

SESSION 2026

AGREGATION
CONCOURS EXTERNE

Section

BIOCHIMIE-BIOLOGIE-BIOTECHNOLOGIE

Epreuve écrite de biotechnologie

Durée : 6 heures

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout dictionnaire et de tout matériel électronique (y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.

Il appartient au candidat de vérifier qu'il a reçu un sujet complet et correspondant à l'épreuve à laquelle il se présente.

Si vous repérez ce qui vous semble être une erreur d'énoncé, vous devez le signaler très lisiblement sur votre copie, en proposer la correction et poursuivre l'épreuve en conséquence. De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, vous devez la (ou les) mentionner explicitement.

NB : Conformément au principe d'anonymat, votre copie ne doit comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé consiste notamment en la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de la signer ou de l'identifier. Le fait de rendre une copie blanche est éliminatoire.

Tournez la page S.V.P.

ÉNONCÉ DU SUJET

Évolution des méthodes de détection d'*Escherichia coli*.

Les souches d'*Escherichia coli* pathogènes telles que le sérotype O157:H7 sont régulièrement impliquées dans des épisodes de toxi-infections alimentaires graves. Afin de limiter ces risques, des contrôles, fondés sur des méthodes normalisées, sont réalisés pour vérifier la qualité microbiologique de l'eau ou des aliments au regard des critères réglementaires. Ces méthodes de contrôle, en constante évolution, sont aujourd'hui complétées par des technologies plus récentes, visant à renforcer la rapidité et la fiabilité de détection des souches d'*E. coli* pathogènes pour mieux répondre aux exigences de santé publique.

L'étude que vous mènerez, sous forme d'une composition structurée, vise à montrer comment les progrès technologiques, en améliorant les performances de détection et de quantification des *E. coli*, permettent de renforcer la sécurité alimentaire et la prévention des toxi-infections. Vous prendrez en compte les évolutions scientifiques fondamentales conduisant aux principes des techniques de détection ou de quantification des *E. coli* ainsi que les enjeux sociétaux de la sécurité sanitaire de l'eau et des aliments.

Une attention particulière sera portée à l'analyse rigoureuse des documents, figurant dans le corpus documentaire.

1. Méthodes de référence

Les méthodes de référence, répondant aux normes nationales ou internationales, sont utilisées par les laboratoires de contrôle pour évaluer la qualité de l'eau ou des aliments, potentiellement à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives. Elles sont également utilisées pour valider de nouvelles méthodes plus performantes pour la détection des micro-organismes contaminants.

Dans une première partie, en prenant notamment appui sur les attendus ci-dessous, vous montrerez l'adéquation de chaque méthode de référence à leur contexte d'application, au regard de la nature du produit et de sa conformité aux critères microbiologiques réglementaires le concernant : vous prendrez en exemple le dénombrement d'*Escherichia coli* comme indicateur de contamination fécale et la détection de certains des sérotypes pathogènes d'*E. coli*. Vous discuterez également des performances de ces méthodes, et montrerez comment leur évolution s'appuie sur des avancées technologiques.

Attendus pour la partie 1 :

- Présentation succincte des objectifs sanitaires des méthodes de référence et identification de leurs principaux critères de performance dans le cadre de la sécurité alimentaire de l'eau et des aliments.
- Analyse comparative des performances d'une méthode de dénombrement fondée sur la culture sur gélose avec celles d'une méthode de dénombrement en milieu liquide.
- Présentation du principe de la PCR en temps réel pour la détection des STEC (*shigatoxin-producing E. coli*) et mise en évidence de sa plus-value par rapport aux méthodes classiques de culture ou de sérotypage.

2. Méthodes alternatives

Les méthodes alternatives, issues de solutions technologiques plus récentes, permettent d'évaluer, pour une catégorie de produits, les mêmes paramètres que ceux analysés par les méthodes de référence correspondantes. Leurs performances métrologiques doivent être démontrées par rapport aux méthodes de référence pour être certifiées et elles possèdent des avantages concrets.

Dans une deuxième partie, en prenant notamment appui sur les attendus ci-dessous, vous discuterez de la pertinence de mettre en œuvre la surveillance microbiologique de l'eau et des aliments grâce à des méthodes alternatives. Vous montrerez en quoi chaque méthode alternative proposée est adaptée à son contexte d'application et contribue au renforcement de la sécurité alimentaire.

Attendus pour la partie 2 :

- Analyse comparative des principes des trois méthodes alternatives proposées.
- Comparaison des performances de ces méthodes alternatives.
- Identification de leurs avantages et de leurs limites par rapport aux méthodes de référence.

3. Méthodes émergentes

Les méthodes dites émergentes sont en cours de développement. Faisant appel aux dernières avancées des biotechnