	2 000	20	<20
	88	2 - Résidu 19/1 fissures sol à côté poste de remplissage toles	1 200	<10	600	10	200	<10	<10	<10
	89	1 - Air 19/1 salle stock totes	23							
	90	1 - Air 19/1 salle stock totes		0						
	91	4 - Rodac 19/1 hublot sur vis Paris partie diagonale vers le haut	13							
	92	4 - Rodac 19/1 hublot sur vis Paris partie diagonale vers le haut		0						
	93	4 - Rodac 19/1 hublot fissuré sur vis Paris partie horizontale	45							
	94	4 - Rodac 19/1 hublot fissuré sur vis Paris partie horizontale		0						
	95	3 - Eponge 19/1 900 cm2 surface supérieure tote n°11	1 600	<10	<10	<10	10	<80	<10	<10
	96	3 - Eponge 19/1 face intérieure couvercle du tote n°11	960	<10	<10	<10	10	<80	<10	<10
	97	1 - Air 19/1	7							
	98	1 - Air 19/1		0						
	99	2 - Résidu 19/1 chemin de câbles sous passerelle métallique 1 1/2 -> 1er	700	200	10	<10	600	<10	<10	<10
	100	2 - Résidu 19/1 sur poutrelle horizontale niveau muret séparation	2 600	540	10	10	1 600	60	<10	<10
	101	2 - Résidu 19/1 jonction sol/mur, ciment 1,4 m x 5 cm	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	102	2 - Résidu 19/1 poutrelle métallique sous remplissage toles, poste pilotage	1 800	70	<10	10	10	200	<10	<10
	103	2 - Résidu 19/1 armature piètement machines vidange toles	600	<10	10	10	10	200	<10	<10

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VIBG	SK	BEA	MFG	CFC	DP	PC
	104	2 - Résidu 19/1 dessous ptiement et sol, niveau muret de séparation	1 400	<10	10	2 400	1 400	<10	<10	<10
	105	1 - Air 19/1 salle au fond	7							
	106	1 - Air 19/1 salle au fond		0						
	107	2 - Résidu 19/1 rebord fenêtre, au niveau de la rigole	4,0E+07	130 000	260 000	400	480000 L	1,6E+07	<20	<20
	108	2 - Résidu 19/1 support fixation métallique d'un tuyau près ascenseur	320 000	430	56 000	<10	48 000	<10	<10	<10
	109	3 - Eponge 19/1 fenêtre près ascenseur	32 000	<10	10	10	17 000	<80	<10	64 000
	110	3 - Eponge 19/1 3200 cm2 dessus pupitre de commande des machines vidange toles sacs	110 000	<10	10	10	16000 L	24 000	<10	<10
	111	2 - Résidu 19/1 dessus butoir métallique sous fenêtres près ascenseur 150 x 20 cm	64 000	1 900	20	20	16 000	11 600	<20	<20
	112	2 - Résidu 19/1 sous pied d'ancrage transport poudre pour sacs près mur	360	200	280	2	160	<2	<2	<2
	113	4 - Rodac 19/1 palette en bois sur le sol	35							
	114	4 - Rodac 19/1 palette en bois sur le sol		0						
	115	4 - Rodac 19/1 surface d'un carton boîtes fer blanc vides	2							
	116	4 - Rodac 19/1 surface d'un carton boîtes fer blanc vides		0						
	117	2 - Résidu 19/1 poils de balai	11 000	9 200	<200	<200	4000 L	12 000	<200	<200
	118	3 - Eponge 19/1 400 cm2 ramasse-poussière	11 000	<10	10	<10	10	<80	<10	<10
	119	2 - Résidu 19/1 plate-forme machines vidange étuis 80 x 40 cm	14 000	3 000	15 000	400	7 000	5 800	<10	<10
	120	3 - Eponge 19/1 pupitre de commande vertical 9000 cm2	4 000	<10	10	<10	10	<80	<10	<10
	121	1 - Air 19/1	0							
	122	1 - Air 19/1		0						
	123	3 - Eponge 19/1 feuilles de carton posées sur boîtes vides	<80	<10	<10	<10	10	<80	<10	<10
	124	2 - Résidu 19/1 chiffon sale derrière toles	1 000	<10	<10	<10	<10	400	<10	<10
	125	2 - Résidu 19/1 copeaux de bois, grains, poussières côté stockage palettes bois	2 000	200	200	10	1 000	<10	<10	<10
	126	2 - Résidu 19/1 morceaux de carton de séparation boîtes vides	4 400	70	<10	<10	1 400	3 000	<10	<10
	127	3 - Eponge 19/1 dessus lance d'incendie 2500 cm2	16 000	10	10	<10	10	<80	<10	<10
	130	4 - Rodac 19/1 porte transport poudre vers sacs	15							
	131	4 - Rodac 19/1 porte transport poudre vers sacs		0						
	132	4 - Rodac 19/1 porte transport poudre vers sacs	7							
	133	4 - Rodac 19/1 porte transport poudre vers sacs		0						
	134	2 - Résidu 19/1 machine vidange toles sacs bâll et bloc moteur T2	1 800	680	400	<10	600	600	<10	<10
	135	3 - Eponge 19/1 plate-forme machines vidange toles 4000 cm2	220 000	480	72 000	10	80 000	9 600	<10	<10
	136	3 - Eponge 19/1 entrée local chaufferie 900 cm2	260 000	<10	20 000	6 400	46 000	<80	<10	<10
	138	2 - Résidu 19/1 machine vidange toles - boîtier n°2 niveau bloc moteur	240	200	10	10	600	400	<10	<10
	139	3 - Eponge 19/1 plate-forme transport poudre vers sacs 8400 cm2	110 000	1 400	32 000	10	10	<80	<10	<10
	140	3 - Eponge 19/1 tableau com. dessus et face près mach. trans. poudre vers sacs 6000 cm2	20 000	<10	6 400	10	<10	<80	<10	<10
	141	3 - Eponge 19/1 machine vidange toles armature 180 cm2	260 000	<10	24 000	<10	10	32 000	<10	<10
	150	3 - Eponge 19/1 5000 cm2 feuille carton posée sur boîtes vides	43 000	<10	10	<10	10	<80	<10	<10
	151	3 - Eponge 19/1 6500 cm2 lapis métallique	Moisissures	<10	<10	<10	10	<80	<10	<10
	153	2 - Résidu 19/1 40 x 10 cm angle mur/sol près salle stock boîtes vides	Moisissures	400	10	<10	10	<10	<10	<10
	161	2 - Résidu 19/1 support big bag balance n°1	720	240	3	<3	3	<3	<3	<3
	166	4 - Rodac 19/1 poignée ascenseur	6							
	167	4 - Rodac 19/1 poignée ascenseur		0						
	170	3 - Eponge 19/1 900 cm2 sous palletiseur	4 800	640	<10	<10	<10	4 000	<10	<10
	182	3 - Eponge 19/1 roue avant droite du chariot échantillons	220 000	8 800	10	800	10	12 000	10	<10
VIII - STOCK BOITES VIDES	128	1 - Air 19/1 près entrée	3							
	129	1 - Air 19/1 près entrée		0						
	142	1 - Air 19/1 au fond	5							
	143	1 - Air 19/1 au fond		0						
	144	4 - Rodac 19/1 carton de séparation palettes	20							

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VFDG	SK	DEA	MFS	CFC	EP	FC
XVIII - LIGNE SACS	145	4 - Rodac 19/1 carton de séparation palettes		0						
	152	2 - Résidu 19/1 angle mur/sol, insectes, poussières	1,0E+07	3 700	1 600	<5	<5	25 000	<5	<5
	156	2 - Résidu 19/1 niveau fenêtre poudre, insectes, poussières	1 000	400	10	<10	1200 L	<10	<10	<10
	183	1 - Air 19/1 au centre	8							
	184	1 - Air 19/1 au centre		0						
	173	4 - Rodac 19/1 couvercle sur ouverture en aval porte plate-forme	4							
	174	4 - Rodac 19/1 couvercle sur ouverture en aval porte plate-forme		0						
	175	4 - Rodac 19/1 panneau accès au tapis de transport à droite plate-forme	4							
	176	4 - Rodac 19/1 panneau accès au tapis de transport à droite plate-forme		0						
	177	1 - Air 19/1 plate-forme	10							
	178	1 - Air 19/1 plate-forme		0						
	179	4 - Rodac 19/1 couvercle sur vis de transport plate-forme	42							
	180	4 - Rodac 19/1 couvercle sur vis de transport plate-forme		1						
	181	2 - Résidu 19/1 sous 1ere plate-forme poutrelle de soutien dessus vis transport	5 400	2 400	30	<30	4 800	600	<30	<30
	194	1 - Air 19/1	5							
	195	1 - Air 19/1		0						
	261	5 - Ecouvillon 19/1 500 cm2 tapis vers extérieur	1,2E+06	1,2E+06	12	2200	<12	1,2E+06	<12	<12
	261bis	5 - Ecouvillon 19/1 500 cm2 tapis vers extérieur	288 000	33 000	4 600	<12	50000 L	37 000	<12	<12
	262	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas près sortie	0							
	263	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas près sortie		0						
	264	5 - Ecouvillon 19/1 + jonction pied/sol sous poste de remplissage	480 000	13 000	<12	<12	<12	290 000	<12	<12
	265	2 - Résidu 19/1 aspirateur	330	340	36	<3	24	66	<3	<3
	266	2 - Résidu 19/1 pois de balai	3 400	220	800	<20	400	<20	<20	<20
	267	3 - Eponge 19/1 1 m2 sol sortie	180 000	16 000	120 000	10	10	2 400	10	<10
	268	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas au centre	0							
	269	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas au centre		0						
	270	2 - Résidu 19/1 gaines d'aspiration niveau poste de remplissage	4 800	460	20	<20	20	<20	<20	<20
	271	2 - Résidu 19/1 poudre sur poutrelle métallique près du sol	6 800	6 400	1 000	200	4 800	10	<10	<10
	272	3 - Eponge 19/1 1200 cm2 dessus coude tuyau rouge	48 000	320	12 000	10	10	<80	10	<10
	273	2 - Résidu 19/1 poudre collée au niveau injection poudre	90	<10	200	<10	10	<10	<10	<10
	275	2 - Résidu 19/1 bec d'aspirateur	200	<2	80	4	<2	<2	<2	<2
XIV - LOCAL ALBRO	196	3 - Eponge 19/1 unité air conditionné eau de condensation	160	<10	<10	<10	<10	<80	<10	<10
	197	5 - Ecouvillon 19/1 remplisseuse boîtes chemin de câbles	12	<12	12	<12	<12	<12	<12	<12
	198	3 - Eponge 19/1 250 cm2 eau de condensation unité de refroidissement	Moisissures	10	<10	<10	10	<80	<10	<10
	199	1 - Air 19/1	12							
	200	1 - Air 19/1		0						
	201	5 - Ecouvillon 19/1 jonction sol/pied amont droit (sous boîtes)	260 000	110 000	48 000	<12	<12	5 400	<12	<12
	202	5 - Ecouvillon 19/1 10 cm2 air conditionné + filtre entrée	26 000	2 200	12	<12	<12	3 200	<12	<12
	203	2 - Résidu 19/1 3e tapis de liaison après remplisseuse déchets noirs jonction sol/pied	2 000	<20	400	<20	800	400	<20	<20
	204	2 - Résidu 19/1 insectes plaque lampe UV 65 x 55 cm	1,6E+07	3,5E+07	80	<80	<80	130 000	<80	<80
	205	5 - Ecouvillon 19/1 convoyeur avant étoile jonction sol/pied	2 400	12	12	<12	<12	<12	<12	<12
	206	5 - Ecouvillon 19/1 10 cm2 filtre air conditionné 3	Moisissures	<12	12	<12	<12	<12	<12	<12
	207	3 - Eponge 19/1 pourtour 1/3 fenêtre en haut vers extérieur	Moisissures	<10	<10	<10	10	<80	<10	<10
	208	5 - Ecouvillon 19/1 tapis de liaison central plaque gauche 50 cm2	Moisissures	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12
	209	5 - Ecouvillon 19/1 guide droit sous capot central bande verte niveau table de pesée	110	120	<12	<12	<12	240	<12	<12
	210	3 - Eponge 19/1 900 cm2 carter plexiglas vers étuis	2 400	800	10	<10	10	80	<10	<10
	211	3 - Eponge 19/1 1000 cm2 bande carter plexiglas vers étuis	Moisissures	<10	10	<10	10	<80	<10	<10

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VHDG	SK	BEA	MPS	CFC	UP	PC
	212	3 - Eponge 19/1 5000 cm2 angle mur/sol près sertisseuse	500 000	170 000	160 000	10	10	48 000	<10	<10
	215	5 - Ecouvillon 19/1 bord clincheuse	48	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12
	216	3 - Eponge 19/1 1 m2 sol sortie vers étuis	770 000	64 000	110 000	10	16 000	260 000	<10	<10
	217	2 - Résidu 19/1 dessus étoile	2 000	4 800	20	<20	20	<20	<20	<20
	218	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas près sertisseuse	0							
	219	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas près sertisseuse		0						
	221	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas après sertisseuse	2							
	222	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas après sertisseuse		0						
	223	2 - Résidu 19/1 carter de protection sol sous remplisseuse	82 000	300	800	<10	2 800	2 000	<10	<10
	224	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas central	10							
	225	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas central		0						
	228	2 - Résidu 19/1 aspirateur	12 000	<200	<200	<200	6000 L	<200	<200	<200
	229	2 - Résidu 19/1 3 x 3 trous dans le sol	Envahit	<20	<20	<20	1 600	<20	<20	<20
	230	2 - Résidu 19/1 sertisseuse poudre, graisse, huile	Moisissures	40	20	<20	20	60	<20	20
	231	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas niveau étoile	15							
	232	4 - Rodac 19/1 sous plexiglas niveau étoile		0						
	233	4 - Rodac 19/1 poils brosse niveau remplisseuse	11							
	234	4 - Rodac 19/1 poils brosse niveau remplisseuse		0						
XVI - ETUIS	249	1- Air 19/1	35							
	250	1- Air 19/1		0						
	251	5 - Ecouvillon 19/1 fenêtre vers l'embranterie	12 000	3 400	<12	<12	<12	6 600	<12	<12
	252	2 - Résidu 19/1 poubelle sous bureau	800	80	250	8	160 L	210	<4	<4
	253	4 - Rodac 19/1 poignée porte coulissante	1							
	254	4 - Rodac 19/1 poignée porte coulissante		0						
	255	1 - Air 19/1 près porte coulissante	10							
	256	1 - Air 19/1 près porte coulissante		0						
	257	5 - Ecouvillon 19/1 + jonction pied/sol armature près porte coulissante	Moisissures	<12	12	<12	12	<12	<12	<12
	258	5 - Ecouvillon 19/1 câbles niveau sol	1 200	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12
	259	2 - Résidu 19/1 poils de balai	60 000	20 000	6 800	<20	2 400	64 000	<20	<20
	260	2 - Résidu 19/1 papier bouchant un trou (passage tuyau)	24 000	350	10	<10	9 000	1 500	<10	<10
ZONE SECHE NON PROTEGEE										
IX - RECHAUFFEUR D'AIR										
	137	3 - Eponge 19/1 900 cm2 sas sortie	80 000	<10	16 000	10	16 000	<80	<10	800
	146	2 - Résidu 19/1 fissure mur Ouest	200	<10	10	<10	10	120	<10	<10
	147	3 - Eponge 19/1 sol coin Nord - Ouest	250 000	400	42 000	10	40 000	<80	<10	<10
	148	3 - Eponge 19/1 traces d'eau près pilier de support au fond	6 400	<10	<10	<10	10	<80	<10	<10
	149	2 - Résidu 19/1 sur filtre prise d'air	3 000	3 600	10	<10	4 000	4 000	<10	<10
	154	1 - Air 19/1	2							
	155	1 - Air 19/1		0						
	157	2 - Résidu 19/1 lampe au-dessus escalier	1 200	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
	158	3 - Eponge 19/1 1,50 m de main courante escalier noir et orange	2100	<10	10	<10	10	<80	<10	<10
	159	2 - Résidu 19/1 poils de 3 balais	200	<10	10	<10	200 L	<10	<10	<10
	160	3 - Eponge 19/1 300 cm2 poutrelle de support mezzanine prise depuis l'escalier	4000	<10	10	<10	<10	<80	<10	<10
	162	4 - Rodac 19/1 surface filtres à gauche rangée supérieure petite salle	200							
	163	4 - Rodac 19/1 surface filtres à gauche rangée supérieure petite salle		1						
	164	4 - Rodac 19/1 filtres à droite petite salle	95							
	165	4 - Rodac 19/1 filtres à droite petite salle		8						
	169	2 - Résidu 19/1 petit escalier + plate-forme 80 cm x 1,50 m	800	<20	20	20	600	<20	<20	<20

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VREG	SK	BEA	MFG	CFC	IP	PC
	171	1 - Air 19/1 petite salle	2							
	172	1 - Air 19/1 petite salle		0						
X - SALLE ACCES	185	3 - Eponge 19/1 1m2 sol entrée zone blanche	420 000	19 000	130 000	10	110 000	32 000	<10	<10
	186	3 - Eponge 19/1 500cm2 bouche d'égout centrale	21 000	800	2 400	10	10	<80	<10	<10
	187	3 - Eponge 19/1 sol vers salle évapo	690 000	130 000	130 000	10	10	<80	<10	32 000
	188	3 - Eponge 19/1 bouche d'égout centrale dépôt brun (rouille) dans cloche	<80	<10	<10	<10	<10	<80	<10	<10
	189	3 - Eponge 19/1 500 cm2 trou dans mur passage tuyauterie vers zone blanche	64 000	800	10	800	10	<80	<10	<10
	190	3 - Eponge 19/1 poussières sur toutes les lames air soufflé	56 000	<10	10	10	<10	<80	<10	<10
	191	2 - Résidu 19/1 dessus tuyauterie 1m rouge 1m gris avant trou	4 000	<10	<10	<10	1 600	600	<10	<10
	192	3 - Eponge 19/1 semelles de 5 paires de sabots blancs	29 000	76 000	52 000	40 000	24 000	8 000	<10	<10
	193	3 - Eponge 19/1 rebord sous fenêtre	64 000	<10	10	10	10	<80	<10	<10
	351	3 - Eponge 20/1 1 m2 sol devant zone blanche	2,4E+06	130 000	10	64 000	10	640 000	<10	<10
	377	3 - Eponge 20/1 couloir vers lavage toles milieux 900 cm2 sol	640 000	9 600	32 000	<10	16 000	6 400	<10	<10
XI - LOCAL STOCKAGE BIG BAG	276	1 - Air 20/1	60							
	277	1 - Air 20/1		2						
	278	3 - Eponge 20/1 coulées bordure sur mur 1,20 m	130 000	<10	<10	<10	64000 L	<80	<10	<10
	279	3 - Eponge 20/1 bouche d'égout	2,4E+06	140 000	10	10	1600000 L	1,3E+06	<10	<10
	280	3 - Eponge 20/1 400 cm2 eau résiduelle sous palette de stockage	2,4E+06	380 000	1,3E+06	10	640000 L	2,0E+06	<10	<10
	281	3 - Eponge 20/1 1400 cm2 bas porte plastique noire droite	1,4E+06	130 000	260 000	10	140 000	80 000	<10	<10
XV - EMBALLAGE	213	1 - Air 19/1 près local Albro	15							
	214	1 - Air 19/1 près local Albro		0						
	220	5 - Ecouvillon 19/1 déchets noirs palets de sortissage	<12	<12	<12	<12	12	<12	<12	<12
	226	1 - Air 19/1	8							
	227	1 - Air 19/1		0						
	235	2 - Résidu 19/1 poils de balai	43 000	9 000	9 000	30	30	39 000	<30	<30
	236	5 - Ecouvillon 19/1 cloison métallique, dépôts noirs dans angle, près porte vers Albro	16 000	2 400	720	<12	<12	11 000	<12	<12
	237	3 - Eponge 19/1 4000 cm2 coursive plate-forme	10 000	10	10	10	<10	<80	<10	<10
	238	3 - Eponge 19/1 1 m2 sol près local Albro	640 000	43 000	140 000	2 400	10	160 000	10	<10
	239	3 - Eponge 19/1 2500 cm2 sol sous lavabo, eau	1,6E+06	40 000	1,6E+06	64 000	<10	160 000	<10	800 000
	240	5 - Ecouvillon 19/1 plate-forme	Moisissures	<12	<12	<12	<12	240	<12	<12
	241	4 - Rodac 19/1 tapis avant azote	1							
	242	4 - Rodac 19/1 tapis avant azote		1						
	243	5 - Ecouvillon 19/1 poutres, câbles au-dessus cloche de dégazage	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12
	244	2 - Résidu 19/1 sous lavabo, peinture écaillée + joint pourri	1,0E+08	48 000	700 000	40 000	200000L	36 000	<10	<10
	245	5 - Ecouvillon 19/1 rebord cloche n°4	48 000	1 400	12	<12	<12	11 000	<12	<12
	246	3 - Eponge 19/1 500 cm2 bord creux fenêtre vers extérieur	6 400	400	10	<10	<10	4 000	<10	<10
	247	3 - Eponge 19/1 bord creux fenêtre vers extérieur	120 000	12 000	16 000	1 600	10	64 000	<10	<10
	248	2 - Résidu 19/1 50x5 cm convoyeur vers Albro	1 500	400	100	<100	2 000	5 200	<100	<100
XVII - FERBLANTERIE	460	5 - Ecouvillon 20/1 160 m2 passerelle dessus boîtier	Moisissures	<12	<12	<12	12	<12	<12	<12
	461	5 - Ecouvillon 20/1 rebord fenêtre vers éluis	60 000	12	<12	<12	53 000	9 200	<12	<12
	462	4 - Rodac 20/1 coin au fond	4							
	463	4 - Rodac 20/1 coin au fond		0						
	464	4 - Rodac 20/1 balance sous cadran	15							
	465	4 - Rodac 20/1 balance sous cadran		0						
	471	1 - Air 20/1	10							

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VRDG	SK	BEA	MFG	CFC	BP	PC
	472	1 - Air 20/1		1						
XXIV - VIDE SACS	435	4 - Rodac 20/1 boîtier près entrée	0							
	436	4 - Rodac 20/1 boîtier près entrée		0						
	437	4 - Rodac 20/1 panneau intérieur machine centrale	0							
	438	4 - Rodac 20/1 panneau intérieur machine centrale		0						
XXV - STOCK P.E (A)	439	5 - Ecouvillon 20/1 400 cm2 margelle en coin	600 000	30 000	34 000	12	<12	600 000	<12	<12
	440	4 - Rodac 20/1 porte	10							
	441	4 - Rodac 20/1 porte		1						
	442	4 - Rodac 20/1 palette au centre	0							
	443	4 - Rodac 20/1 palette au centre		0						
	448	1 - Air 20/1	30							
	449	1 - Air 20/1		0						
XXVI - STOCK M.P (B)	466	3 - Eponge 20/1 4000 cm2 bordure fenêtre ligne sacs	360 000	240 000	190 000	800	10	16 000	<10	<10
	467	5 - Ecouvillon 20/1 300 cm2 dessus boîtier	2 500	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12
	468	2 - Résidu 20/1 40 x 10 cm angle mur/sol	2,0E+07	5 000	180 000	200	8 600	300 000	<10	<10
	469	1 - Air 20/1	25							
	470	1 - Air 20/1		0						
ZONE HUMIDE PROPRE										
XII - STOCK PRECONCENTRE	372	3 - Eponge 20/1 900 cm2 sol entrée	62 000	10	10	<10	10	<80	<10	<10
	373	4 - Rodac 20/1 tableau de contrôle près bouton contrôle temps	5							
	374	4 - Rodac 20/1 tableau de contrôle près bouton contrôle temps		0						
	375	3 - Eponge 20/1 1400 cm2 dessus tableau de contrôle avec schémas	<80	<10	<10	<10	<10	<80	<10	<10
	454	1 - Air 20/1	25							
	455	1 - Air 20/1		0						
XIII - LAVAGE TOTES	371	2 - Résidu 20/1 1000 cm2 derrière machine à laver	1,0E+08	900 000	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	<10	<10
	376	3 - Eponge 20/1 900 cm2 sol sortie	140 000	1 600	10	10	10	4 800	<10	<10
	378	5 - Ecouvillon 20/1 36 cm2 dessus boîtier prise à droite entrée	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12
	379	4 - Rodac 20/1 boîtier contrôle inscription autocollant rouge	0							
	380	4 - Rodac 20/1 boîtier contrôle inscription autocollant rouge		0						
	381	3 - Eponge 20/1 2000 cm2 x 2 rail d'accès près porte machine à laver	2,0E+06	32 000	190 000	<10	1600000 L	44 000	<10	1,4E+06
	382	4 - Rodac 20/1 fenêtre fissurée	35							
	383	4 - Rodac 20/1 fenêtre fissurée		10						
	456	1 - Air 20/1	20							
	457	1 - Air 20/1		0						
XX - CONDENSERIE 2ème	384	5 - Ecouvillon 20/1 dessus boîtier prise	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12
	385	4 - Rodac 20/1 boîtier électrique 7C	4							
	386	4 - Rodac 20/1 Boîtier électrique 7C		0						
	387	3 - Eponge 20/1 500 cm2 rebord fenêtre	24 000	<10	10	<10	10	<80	<10	<10
	388	4 - Rodac 20/1 couvercle évapo	26							
	389	4 - Rodac 20/1 couvercle évapo		0						
	390	2 - poils de balai	4,0E+08	1,9E+07	2,0E+07	33 000	1,6E+07	960 000	<20	<20
	391	5 - Ecouvillon 20/1 250 cm2 bord porte	moisissures	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12
	392	4 - Rodac 20/1 pilier en coin	2							

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VFDG	SK	BEA	MPS	CFC	EP	PC
XIX - CONDENSERIE 1er	393	4 - Rodac 20/1 pilier en coin		0						
	450	1 - Air 20/1	200							
	451	1 - Air 20/1		0						
	352	2 - Résidu 20/1 dans fentes carrelage sous pasteurisateur	1,0E+09	9 000	4,8E+07	8 000	8,0E+07	900 000	<100	49 000
	353	2 - Résidu 20/1 2eme plaque d'égoût	1,0E+06	18 000	<10	13 000	300 000	1,0E+06	<10	<10
	354	2 - Résidu 20/1 50 cm2 plate-forme	8,0E+07	4 000	380 000	64 000	140 000	72 000	<4	140 000
	355	2 - Résidu 20/1 joint carrelage	1,0E+08	48 000	10	<10	10	260 000	<10	<10
	356	4 - Rodac 20/1 porte battante partie orange	45							
	357	4 - Rodac 20/1 porte battante partie orange		0						
	358	4 - Rodac 20/1 tableau contrôle près bouton marche/arrêt	50							
	359	4 - Rodac 20/1 tableau contrôle près bouton marche/arrêt		3						
	360	2 - Résidu 20/1 gravier mortier près nouvelle dalle	1,0E+08	23 000	900	<10	<100	160 000	<10	<10
	363	2 - Résidu 20/1 50 x 10 cm petit réduit	840	60	420	60	600	<3	<3	<3
	365	5 - Ecouvillon 20/1 250 cm2 dessus tableau contrôle	96 000	<12	7 200	<12	22000L	<12	<12	<12
	366	4 - Rodac 20/1 sol près escalier sortie	155							
	367	4 - Rodac 20/1 sol près escalier sortie		10						
	368	4 - Rodac 20/1 sol devant échangeur à plaques	105							
	369	4 - Rodac 20/1 sol devant échangeur à plaques		17						
	369bis	4 - Rodac 20/1 sol près trou couvert de planches	15							
	370	4 - Rodac 20/1 sol près trou couvert de planches		1						
	452	1 - Air 20/1	150							
	453	1 - Air 20/1		0						
XX - CONDENSERIE rdc	394	4 - Rodac 20/1 intérieur pilier coin	20							
	395	4 - Rodac 20/1 intérieur pilier coin		1						
	396	5 - Ecouvillon 20/1 180 cm2 dessus petit tableau de contrôle	1,2E+06	48 000	5 400	<12	<12	1,2E+06	<12	<12
	397	3 - Eponge 20/1 1000 cm2 dessus tuyau vers évapo près mur	52 000	10	10	<10	10	<80	10	10
	398	5 - Ecouvillon 20/1 230 cm2 dessus boîtier mural bleu	480	<12	12	<12	12 L	<12	<12	<12
	399	4 - Rodac 20/1 tuyau en coin	20							
	400	4 - Rodac 20/1 tuyau en coin		0						
	401	4 - Rodac 20/1 pilier en coin (intérieur)	15							
	402	4 - Rodac 20/1 pilier en coin (intérieur)		0						
	403	2 - Résidu 20/1 30 x 5 cm bas pilier, angle	2,0E+07	3 600	240 000	2 600	120 000	640	<4	<4
	404	5 - Ecouvillon 20/1 150 cm2 bas tuyau près mur couloir	1 800	<12	12	<12	12 L	<12	<12	<12
	405	4 - Rodac 20/1 intérieur pilier central	60							
	406	4 - Rodac 20/1 intérieur pilier central		0						
	458	1 - Air 20/1	180							
	459	1 - Air 20/1		0						
XXI-TANKS LAIT FRAIS	417	2 - Résidu 20/1 bouche d'égoût	1,0E+06	500 000	160 000	10	98000 L	1,0E+06	<10	<10
	421	2 - Résidu 20/1 300 cm2 rainures et trous sous condenseurs	1,0E+08	100 000	40 000	8 500	48 000	1,0E+08	<10	2 200
	407	4 - Rodac 20/1 fenêtre en coin	65							
	408	4 - Rodac 20/1 fenêtre en coin		105						
	409	5 - Ecouvillon 20/1 dessus boîtier derrière tanks	1 400	<12	12	<12	960	<12	<12	<12
	420	5 - Ecouvillon 20/1 250 cm2 dessus boîtier de commande	8 500	<12	12	<12	77000 L	<12	<12	<12
	410	3 - Eponge 20/1 1m2 plancher marron	2,0E+06	80 000	10	10	510 000	530 000	<10	640 000
	415	3 - Eponge 20/1 6000 cm2 sol entrée	1,0E+07	96 000	18 000	10	400 000	1,0E+07	<10	<10
	411	4 - Rodac 20/1 boîtier commande près porte	1							

LIEU DE PRELEVEMENT	N°	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	VRBG	SK	BEA	MRS	CFC	BP	PC
	412	4 - Rodac 20/1 boîtier commande près porte		0						
	413	4 - Rodac 20/1 fenêtre en coin	2							
	414	4 - Rodac 20/1 fenêtre en coin		0						
	418	4 - Rodac 20/1 fenêtre en coin	2							
	419	4 - Rodac 20/1 fenêtre en coin		0						
	416	2 - Résidu 20/1 600 cm2 dessus boîtier central	13 000	<40	40	<40	400	2 800	<40	<40
	444	1 - Air 20/1	40							
	445	1 - Air 20/1		1						
XXIII - DISSOLUTION	422	4 - Rodac 20/1 fenêtre fissurée	70							
	423	4 - Rodac 20/1 fenêtre fissurée		52						
	424	5 - Ecouvillon 20/1 dessus boîtier prise sous fenêtre	720 000	62 000	50 000	7 000	600000 L	10 000	<12	<12
	425	2 - Résidu 20/1 dessus boîtier mural	2,0E+07	50 000	2,4E+07	16 000	80 000	3,6E+07	<200	<200
	426	4 - Rodac 20/1 mur en coin à droite entrée	14							
	427	4 - Rodac 20/1 mur en coin à droite entrée		0						
	428	5 - Ecouvillon 20/1 dessus boîtier prise sur machine centrale	1,2E+06	1 400	47 000	<12	72000 L	240 000	<12	290 000
	446	1 - Air 20/1	30							
	447	1 - Air 20/1		0						
ZONE HUMIDE SALE										
XXII - QUAI DE RECEPTION	429	3 - Eponge 20/1 1m2 quai déchargement avant javellisation	1,0E+07	1,0E+07	10	1,0E+07	1,0E+07	1,0E+07	<10	1,0E+07
	430	3 - Eponge 20/1 1m2 quai déchargement après javellisation	1,0E+07	1,0E+07	1,6E+04	800 000	3,2E+06	1,0E+07	<10	1,0E+07
XXVII - AIRE NETTOYAGE CAMIONS	431	2 - Résidu 20/1 rigole	9 600	2 400	1 600	100	830	3 500	0	1
	432	4 - Rodac 20/1 enboût tuyau	15							
	433	4 - Rodac 20/1 enboût tuyau		2						
	434	5 - Ecouvillon 20/1 400 cm2 dessus boîtier	190 000	4 200	5 300	<12	68000 L	140 000	<12	<12
XXVIII - TERRASSE	A	2 - Résidu 20/1 EGRON pied bouche d'extraction n°2	1,0E+08	900 000	1,0E+08	10 000	1,0E+08	1,0E+08	<10	<10
	B	2 - Résidu 20/1 EGRON bouche d'égoût	1,0E+08	140 000	400 000	1,0E+07	<10	1,0E+08	<10	<10
	C	2 - Résidu 20/1 EGRON bouche d'égoût	1,0E+08	900 000	1,0E+08	1,0E+08	<10	1,0E+08	<10	<10
	D	2 - Résidu 20/1 angle terrasse (toles) (près échelle)	1,0E+08	900 000	400 000	75 000	<10	1,0E+08	<10	<10

VRBG = Entérobactéries
 SK = Staphylocoques totaux
 BEA = Entérocoques
 MRS = Flore lactique
 CFC = Pseudomonas
 BP = Staphylococcus aureus
 PC = Listeria

N°	DATE	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	SURFACE (cm2)	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E	E./25cm2	C	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
ZONE HUMIDE PROTEGEE											
TOUR 4EME 1/2											
1 - 162	09/08	Résidu - Sur chemin de câbles, vannes à gauche de la porte		< 200		< 10		< 10		< 10	
1 - 163	09/08	Résidu - Dessus lance d'incendie et câbles à gauche de la buse		200		10		< 10		< 10	
1 - 53	09/08	Eponge - Bas de la fenêtre près de la buse - 120 x 20 cm	2400	< 1600	-	< 80	-	< 80	-	< 80	-
1 - 54	09/08	Eponge - Sol près de la buse - 50 x 30 cm	1500	48000	800	< 80	-	< 80	-	< 80	-
1 - 56	09/08	Eponge - Palier intermédiaire - 1 m2	10000	1,50E+06	3700	< 80	-	< 80	-	< 80	-
1 - 57	09/08	Eponge - Mur près de la buse côté opposé à la porte - 1 m2	10000	75000	190	< 80	-	< 80	-	< 80	-
TOUR 4EME											
2 - 161	09/08	Résidu - Bec d'aspirateur		< 200		< 10		< 10		< 10	
2 - 164	09/08	Résidu - Dans bouche d'égout à droite de l'entrée		200		10		< 10		< 10	
2 - 51	09/08	Eponge - Pas de la porte côté escalier - 30 x 30 cm	900	180000	5000	66000	1800	64000	1800	59000	1600
2 - 52	09/08	Eponge - Rampe sur 1 m cage d'escalier	500	< 1600	-	< 80	-	< 80	-	< 80	-
2 - 55	09/08	Eponge - Sol devant l'ascenseur - 1m2	10000	190000	480	< 80	-	< 80	-	< 80	-
TOUR 3EME											
3 - 165	09/08	Résidu - Sur chemin de câbles, supports métalliques pièce en retrait à gauche de l'entrée		< 200		< 10		< 10		< 10	
3 - 166	09/08	Résidu - Dessus machine près de la porte du local technique		6600		140		140		< 10	
3 - 167	09/08	Résidu - Poils de balai et de brosse		< 200		< 10		< 10		< 10	
3 - 168	09/08	Résidu - Sac d'aspirateur		600		< 10		< 10		< 10	
3 - 58	09/08	Eponge - Pas de la porte côté escalier	10000	1,10E+06	2700	< 80	-	< 80	-	< 80	-
3 - 59	09/08	Eponge - Fenêtre à gauche de l'entrée	10000	< 1600	-	< 80	-	< 80	-	< 80	-
3 - 60	09/08	Eponge - Fenêtre face à l'entrée	10000	< 1600	-	< 80	-	< 80	-	< 80	-
3 - 61	09/08	Eponge - Local technique au fond, dessus rebord machine près du mur - 1/2 m2	5000	1600	8	< 80	-	< 80	-	< 80	-
3 - 62	09/08	Eponge - Sol devant l'ascenseur dans le caniveau	10000	48000	120	480	1	< 80	-	< 80	-

N°	DATE	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	SURFACE (cm ²)	G.A.M.	G.A.M./25cm ²	E	E./25cm ²	C	C./25cm ²	C.T.	C.T./25cm ²
TOUR 2EME											
4 - 169	09/08	Résidu - Poudre de lait sur rebord machinerie au fond à gauche		200		< 10		< 10		< 10	
4 - 170	09/08	Résidu - Sac d'aspirateur		24000		< 10		< 10		< 10	
4 - 171	09/08	Résidu - Poils de balai		66000		< 10		< 10		< 10	
4 - 39	10/08	Eponge - Sol près de la fenêtre à gauche de l'entrée - 30 x 30 cm	900	6400	180	< 80	-	< 80	-	< 80	-
4 - 39bis	10/08	Ecouvillon - Sol près de la fenêtre à gauche de l'entrée - 5 x 5 cm	25	< 40	-						
4 - 40	10/08	Eponge - Sol devant l'ascenseur - 30 x 30 cm	900	8000	220	400	11	< 80	-	< 80	-
4 - 40bis	10/08	Ecouvillon - Sol devant l'ascenseur - 5 x 5 cm	25	< 40	-						
4 - 63	09/08	Eponge - Quatre marches d'escalier - 30 x 200 cm	6000	21000	87	1800	7	1000	4	< 80	-
4 - 64	09/08	Eponge - Local au fond, dessus tuyauterie - 1 m ²	10000	29000	72	< 80	-	< 80	-	< 80	-
4 - 65	09/08	Eponge - Dessus barrique orange, local technique - 1 m ²	10000	59000	150	2000	5	1000	2	< 80	-
POST SECHEUR											
5 - 172	09/08	Résidu - Sac d'aspirateur		< 200		< 10		< 10		< 10	
5 - 173	09/08	Résidu - poils de 2 balais, local en contrebas		1800		< 10		< 10		< 10	
5 - 174	09/08	Résidu - Produit fini passage 1er1/2 vers 1er (poudre)		200		< 10		< 10		< 10	
5 - 66	09/08	Eponge - Sol pas de la porte intérieur - 1/2 m ² sur époxy ; 1/2 m ² sur béton	10000	70000	170	17000	42	16000	40	< 80	-
5 - 67	09/08	Eponge - Parois intérieures bouche d'égoût à gauche de l'entrée - 30 x 60 cm	1800	1,00E+09	1,39E+07	4,00E+06	56000	4,00E+06	56000	3,70E+06	51000
5 - 68	09/08	Eponge - Post-sécheur amont côté mur gauche (présence de poudre) - 200 x 10 cm	2000	5,00E+06	62000	160000	2000	14000	170	560	7
5 - 69	09/08	Eponge - Post-sécheur aval, rebord angle près du mur du fond (présence de poudre) - 20 x 30 cm	600	50000	2100	5400	220	3100	130	< 80	-
5 - 70	09/08	Eponge - Passage tuyauterie dans le mur à gauche de l'entrée - 30 x 30 cm	900	1300	36	640	18	640	18	< 80	-
5 - 71	09/08	Eponge - Dessus coffret d'essais BT 9 - 30 x 20 cm	600	3200	130	< 80	-	< 80	-	< 80	-
5 - 72	09/08	Eponge - Post-sécheur amont côté droit, dessus gros tuyaut - 400 x 20 cm	8000	1600	5	< 80	-	< 80	-	< 80	-
5 - 73	09/08	Eponge - Post-sécheur aval, dessus poutelle transversale près du plafond	1000	21000	520	< 80	-	< 80	-	< 80	-
5 - 74	09/08	Eponge - Bord du trou recouvert de tôle, coin gauche opposé à l'entrée - 20 x 50 cm	1000	24000	600	19000	470	< 80	-	< 80	-
5 - 75	09/08	Eponge - Porte 1er1/2 vers 1er, côté post-sécheur	20000	1600	2	800	1	< 80	-	< 80	-
5 - 77	09/08	Eponge - Dessus tuyauterie transfert poudre 1er1/2 vers 1er - 1 m ²	10000	1,00E+09	2500000	< 80	-	< 80	-	< 80	-

N°	DATE	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	SURFACE (cm2)	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E	E./25cm2	C	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
5 - 78	09/08	Eponge - Post-sécheur aval, dessus tuyauterie côté intérieur - 400 x 20 cm	8000	22000	59	80	0	< 80	-	< 80	-
5 - 79	09/08	Eponge - Mur vertical sous post-sécheur, avec traces de trainées d'eau - 30 x 30 cm	900	3200	89	1700	47	< 80	-	< 80	-
5 - 80	09/08	Eponge - 3 marches d'escalier	1200	100000	2100	22000	460	21000	440	640	13
		ESCALIER/ASCENSEUR									
6 - 116	09/08	Néskid - Néskids collés en partie centrale		440000		6200		7400		430	
6 - 189	10/08	Néskid - Poudre et poussière sur escalier (?)		76000		12000		8600		2600	
		STOCK/TOTES									
7 - 1	09/08	Eponge - Plateforme supérieure - 20 x 60 cm	1200	1,70E+06	35000	110000	2300	85000	1800	80	2
7 - 10	09/08	Eponge - Largeur de la porte sur 10 cm vers salle accès zone blanche	1500	48000	800	80	1	< 80	-	< 80	-
7 - 101	09/08	Néskid - Sur les deux montants de l'escalier d'accès plateforme		640000		550		480		< 10	
7 - 102	09/08	Néskid - Plateforme supérieure près du remplissage totes - 40 x 40 cm		16000		440		90		< 10	
7 - 103	09/08	Néskid - Sur marches de la 2ème partie de l'escalier d'accès au remplissage totes		34000		400		170		150	
7 - 104	09/08	Néskid - Au-dessus du chargeur électrique		200		< 10		< 10		< 10	
7 - 105	09/08	Néskid - Dessus remplisseuse sacs à gauche		< 200		< 10		< 10		< 10	
7 - 106	09/08	Néskid - Aspirateur niveau remplissage totes : sac + déchets provenant du moteur		2600		< 10		< 10		< 10	
7 - 107	09/08	Néskid - Aspirateur niveau remplissage totes/sac		6600		150		60		< 10	
7 - 108	09/08	Néskid - Aspirateur niveau remplissage totes : déchets à la jonction tuyau/brosse		28000		920		350		< 10	
7 - 109	09/08	Néskid - Aspirateur central : intérieur de la buse plastique grise		22000		1000		560		20	
7 - 11	09/08	Eponge - Sol près totes - 40 x 40 cm	1600	46000	720	< 80	-	< 80	-	< 80	-
7 - 110	09/08	Néskid - Dessous tapis roulant pour palettes : bois et poussières		36000		320		240		10	
7 - 111	09/08	Néskid - Stockage matériel (clif, ramasse-poussière, marteau) à la base du remplisseur totes : poudre grise + morceau de carton		4600		60		60		< 10	
7 - 112	09/08	Néskid - Poudre à l'extérieur de 2 totes		1800		10		< 10		< 10	
7 - 113	09/08	Néskid - 1er poste de vidange totes : poudre sur bâti et dessus carter avec fuite d'huile		1200		< 10		< 10		< 10	
7 - 114	09/08	Néskid - 1er poste de vidange totes : poudre récoltée dans le collecteur lors du basculement		600		< 10		< 10		< 10	
7 - 115	09/08	Néskid - Poudre résiduelle près du mur vers l'extérieur		9400		150		170		< 10	
7 - 117	09/08	Néskid - Bois/graisse dessous transporteur palettes		7800		1100		470		430	

N°	DATE	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	SURFACE (cm ²)	O.A.M.	O.A.M./25cm ²	E.	E./25cm ²	C.	C./25cm ²	C.T.	C.T./25cm ²
7 - 118	09/08	Résidu - Cariveau niveau porte d'accès à l'escalier		70000		900		1000		< 10	
7 - 12	09/08	Eponge - Couvercle du remplisseur - 90 x 40 cm	3600	29000	200	560	4	240	2	< 80	-
7 - 120	09/08	Résidu - Jonction sol/mur près de la porte d'accès de matériel		7400		30		< 10		< 10	
7 - 121	09/08	Résidu - Poudre parmi les totes dans pièce en retrait		16000		20		10		< 10	
7 - 122	09/08	Résidu - Poils de balai		48000		280		250		20	
7 - 123	09/08	Résidu - Poudre résiduelle contre un mur dans pièce en retrait		< 200		< 10		< 10		< 10	
7 - 129	09/08	Résidu - Mur de séparation/pièce en retrait : poussières, mortier		800		10		< 10		< 10	
7 - 13	09/08	Eponge - Parois internes bouche d'égoût	200	7,70E+06	960000	960	120	960	120	< 80	-
7 - 132	10/08	Résidu - Poils de balai		66000		270		210		< 10	
7 - 133	10/08	Résidu - Surs, bois sous l'échelle du palotisseur/dépalleuseur		20000		1200		640		< 10	
7 - 14	09/08	Eponge - Sol entrée zone blanche - 50 x 70 cm	3500	480000	3400	27000	100	30000	210	2200	16
7 - 4	09/08	Eponge - Plateforme supérieure remplisseur sacs - 40 x 40 cm	1600	4,50E+06	7000	1,20E+06	19000	770000	12000	22000	340
7 - 5	09/08	Eponge - Carons, palettes - 7 x 10 x 10 cm	700	4800	170	80	3	< 80	-	< 80	-
7 - 6	09/08	Eponge - Bâti inférieur première unité de vidange totes - 100 x 10 cm	1000	210000	5200	5000	120	4200	100	< 80	-
7 - 7	09/08	Eponge - Huile sur sol - 50 x 50 cm	2500	480000	4800	1800	18	560	6	< 80	-
7 - 76	09/08	Eponge - Porte 1er/2 vers 1er, côté stockage totes	20000	1,40E+09	1,75E+08	180000	220	< 80	-	< 80	-
7 - 8	09/08	Eponge - Ramasse-poussière - 2 x 15 x 15 cm	450	320000	18000	640	36	800	44	< 80	-
7 - 119	09/08	Résidu - Poudre en différents endroits parmi les totes		3800		20		< 10		< 10	
STOCK BOITES VIDES											
8 - 2	09/08	Eponge - Sol près entrée - 50 x 50 cm	2500	340000	3400	5100	51	2200	22	< 80	-
8 - 3	09/08	Eponge - Mur stockage boites - 40 x 40 cm	1600	< 1600	-	< 80	-	< 80	-	< 80	-

N° - OAT	DESCRIPTION DU PRIELEVEMENT	SURFACE (cm²)	O.A.M.	C.A.M./15cm²	E	E/15cm²	C	C/15cm²	C.T.	C.T./15cm²
LONE SACS										
9 - 100 - 10/08	Résidu - Deca, amature, tubes, tapis roulant niveau remplissage		110000		460		220		< 10	
9 - 101 - 10/08	Résidu - Aspirateur depuis le 2de		18000		1600		600		< 10	
9 - 230 - 10/08	Eponge - Sol devant la porte enrollable - 30 x 30 cm	900	1,20E+08	3,33E+07	120000		3300		< 80	
9 - 230bis - 10/08	Ecouffon - Sol devant la porte enrollable - 5 x 5 cm	25	8000	240						
9 - 80 - 10/08	Eponge - Plateforme, panneau droit pris de la fin de la vie de transport	900	810000	25000	< 80		< 80		< 80	
9 - 80bis - 10/08	Ecouffon - Plateforme, panneau droit pris de la fin de la vie de transport - 5 x 5 cm	25	< 40	-						
9 - 8 - 09/08	Eponge - Plateforme remplissage sacs (hors fonction) - 40 x 40 cm	1600	1,90E+08	30000	27000	420	24000	370	< 80	
LOCAL ALBERO										
10 - 175 - 09/08	Résidu - Poudre de lait niveau fourquet boîtes, 1/2 chaîne		34000		< 10		< 10		< 10	
10 - 176 - 09/08	Résidu - Pats de balai		2400		20		20		< 10	
10 - 177 - 09/08	Résidu - Insectes dans la plaque U.V.		170000		74000		66000		2000	
10 - 178 - 09/08	Résidu - Trou dans sol pour étrépe de fixation de la porte pris de la lentille vers l'extérieur		2,20E+08		< 10		< 10		< 10	
10 - 179 - 09/08	Résidu - Poudre dans des boîtes à l'arrêt niveau étoile		< 200		< 10		< 10		< 10	
10 - 180 - 09/08	Résidu - Trou dans le sol sous le milieu de la chaîne : joints pointus		68000		< 10		< 10		< 10	
10 - 181 - 09/08	Résidu - Trou dans le sol du pas de la porte, direction entasseage		2,80E+08		< 10		< 10		< 10	
10 - 183 - 09/08	Résidu - Sous le cadre de porte emballage vers local Albero		11000		< 10		< 10		< 10	
10 - 82 - 09/08	Eponge - Sous plexiglas milieu chaîne - 100 x 20 cm	2000	3200	40	960	12	640	8	< 60	
10 - 83 - 09/08	Eponge - Sous plexiglas niveau étoile - 20 x 20 cm	400	5400	340	1800	110	1400	87	< 80	
10 - 84 - 09/08	Eponge - Dessus panneau publicitaire mural - 100 x 5 cm	500	34000	2700	7800	390	6600	330	< 80	
10 - 85 - 09/08	Eponge - Fenêtre en coin, angle bureau/extérieur - 100 x 20 cm	2000	2,10E+08	26000	240	3	320	4	480	6
10 - 86 - 09/08	Eponge - Trou dans le mur, passage de tuyaux vers la terlanche	400	< 1600	-	< 80		< 80		< 80	
10 - 87 - 09/08	Eponge - Dessus plexiglas début chaîne - 200 x 20 cm	4000	130000	830	100000	620	100000	620	640	4
10 - 90 - 09/08	Eponge - Tapis milieu chaîne - 100 x 20 cm	2000	8,00E+08	1,00E+07	100000	1200	110000	1400	< 80	

N°	DATE	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	SURFACE (cm2)	O.A.M.	O.A.M./25cm2	B	B./25cm2	C	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
ZONE SECHE NON PROTEGEE											
RECHAUFFEUR D'AIR											
11	124	09/08	Résidu - Mousse en bas des fenêtres "air intake"	150000		76000		84000		10	
11	125	09/08	Résidu - Eponge/Meenex trouvé au-dessus de la pompe près du mur vers l'extérieur	560000		330		270		< 10	
11	42	10/08	Eponge - Sol à gauche de l'entrée - 30 x 30 cm	900	1,80E+06	50000	44000	1200	46000	1300	< 80
11	42bis	10/08	Ecouvillon - Sol à gauche de l'entrée - 5 x 5 cm	25	< 40	-					-
11	43	10/08	Eponge - Dessus boîtier machine, peill local	900	480000	13000	480000...	13000	480000	13000	< 80
11	43bis	10/08	Ecouvillon - Dessus boîtier machine, peill local - 5 x 5 cm	25	< 40	-					-
11	81	09/08	Eponge - Bord porte vers extérieur - 200 x 10 cm	2000	3,20E+06	40000	120000	1500	< 80	-	< 80
SALLE ACCES ZONE BLANCHE											
12	126	09/08	Résidu - Douche d'égoût centrale	< 200		< 10		< 10		< 10	
12	15	09/08	Eponge - Sol en coin près de la porte, aspect propre - 40 x 40 cm	1600	11000	170	< 80	-	< 80	-	< 80
12	16	09/08	Eponge - Semelles de 3 paires de sabots	1800	290000	4000	7400	100	5800	80	160
12	17	09/08	Eponge - Semelles de 3 paires de chaussures	1800	1,60E+07	220000	130000	1800	150000	2100	3000
12	18	09/08	Eponge - Sol en coin côté poste de contrôle	1600	27000	420	< 80	-	< 80	-	< 80
12	44	10/08	Eponge - Sol pas de la porte accès zone blanche, côté non protégé	900	34000	940	< 80	-	< 80	-	< 80
12	44bis	10/08	Ecouvillon - Pas de la porte accès zone blanche, côté non protégé	25	40	2					-
12	49	10/08	Eponge - Sol devant la porte vers la condenseerie - 30 x 30 cm	900	1600	44	< 80	-	< 80	-	< 80
12	49bis	10/08	Ecouvillon - Sol devant la porte vers la condenseerie - 5 x 5 cm	25	< 40	-					-
NOUVEAU LOCAL POSTE DE CONTROLE											
13	47	10/08	Eponge - Sol entrée côté intérieur - 30 x 30 cm	900	24000	670	540	15	580	16	< 80
13	47bis	10/08	Ecouvillon - Sol entrée côté intérieur - 5 x 5 cm	25	38000	1500					-
STOCKAGE BK0BAQ											
14	128	09/08	Résidu - Poussière le long du mur vers l'extérieur		18000		< 10		< 10		< 10
14	19	09/08	Eponge - Etapère de rangement des boîtes	2000	30000	370	< 80	-	< 80	-	< 80

N° - DATE	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	SURFACE (cm ²)	D.A.M.	D.A.M./25cm ²	C ₁	C ₁ /25cm ²	C ₂	C ₂ /25cm ²	C.T.	C.T./25cm ²
14 - 48 , 10/08	Eponge - Sol près de la bouche d'égoût au centre (traces d'eau) - 30 x 30 cm	900	1,10E+06	30000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
14 - 48bis , 10/08	Ecouvillon - Sol près de la bouche d'égoût au centre (trace d'eau) - 5 x 5 cm	25	38000	1500						
	COULOIR PRES DU STOCKAGE BX2BAG									
15 - 20 , 09/08	Eponge - Porte de liaison entre couloir et salle accès zone blanche	1000	110000	2700	160	4	160	4	< 80	-
15 - 21 , 09/08	Eponge - Sol côté lavage toilettes - 40 x 40 cm	1600	210000	3300	< 80	-	< 80	-	< 80	-
15 - 23 , 09/08	Eponge - Trempée dans bouche d'égoût	200	1,80E+07	2,25E+06	880	110	840	80	< 80	-
	EMBALLAGE									
16 - 182 , 09/08	Résidu - Poudre niveau loupique/bottes, près de la cabine téléphonique		600		< 10		< 10		< 10	
16 - 184 , 09/08	Résidu - Bout de carton sur le sol près du lavabo		200		10		< 10		< 10	
16 - 185 , 09/08	Résidu - Joint pourri, peinture écaillée autour du lavabo		1,50E+06		< 10		< 10		< 10	
16 - 186 , 09/08	Résidu - Couvercle en plastique de boîte dans une grande poubelle		< 200		< 10		< 10		< 10	
16 - 192 , 10/08	Résidu - Marche-pied et rainures dans le sol devant l'ascenseur		15000		< 10		< 10		< 10	
16 - 88 , 09/08	Eponge - Intérieur du lavabo	1200	6,20E+08	1,20E+07	180000	3700	150000	3100	220000	4600
16 - 89 , 09/08	Eponge - Tapis près des cloches de dégazage	2000	1600	20	80	1	160	2	< 80	-
16 - 91 , 09/08	Eponge - Sol pas de la porte vers local Albro - 30 x 30 cm	900	270000	7500	240000	8700	210000	5800	< 80	-
16 - 92 , 09/08	Eponge - Dessus cabine téléphonique	2400	210000	2200	240000	2500	210000	2200	< 80	-
16 - 93 , 09/08	Eponge - Porte plastique vers sas ferblanterie - 1 m ²	10000	1,40E+09	3,50E+08	< 80	-	< 80	-	< 80	-
16 - 94 , 09/08	Eponge - Dessus boîtier de contrôle, mur avec lavabo - 80 x 10 cm	800	220000	9200	190000	7900	120000	5000	< 80	-
16 - 95 , 09/08	Eponge - Sous la barrière, côté propre - 150 x 30 cm	4500	51000	280	13000	72	1700	9	< 80	-
16 - 96 , 09/08	Eponge - Dessus cabine centrale à vitres teintées (passage des boîtes) - 1 m ²	10000	9,60E+08	2,40E+08	150000	370	< 80	-	< 80	-
16 - 97 , 09/08	Eponge - Sol devant porte plastique vers local stockage - 120 x 30 cm	3600	9,80E+08	87000	7,20E+08	50000	6,90E+08	48000	2,10E+08	15000
16 - 98 , 09/08	Eponge - Fenêtre vers l'extérieur, côté opposé local Albro - 1 m ²	10000	8,30E+07	210000	9,30E+07	230000	7,80E+07	190000	9,00E+07	220000
16 - 99 , 09/08	Eponge - Sous la barrière, côté non protégé - 150 x 30 cm	4500	180000	1000	5200	29	4800	27	480	3

N° - DATE	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	SURFACE (cm²)	O.A.M.	O.A.M./154m²	E.	E./2546m²	C.	C./2546m²	C.T.	C.T./2546m²
FERDLANTERIE										
17 - 226 , 10/08	Eponge - Sol devant salle en retrait - 30 x 30 cm	900	22000	610	640	18	840	18	< 80	-
17 - 226bis , 10/08	Ecouvillon - Sol devant salle en retrait - 5 x 5 cm	25	< 40	-						
17 - 228 , 10/08	Eponge - Sol près de la porte vers le couloir - 30 x 30 cm	900	580000	16000	480	13	320	9	< 80	-
17 - 228bis , 10/08	Ecouvillon - Sol près de la porte vers le couloir - 5 x 5 cm	25	520	21						
VIDE SACS										
18 - 227 , 10/08	Eponge - Sol devant la porte vers stock M.P. A - 30 x 30 cm	900	28000	720	< 80	-	< 80	-	< 80	-
18 - 227bis , 10/08	Ecouvillon - Sol devant porte vers stock M.P. A - 5 x 5 cm	25	160000	8400						
STOCK P.E.A.										
19 - 134 , 10/08	Résidu - Poils du balai accroché à côté tableau d'affichage		18000		120		30		< 10	
STOCK M.P.B.										
20 - 229 , 10/08	Eponge - Angle mur/sol près d'un pilier - 30 x 30 cm	900	110000	3100	< 80	-	< 80	-	< 80	-
20 - 229bis , 10/08	Ecouvillon - Angle mur/sol près d'un pilier - 5 x 5 cm	25	280	11						
ZONE HUMIDE INTERNE										
STOCK PRECONCENTRE										
21 - 35 , 09/08	Eponge - Sol près du local lavage loto - 40 x 40 cm	1600	1,80E+06	28000	3000	47	2400	37	< 80	-
21 - 36 , 09/08	Eponge - Sol près de la porte vers couloir - 40 x 40 cm	1600	1,40E+09	2,10E+07	160	2	< 80	-	< 80	-
LAVAGE TOTES										
22 - 22 , 09/08	Eponge - Bas de la porte plastique - 20 x 50 cm	1000	130000	3200	80	2	< 80	-	< 80	-
22 - 221 , 10/08	Eponge - Flâx de lavage des loto - 150 x 8 cm	900	240000	6700	19000	530	21000	580	160	4
22 - 221bis , 10/08	Ecouvillon - Flâx machine à laver les loto - 5 x 5 cm	25	80	3						
22 - 24 , 09/08	Eponge - Coin près porte plastique - 50 x 50 cm	2500	210000	2100	2400	24	1400	14	< 80	-
22 - 37 , 09/08	Eponge - 10 cm autour plaque d'égoût et déchets marrons entre plaque et sol	1000	9,60E+09	2,40E+08	2,80E+09	8,50E+07	2,80E+09	8,50E+07	2,20E+09	5,50E+07
22 - 38 , 09/08	Eponge - sol près de la fenêtre - 40 x 40 cm	1600	1,10E+07	170000	3800	59	3800	58	3300	52

N°	DATE	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	SURFACE (cm ²)	G.A.M.	G.A.M./25cm ²	E	E./25cm ²	C	C./25cm ²	C.T.	C.T./25cm ²
CONDENSEUR 2EME											
23 - 127	09/08	Résidu - Déchets près d'une poubelle, à côté de la pompe		190000		200000		40		< 10	
23 - 25	09/08	Eponge - Condenseur près de l'escalier - 25 x 25 cm	625	3,40E+06	140000	80	3	< 80	-	< 80	-
23 - 26	09/08	Eponge - Sous tuyau près de la pompe	625	160000	6400	720	29	< 80	-	< 80	-
23 - 27	09/08	Eponge - Sol en coin au fond à gauche - 40 x 40 cm	1600	1,90E+06	30000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
23 - 28	09/08	Eponge - Dessous pompe et entonnoir d'évacuation de condensat	3000	1,00E+07	150000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
23 - 29	09/08	Eponge - Sol près de l'escalier - 40 x 40 cm	1600	690000	11000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
CONDENSEUR 1ER											
24 - 130	09/08	Résidu - Sur plateforme coin droit, stockage d'outils : niveau jonction centrale		1,20E+09		< 10		< 10		< 10	
24 - 131	09/08	Résidu - Descente de condensat sur plateforme coin droit (humide)		1,20E+09		10000		10000		9200	
24 - 30	09/08	Eponge - Sol - 30 x 40 cm	1200	75000	1600	< 80	-	< 80	-	< 80	-
24 - 31	09/08	Eponge - Escalier accès terrasse - 4 premières marches	3000	2,40E+06	20000	1400	12	560	5	< 80	-
24 - 32	09/08	Eponge - Sol près des condenseurs (aspect propre) - 40 x 40 cm	1600	29000	450	160	2	< 80	-	< 80	-
24 - 33	09/08	Eponge - Sol derrière l'escalier - 40 x 40 cm	1600	120000	1900	80	1	< 80	-	< 80	-
24 - 34	09/08	Eponge - Dessus table pour outils (pas propre) - 30 x 40 cm	1200	58000	1200	< 80	-	< 80	-	< 80	-
CONDENSEUR RDC											
25 - 100	09/08	Eponge - 3 marches escalier	900	1,00E+07	280000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
25 - 145	09/08	Résidu - Mortier/joints de carrelage		16000		< 10		< 10		< 10	
25 - 146	09/08	Résidu - Gravier et sable dans un ancien passage de tuyauterie (sec)		2000		< 10		< 10		< 10	
25 - 187	09/08	Résidu - Joint pourri à la base du pilier d'angle des évaporateurs		640000		2800		3000		< 10	
25 - 188	09/08	Résidu - Vieille lamelle de fer près du mur derrière les condenseurs		960000		4800		4000		< 10	
25 - 41	09/08	Eponge - Eau résiduelle sous les condenseurs - 1m2	10000	1,50E+09	3,75E+06	< 80	-	< 80	-	< 80	-
25 - 45	09/08	Eponge - Sur premier évaporateur	900	100000	2800	< 80	-	< 80	-	< 80	-
25 - 46	09/08	Eponge - Sol couloir accès local palettes/bottes - 30 x 30 cm	900	270000	7500	80	2	80	2	< 80	-

N° - DATE	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	SURFACE (cm²)	G.A.M.	G.A.M./25cm²	E.	E./25cm²	C.	C./25cm²	C.T.	C.T./25cm²
RECEPTION LAIT										
26 - 222 , 10/08	Eponge - Sol devant la porte près du pasteurisateur - 30 x 30 cm	900	1,20E+09	3,33E+07	2100	58	960	27	160	4
26 - 222bis , 10/08	Ecouvillon - Sol pas de la porte près des pasteurisateurs - 5 x 5 cm	25	17000	680						
26 - 223 , 10/08	Eponge - Sol devant la porte de sortie vers le qual - 30 x 30 cm	900	1,10E+09	3,06E+07	1,20E+09	3,33E+07	5,60E+07	1,56E+06	180000	5000
26 - 223bis , 10/08	Ecouvillon - Sol devant la porte de sortie vers le qual - 5 x 5 cm	25	37000	1500						
TANKS LAIT FRAIS										
27 - 224 , 10/08	Eponge - Sol devant la porte donnant sur la voie de chemin de fer - 30 x 30 cm	900	500000	14000	480	13	480	13	< 80	.
27 - 224bis , 10/08	Ecouvillon - Sol devant la porte donnant sur la voie de chemin de fer - 5 x 5 cm	25	600	24						
DISSOLUTION										
28 - 225 , 10/08	Eponge - Sol, pas de la porte intérieur - 30 x 30 cm	900	2,90E+07	810000	240000	6700	240000	6700	27000	750
28 - 225bis , 10/08	Ecouvillon - Pas de la porte intérieur - 5 x 5 cm	25	3,00E+07	1,20E+06						
ZONE HUMIDE EXTERNE										
TERRASSE TOUR										
29 - 141 , 10/08	Résidu - Près de la 2ème cheminée		100000		110000		110000		84000	
29 - 142 , 10/08	Résidu - Angle au fond à gauche		33000		5400		4800		5000	
29 - 143 , 10/08	Résidu - Près de l'égoût à côté de l'entrée		800000		300000		300000		280000	
TERRASSE 2EME										
30 - 144 , 10/08	Résidu - toit		1,30E+08		1200		< 10		< 10	

E = Entérobactéries

C = Coliformes totaux

C.T. = Coliformes totaux

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E	E/25cm2	C.	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
1	7e - coin au fond à droite - 11/04	115000	1150	13000	130	12000	120	12000	120
2	7e - coin à gauche - 11/04	160000	1600	< 80	-	< 80	-	< 80	-
3	7e - coin à droite après entrée - 11/04	175000	1750	< 80	-	< 80	-	< 80	-
4	7e - coin au fond à gauche - 11/04	48000	480	80	1	80	1	80	1
5	7e - coin à droite (mouche) - 11/04	22000	220	< 80	-	< 80	-	< 80	-
6	7e - entre 2 colonnes à gauche - 11/04	275000	2750	230000	2300	160000	1600	< 80	-
7	7e - contre de la pièce - 11/04	310000	3100	800	8	800	8	80	1
8	7e - sous tuyauterie au fond à droite - 11/04	335000	3350	240	2	240	2	< 80	-
9	7e - entre machines à droite - 11/04	200000	2000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
10	7e - entre colonne et mur au fond à droite - 11/04	27000	270	160	2	160	2	80	1
17	5e - coin à gauche - 11/04	14000	140	3400	34	2200	22	560	6
18	5e - près entrée à droite - 11/04	140000	1400	19000	190	18000	180	4800	48
19	5e - coin au fond à gauche - 11/04	53000	530	24000	240	1600	16	880	9
20	5e - coin à droite - 11/04	11000	110	4200	42	4000	40	3900	39
25	5e - niveau milieu mur face entrée - 11/04	82000	820	4800	48	640	6	< 80	-
105	5e - coin au fond à droite - 11/04	38000	380	1600	16	1200	12	320	3
21	5e1/2 - milieu mur droite - 11/04	140000	1400	560	6	560	6	160	2
22	5e1/2 - près escalier - 11/04	64000	640	1400	14	1400	14	< 80	-
23	5e1/2 - coin au fond à droite - 11/04	80000	800	560	6	560	6	< 80	-
24	5e1/2 - coin au fond à gauche - 11/04	170000	1700	2000	20	1800	18	400	4
30	4e - au fond passerelle près 2e échelle - 11/04	320000	3200	130000	1300	130000	1300	59000	590
31	4e - échelle d'accès au cyclone du fond - 11/04	130000	1300	100000	1000	96000	960	96000	960
32	4e - angle et bouche d'égoût entrée passerelle - 11/04	4800	48	< 80	-	< 80	-	< 80	-
34	3e - coin au fond à gauche - 11/04	26000	260	3000	30	1200	12	1200	12
35	3e - coin à gauche - 11/04	80000	800	1600	16	480	5	240	2
36	3e - coin à droite - 11/04	34000	340	160	2	80	1	< 80	-
37	3e - milieu pièce entre appareils - 11/04	4,20E+06	42000	110000	1100	3200	32	1600	16
38	3e - coin au fond à droite - 11/04	64000	640	480	5	< 80	-	< 80	-

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E.	E/25cm2	C.	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
39	2e - entre mur gauche et centre sous tuyauterie - 11/04	78000	780	560	6	400	4	< 80	-
42	2e - passerelle avec poudre et luyaul plastique près ventilateur, sur la gauche - 11/04	126000	1260	880	9	880	9	640	6
46	2e - sur plaque métallique sous arrivée léclithine, face entrée - 11/04	140000	1400	240	3	< 80	-	< 80	-
47	2e - sous corde de frappe et contre le rebord passage cyclone, au fond à droite - 11/04	70000	700	16000	160	10000	100	1200	12
49	2e - coin à droite près de la bouche d'égout - 11/04	370000	3700	50000	500	50000	500	32000	320
81	Post-sécheur - 1er palier passerelle - 12/04	260000	2600	6600	66	4000	40	1800	18
82	Post-sécheur - coin à droite près de la colonne eau (poudre sur la plaque d'égout) - 12/04	700000	7000	3400	34	3200	32	1400	14
83	Post-sécheur - passerelle inférieure - 12/04	315000	3150	1500	15	1100	11	800	8
84	Post-sécheur - passerelle supérieure - 12/04	280000	2800	3200	32	3100	31	1400	14
85	Post-sécheur - sous passerelle vers le fond à droite - 12/04	230000	2300	4800	48	4800	48	4700	47
86	Post-sécheur - passerelle supérieure côté opposé - 12/04	115000	1150	160	2	160	2	160	2
87	Post-sécheur - devant escalier passerelle au fond à gauche - 12/04	530000	5300	28000	280	20000	200	20000	200
88	Post-sécheur - 1er palier passerelle côté mur - 12/04	130000	1300	5500	55	5500	55	3400	34
89	Post-sécheur - caniveau partie centrale à gauche entrée - 12/04	260000	2600	4500	45	2600	26	2600	26
90	Post-sécheur - devant porte d'accès local humide (traces de pas) - 12/04	2,00E+06	20000	800	8	560	6	560	6
95	1er, local humide - entrée (traces sur le sol) - 12/04	8,00E+06	80000	7000	70	1200	12	1000	10
96	1er, local humide - près mur face entrée (sol sec) - 12/04	2,20E+06	22000	160	2	80	1	80	1
97	1er, local humide - milieu mur droite (sol encrassé) - 12/04	4,00E+09	4,00E+07	1,30E+06	13000	1,30E+06	13000	165000	1650
98	1er, local humide - coin au fond à droite, près bouche d'égout et eau stagnante (sol sec) - 12/04	1,90E+08	1,90E+06	1,70E+08	1700000	5,90E+07	590000	3,30E+07	330000
99	1er, local humide - coin à droite près stockage de matériel (sol encrassé) - 12/04	1,90E+07	190000	12000	120	11000	110	1400	14
51	4e, local annexe - coin gauche - 12/04	26000	260	800	8	800	8	< 80	-
52	4e, local annexe - dessus plaque inox au fond à gauche - 12/04	13000	130	< 80	-	< 80	-	< 80	-
53	4e, local annexe - coin droit - 12/04	300000	3000	105000	1050	105000	1050	13000	130
54	4e, local annexe - coin au fond à droite - 12/04	6400	64	880	9	400	4	< 80	-
55	4e, local annexe - coin au fond à gauche (mouche) - 12/04	1600	16	800	8	400	4	240	2
56	4e, local annexe - entrée passerelle à gauche - 12/04	390000	3900	80	1	80	1	< 80	-
57	4e, local annexe - centre pièce vers la droite - 12/04	21000	210	720	7	560	6	< 80	-
58	4e, local annexe - deux marches de l'escalier d'accès à la passerelle de droite - 12/04	150000	1500	240	2	240	2	240	2

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E.	E/25cm2	C.	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
59	4e, local annexe - deux marches en haut vers la passerelle à gauche - 12/04	125000	1250	240	2	240	2	160	2
60	4e, local annexe - plateforme devant ouverture d'une trémie sur la gauche - 12/04	7,80E+06	78000	800	8	< 80	-	< 80	-
65	2e, local annexe - moteurs 8605/8609 - 12/4	16000	160	< 80	-	< 80	-	< 80	-
66	2e 1/2, local annexe - coin à gauche - 12/04	85000	850	< 80	-	< 80	-	< 80	-
67	2e 1/2, local annexe - coin à droite - 12/04	32000	320	80	1	80	1	< 80	-
68	2e 1/2, local annexe - coin au fond à droite - 12/04	105000	1050	1600	16	800	8	720	7
69	2e, local annexe - moteurs 8603/8604 - 12/04	< 1.600	-	< 80	-	< 80	-	< 80	-
70	2e 1/2, local annexe - coin au fond à gauche - 12/04	53000	530	160	2	< 80	-	< 80	-
71	2e 1/2, local annexe - centre pièce - 12/04	48000	480	80	1	< 80	-	< 80	-
72	2e, local annexe - sous armoire électrique 6V3, coin de la plateforme - 12/04	21000	210	< 80	-	< 80	-	< 80	-
74	2e, local annexe - moteurs 8600/8608 - 12/04	125000	1250	< 80	-	< 80	-	< 80	-
78	2e, local annexe - partie centrale - 12/04	13000	130	< 80	-	< 80	-	< 80	-
113	Stock toles - gauche entrée, 1m du mur au milieu entre 2 rangées de toles - 18/04	16000	160	< 80	-	< 80	-	< 80	-
114	Stock toles - droite entrée, milieu couloir Fenwick, 1m du mur et des toles - 18/04	415000	4150	< 80	-	< 80	-	< 80	-
115	Stock toles - vers la droite, 1m du tilt 9 en fonctionnement (poudre) - 18/04	70000	700	720	7	640	6	< 80	-
116	Stock toles - au fond à droite, 1m du tilt SR hors fonctionnement - 18/04	140000	1400	1100	11	880	9	< 80	-
117	Stock toles - 1m des tilts du fond, entre les deux - 18/04	110000	1100	80	1	< 80	-	< 80	-
118	Stock toles - tout au fond à droite, devant porte vers autre atelier (courant d'air entrant) - 18/04	480000	4800	11000	110	11000	110	1600	16
119	Stock toles - vers la droite, bascule V2 (près d'un Fenwick garé) - 18/04	25000	250	480	5	480	5	240	2
120	Stock toles - plus loin à droite, derrière bascule V3 hors fonctionnement - 18/04	6400	64	160	2	160	2	< 80	-
122	Stock toles - à droite, au fond de la salle stockage tilts, près de palettes en bois - 18/04	150000	1500	240	2	< 80	-	< 80	-
123	Stock toles - coin tout au fond à droite, salle conditionnement tilts, près d'une machine - 18/04	2,80E+06	28000	880	9	800	8	800	8
130	Rdc, stockage - coin au fond à droite - 18/04	190000	1900	6300	63	6000	60	6000	60
131	Rdc, stockage - coin à droite - 18/04	400000	4000	1400	14	1200	12	< 80	-
132	Rdc, stockage - milieu mur droit - 18/04	175000	1750	6400	64	2100	21	1800	18
133	Rdc, stockage - centre pièce vers la droite - 18/04	185000	1850	1300	13	1200	12	< 80	-
134	Rdc, stockage - centre mur face entrée - 18/04	4,00E+06	40000	2400	24	2400	24	240	2
138	Rdc, stockage - entrée - 18/04	150000	1500	8200	82	8000	80	3000	30

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	Q.A.M.	Q.A.M./25cm2	E.	E/25cm2	C.	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
139	Rdc, stockage - coin au fond à gauche (face entrée) - 18/04	80000	800	2100	21	2100	21	2100	21
140	Rdc, stockage - centre pièce près pilier - 18/04	100000	1000	3200	32	3000	30	3000	30
141	Rdc, stockage - milieu mur à droite entrée, face à une porte - 18/04	110000	1100	2200	22	1600	16	1600	16
142	Rdc, stockage - milieu mur gauche - 18/04	3,90E+06	39000	1800	18	1600	16	1600	16
135	Albro - coin au fond à gauche - 18/04	13000	130	560	6	< 80	-	< 80	-
136	Albro - coin au fond à droite devant sortie - 18/04	195000	1950	1500	15	1300	13	1000	10
143	Albro - sous 2/3 chaîne - 18/04	11000	110	< 80	-	< 80	-	< 80	-
144	Albro - entrée droite - 18/04	130000	1300	1500	15	1500	15	< 80	-
145	Albro - entrée gauche - 18/04	27000	270	560	6	240	2	< 80	-
146	Albro - milieu mur gauche après entrée - 18/04	400000	4000	880	9	880	9	< 80	-
147	Albro - sous balance près bureau - 18/04	280000	2800	1200	12	1200	12	< 80	-
148	Albro - sous 1/3 chaîne - 18/04	83000	830	5000	50	4800	48	4800	48
151	Albro - vers la fin de la chaîne, côté extérieur - 18/04	53000	530	3200	32	< 80	-	< 80	-
157	Albro - au fond sous la chaîne après le coude, côté intérieur - 18/04	29000	290	< 80	-	< 80	-	< 80	-
152	Emballage - coin au fond à gauche - 18/04	11000	110	800	8	800	8	< 80	-
153	Emballage - coin pièce milieu mur du fond près sortie et ligne - 18/04	< 1.600	-	< 80	-	< 80	-	< 80	-
154	Emballage - coin tout au bout à gauche - 18/04	28000	280	2400	24	160	2	160	2
155	Emballage - milieu pièce près ligne, sur la gauche - 18/04	170000	1700	400	4	400	4	< 80	-
156	Emballage - milieu pièce, sur la gauche - 18/04	4,00E+07	400000	80	1	< 80	-	< 80	-
158	Emballage - entrée droite - 18/04	90000	900	2600	26	2400	24	1200	12
159	Emballage - sol quadrillé près chaîne face entrée, près Albro - 18/04	590000	5900	2400	24	960	10	960	10
160	Emballage - entrée au fond près Albro, sol 1/2 quadrillé plastique - 18/04	1,60E+06	16000	1800	18	1600	16	320	3
161	Emballage - milieu pièce, entre 155 et 156, plus vers l'entrée - 18/04	4800	48	80	1	80	1	< 80	-
162	Emballage - entrée gauche - 18/04	4,00E+06	40000	1200	12	1200	12	640	6
163	Sous-sol - interface intérieure près ascenseur - 18/04	350000	3500	1000	10	1000	10	< 80	-
164	Sous-sol - devant porte escalier - 18/04	325000	3250	3500	35	3200	32	3200	32
165	Sous-sol - interface vers salle tuyauteries, début du couloir à gauche - 18/04	400000	4000	1600	16	1600	16	480	5
166	Sous-sol - milieu palier devant ascenseur - 18/04	4,00E+06	40000	1100	11	1100	11	320	3

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E.	E/25cm2	C.	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
167	Sous-sol - milieu couloir côté ascenseur - 18/04	170000	1700	4200	42	4100	41	< 80	-
168	Sous-sol - Interface côté piétons - 18/04	130000	1300	1200	12	1200	12	400	4
169	Sous-sol - interface côté Fenwicks - 18/04	560000	5600	1400	14	1400	14	1400	14
170	Sous-sol - interface côté piétons, 5m - 18/04	240000	2400	1600	16	1200	12	1200	12
171	Sous-sol - Interface côté Fenwicks, 5m - 18/04	330000	3300	960	10	880	9	400	4
172	Sous-sol - milieu couloir, côté interface - 18/04	255000	2550	1800	18	1600	16	1600	16
12	Palier 7e - 11/04	580000	5800	80	1	< 80	-	< 80	-
13	1er palier sous 7e - 11/04	165000	1650	800	8	720	7	< 80	-
14	2e palier sous 7e, local électrique (flux d'air frais) - 11/04	150000	1500	240	2	240	2	< 80	-
15	Palier 5e - 11/04	170000	1700	480	5	480	5	< 80	-
16	Rebord de marche, rainure - 11/04	370000	3700	1600	16	1600	16	< 80	-
26	Palier sous 5e, coin opposé à la fenêtre (trace de pas) - 11/04	62000	620	400	4	400	4	240	2
27	Dernière marche sous 5e, rainure - 11/04	8,00E+06	80000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
28	Palier devant local 4e annexé - 11/04	80000	800	160	2	160	2	160	2
29	Palier 4e - 11/04	145000	1450	400	4	400	4	< 80	-
43	Palier 3e - 11/04	100000	1000	720	7	720	7	< 80	-
44	1er palier sous 3e (+ rebord marche)- 11/04	380000	3800	2500	25	2200	22	400	4
45	2e palier sous 3e(+ rebord marche) - 11/04	325000	3250	6400	64	6100	61	1000	10
48	3e palier sous 3e (+ rebord marche)- 11/04	370000	3700	2200	22	1600	16	1400	14
73	Palier 2e - 12/04	48000	480	< 80	-	< 80	-	< 80	-
75	Palier en haut escalier 2e (+ rebord marche)- 12/04	140000	1400	5200	52	3200	32	480	5
76	1er palier sous 2e (+ rebord marche) - 12/04	150000	1500	5700	57	5600	56	3100	31
77	2e palier sous 2e(+ rebord marche) - 12/04	180000	1800	2800	28	2800	28	960	10
79	3e palier sous 2e (+ rebord marche) - 12/04	110000	1100	640	6	560	6	560	6
80	Palier 1er - 12/04	2,00E+06	20000	720	7	640	6	80	1
104	1er palier sous 1er (+ rebord marche) - 18/04	1,10E+06	11000	4000	40	3800	38	80	1
109	2e palier sous 1er (+ rebord marche) - 18/04	695000	6950	1300	13	1300	13	80	1
110	3e palier sous 1er (+ rebord marche) - 18/04	510000	5100	2700	27	2400	24	160	2
111	Palier rdc, face porte - 18/04	470000	4700	1200	12	880	9	320	3
112	Palier sous-sol, face porte - 18/04	480000	4800	2400	24	2400	24	1200	12

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E.	E/25cm2	C.	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
121	Pallier sous rdc (+ rebord marche) - 18/04	505000	5050	16000	160	16000	160	560	6
201	Aspirateur 7e - 11/04	29000		140		140		< 10	
202	Aspirateur 7e - 11/04	25000		200		200		20	
203	Aspirateur 7e - 11/04	22000		120		80		< 10	
204	Aspirateur 7e - 11/04	72000		240		240		10	
205	Aspirateur 7e - 11/04	13000		1700		1600		20	
206	Aspirateur 5e - 11/04	1400		10		< 10		< 10	
207	Aspirateur 5e - 11/04	1200		80		60		60	
208	Aspirateur 5e - 11/04	3400		620		600		590	
209	Aspirateur 5e - 11/04	800		45		40		10	
210	Aspirateur 5e - 11/04	5600		60		50		20	
216	Aspirateur 4e - 11/04	14000		14000		14000		14000	
217	Aspirateur 4e - 11/04	54000		42000		30000		24000	
218	Aspirateur 4e - 11/04	17000		16000		15000		8400	
219	Aspirateur 4e - 11/04	56000		15000		14000		3800	
220	Aspirateur 4e - 11/04	150000		49000		47000		47000	
211	Aspirateur 3e - 11/04	1000		60		60		< 10	
212	Aspirateur 3e - 11/04	200		10		< 10		< 10	
213	Aspirateur 3e - 11/04	400		40		< 10		< 10	
214	Aspirateur 3e - 11/04	400		20		20		< 10	
215	Aspirateur 3e - 11/04	400		20		20		< 10	
221	Aspirateur 2e - 11/04	6000		20		20		< 10	
222	Aspirateur 2e - 11/04	6000		20		20		< 10	
223	Aspirateur 2e - 11/04	11000		10		10		< 10	
224	Aspirateur 2e - 11/04	7400		50		50		< 10	
225	Aspirateur 2e - 11/04	4800		10		10		< 10	

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E	E/25cm2	C.	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
241	Aspirateur post-sécheur sur passerelle - 12/04	400		130		110		110	
242	Aspirateur post-sécheur sur passerelle - 12/04	1000		20		20		20	
243	Aspirateur post-sécheur sur passerelle - 12/04	600		30		30		< 10	
244	Aspirateur post-sécheur sur passerelle - 12/04	200		30		30		30	
245	Aspirateur post-sécheur sur passerelle - 12/04	400		70		60		30	
246	Aspirateur post-sécheur - 12/04	22000		18000		15000		2800	
247	Aspirateur post-sécheur - 12/04	13000		8200		7400		5200	
248	Aspirateur post-sécheur - 12/04	22000		17000		17000		11000	
249	Aspirateur post-sécheur - 12/04	8000		220		200		100	
250	Aspirateur post-sécheur - 12/04	25000		9600		8800		8400	
226	Aspirateur local annexe 4e sur passerelle - 12/04	22000		130		110		100	
227	Aspirateur local annexe 4e sur passerelle - 12/04	42000		80		80		60	
228	Aspirateur local annexe 4e sur passerelle - 12/04	30000		30		20		20	
229	Aspirateur local annexe 4e sur passerelle - 12/04	26000		30		30		30	
230	Aspirateur local annexe 4e sur passerelle - 12/04	46000		100		100		100	
231	Aspirateur local annexe 2e 1/2 - 12/04	< 200		< 10		< 10		< 10	
232	Aspirateur local annexe 2e 1/2 - 12/04	< 200		< 10		< 10		< 10	
233	Aspirateur local annexe 2e 1/2 - 12/04	1000		< 10		< 10		< 10	
234	Aspirateur local annexe 2e 1/2 - 12/04	< 200		< 10		< 10		< 10	
235	Aspirateur local annexe 2e 1/2 - 12/04	< 200		< 10		< 10		< 10	
236	Aspirateur local annexe 2e - 12/04	200		< 10		< 10		< 10	
237	Aspirateur local annexe 2e - 12/04	< 200		< 10		< 10		< 10	
238	Aspirateur local annexe 2e - 12/04	< 200		< 10		10		< 10	
239	Aspirateur local annexe 2e - 12/04	< 200		< 10		< 10		< 10	
240	Aspirateur local annexe 2e - 12/04	< 200		< 10		< 10		< 10	

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E.	E/25cm2	C.	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
251	Aspirateur local entrée stock totes - 18/04	30000		610		570		210	
252	Aspirateur local entrée stock totes - 18/04	64000		430		400		220	
253	Aspirateur local entrée stock totes - 18/04	48000		670		620		200	
254	Aspirateur local entrée stock totes - 18/04	72000		1600		1400		250	
255	Aspirateur local entrée stock totes - 18/04	70000		700		260		290	
256	Aspirateur stock totes au fond - 18/04	18000		60		60		20	
257	Aspirateur stock totes au fond - 18/04	7000		60		60		10	
258	Aspirateur stock totes au fond - 18/04	11000		90		90		20	
259	Aspirateur stock totes au fond - 18/04	10000		70		70		30	
260	Aspirateur stock totes au fond - 18/04	10000		80		80		40	
261	Aspirateur Albro - 18/04	600		< 10		< 10		< 10	
262	Aspirateur Albro - 18/04	1000		210		180		< 10	
263	Aspirateur Albro - 18/04	1400		< 10		< 10		< 10	
264	Aspirateur Albro - 18/04	3200		100		40		< 10	
265	Aspirateur Albro - 18/04	3200		10		< 10		< 10	
266	Aspirateur emballage - 18/04	1200		< 10		< 10		< 10	
267	Aspirateur emballage - 18/04	1200		< 10		< 10		< 10	
268	Aspirateur emballage - 18/04	1400		< 10		< 10		< 10	
269	Aspirateur emballage - 18/04	1600		210		200		< 10	
270	Aspirateur emballage - 18/04	1200		220		200		20	
271	Aspirateur stockage 1er - 18/04	16000		4800		4600		90	
272	Aspirateur stockage 1er - 18/04	8000		60		60		< 10	
273	Aspirateur stockage 1er - 18/04	12000		140		60		< 10	
274	Aspirateur stockage 1er - 18/04	25000		3000		2800		20	
275	Aspirateur stockage 1er - 18/04	54000		600		600		< 10	

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	G.A.M./25cm2	E.	E/25cm2	C.	C./25cm2	C.T.	C.T./25cm2
63	1er - Interface côté protégé niveau séparation, couloir Fenwicks - 18/04	815000	8150	< 80	-	< 80	-	< 80	-
64	1er - Interface côté protégé niveau séparation, couloir piétons - 18/04	430000	4300	1600	16	560	6	320	3
100	1er - Interface côté protégé à 5m, couloir piétons - 18/04	160000	1600	< 80	-	< 80	-	< 80	-
102	1er - Interface côté protégé à 5m, couloir Fenwicks - 18/04	1,20E+06	12000	720	7	640	6	< 80	-
103	1er - milieu couloir zone protégée, >5m de l'interface - 18/04	80000	800	80	1	< 80	-	< 80	-
101	1er - zone non protégée, 1m de l'interface, milieu couloir - 18/04	2,20E+06	22000	7200	72	2400	24	560	6
124	Rdc - Interface côté protégé, 2m de la porte, au milieu, côté Fenwicks - 18/04	690000	6900	480	5	< 80	-	< 80	-
125	Rdc - Interface côté protégé, 2m de la porte, côté piétons - 18/04	670000	6700	240	2	240	2	< 80	-
126	Rdc - Interface côté protégé, à la fin de l'interface (5-10m), côté Fenwicks - 18/04	400000	4000	1600	16	1200	12	160	2
127	Rdc - Interface côté protégé, à la fin de l'interface (5-10m), côté piétons - 18/04	510000	5100	32000	320	32000	320	4800	48
129	Rdc - milieu couloir zone protégée, >10m de l'interface - 18/04	560000	5600	17000	170	6500	65	6400	64
128	Rdc - zone non protégée, près de l'interface - 18/04	4,00E+06	40000	64000	640	60000	600	20000	200
149	Rdc - Interface côté protégé devant porte Albro - 18/04	560000	5600	< 80	-	< 80	-	< 80	-
150	Rdc - Interface côté non protégé devant porte Albro - 18/04	2,20E+06	22000	4000	40	4000	40	800	8
175	Rdc - Interface côté protégé au fond emballage - 18/04	135000	1350	80	1	< 80	-	< 80	-
174	Rdc - Interface côté non protégé au fond emballage - 18/04	140000	1400	1000	10	< 80	-	< 80	-
176	Rdc - Interface côté protégé emballage vers Albro - 18/04	310000	3100	800	8	800	8	< 80	-
177	Rdc - Interface côté non protégé emballage vers Albro - 18/04	320000	3200	13000	130	10000	100	< 80	-
173	Rdc - Interface côté non protégé passage Fenwicks près entrée emballage (traces de pneu) - 18/04	670000	6700	1400	14	1000	10	< 80	-
91	7e - Interface côté protégé - 12/04	1,30E+06	13000	3200	32	3100	31	< 80	-
106	7e - Interface côté non protégé, côté terrasse - 18/04	4,00E+06	40000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
11	7e - sas - 11/04	210000	2100	< 80	-	< 80	-	< 80	-
40	4e - sas - 11/04	410000	4100	6400	64	5000	50	2600	26
41	3e - sas - 11/04	225000	2250	7800	78	7600	76	3200	32
50	2e - sas - 11/04	32000	320	80	1	80	1	< 80	-
61	1er - devant ascenseur - 12/04	155000	1550	2800	28	2700	27	2100	21
137	Rdc - devant ascenseur - 18/04	390000	3900	2400	24	2400	24	320	3
62	Centre ascenseur - 12/04	910000	9100	16000	160	15000	150	6700	67

No	DESCRIPTION DU PRELEVEMENT	G.A.M.	G.A.M./25cm ²	E	E/25cm ²	C	C./25cm ²	C.T.	C.T./25cm ²
107	Terrasse 7e, coin Nord - 18/04	4,00E+07	400000	4300	43	4100	41	< 80	-
108	Terrasse 6e, coin Sud près d'une bouche d'égout - 18/04	4,00E+06	40000	290000	2900	285000	2850	28000	280
92	5e - petit local près du palier - 12/04	1,90E+06	19000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
33	4e - entrée local léclithine - 11/04	1,10E+06	11000	< 80	-	< 80	-	< 80	-
93	3e - petit local près du palier - 12/04	450000	4500	240	2	240	2	80	1
94	2e - petit local près du palier - 18/04	535000	5350	320	3	320	3	320	3

E = Entérobactéries

C = Coliformes totaux

C.T. = Coliformes thermotolérants

Annexe 4 : Enregistrement d'une identification d'*Enterobacter sakazakii* en C.P.G.

KIS System Software (Rev: 3.3) (Sw s/n: 3243A70037) (Hw s/n: 2944A10294) DATA:F94R05341 14-OCT-94 09:33:11

ID: 443 ENT-E-SAKAZ,59/1 Date of run: 5-OCT-94 12:05:09
Bottle: 6 SAMPLE (AEROBIC)

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.651	590412288	0.037	...	6.991	SOLVENT PERK	...	< min rt	
3.775	6128	0.033	1.082	10.924	Sum In Feature 3	2.48	ECL deviates -0.004	unknown 10.928
4.729	4249	0.035	1.057	12.000	12:0	1.68	ECL deviates 0.000	Reference 0.002
7.204	23036	0.043	1.011	13.999	14:0	8.72	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
7.971	2264	0.046	1.000	14.505	unknown 14.503	0.85	ECL deviates 0.002	
9.013	632	0.048	...	15.178	...	...		
9.528	14248	0.045	0.980	15.491	Sum In Feature 3	5.21	ECL deviates 0.001	14:0 30M/16:1 ISO I
10.070	61964	0.045	0.974	15.820	16:1 w7c	22.53	ECL deviates 0.003	
10.365	79288	0.044	0.970	15.999	16:0	28.71	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
11.891	2160	0.051	0.954	16.890	17:0 CYCLO	0.77	ECL deviates 0.002	Reference 0.001
13.517	81632	0.049	0.938	17.824	Sum In Feature 7	28.60	ECL deviates -0.001	18:1 w9c/w12t/w7c
13.822	1312	0.052	0.936	17.999	18:0	0.46	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
*****	26376	...	...	...	SUMMED FEATURE 3	7.69	12:0 RLOE ?	unknown 10.928
*****	...	...	...	...	...	...	16:1 ISO I/14:0 30M	14:0 30M/16:1 ISO I
*****	81632	...	...	...	SUMMED FEATURE 7	28.60	18:1 w7c/w9t/w12t	18:1 w9c/w12t/w7c
*****	...	...	...	...	...	...	18:1 w12t/w9t/w7c	

Solvent Ar Total Area Named Area % Named Total Amt Nbr Ref ECL Deviation Ref ECL Shift

590412288 277192 276360 99.70 267831 5 0.002 0.001

ISBR [Rev 3.90]	Enterobacter	0.982
	E. sakazakii	0.982
	E. agglomerans*	0.590 (Erwinia herbicola group)
	E. cloacae*	0.536 (excludes ATCC 35549 which is atypical)
	Klebsiella	0.542
CLIN [Rev 3.90]	K. pneumoniae	0.542
	K. p. pneumoniae*	0.542
	Enterobacter	0.528
	E. sakazakii	0.528
	E. cloacae	0.263
	E. c. 6C subgroup A*	0.263
	Salmonella	0.378
	S. typhimurium	0.378
	S. choleraesuis	0.261
	S. c. choleraesuis	0.261
	Campylobacter	0.278 (Chocolate, blood, MH/blood, CO2)
	C. fetus	0.278 (Chocolate, blood, MH/blood, CO2)
	C. f. fetus	0.278 (Chocolate, blood, MH/blood, CO2)

Annexe 4 : Enregistrement d'une identification d'*Enterobacter sakazakii* en C.P.G.

MIS System Software (Rev: 3.3) (Sw s/n: 3243R70037) (Hw s/n: 2944R10294) DATA: F94R05341 14-OCT-94 09:33:11
Continue: 443 ENTE-SAKAZ,59/1 [AER00E] 5-OCT-94 12:05:09

Comparison with TSBR (Rev 3.80): Enterobacter-sakazakii Distance: 1.623

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
12:0.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14:0.	.	.*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
unknown 14.503. . .	.	.	.*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16:1 w7c.	.	.	.	.	----	x--	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16:0.	.	.	.	.	.	---	x.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17:0 CYCLO.	.	..	x---	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18:0.	.	..	..	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SUMMED FEATURE 3. . .	.	.	..	..	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SUMMED FEATURE 7. . .	.	.	.	.	.	.	---	x-----	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Comparison with CLIN (Rev 3.80): Enterobacter-sakazakii Distance: 3.650

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
12:0.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14:0.	.	.	..	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
unknown 14.503. . .	.	.	..	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15:0.	.	..	..	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16:1 w7c.	.	.	.	.	---	t--	x.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16:0.	.	.	.	.	.	.	..	x---	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17:0 CYCLO.	.	..	x---	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17:0.	.	..	..	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18:0.	.	..	..	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19:0 CYCLO w8c. . .	.	..	..	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SUMMED FEATURE 3. . .	.	.	..	..	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SUMMED FEATURE 7. . .	.	.	.	.	.	.	---	t--	x.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

SIGNAL NO PLOT
END OF SIGNAL

#

=====

BOTTLE: 6 IDH: 443
SAMPLE
ENTE-SAKAZ, 39/1

WED 05-OCT-94 12:02:46
FILE DATA:F94A05341

RUN # 6 OCT 5, 1994 12:05:09
START

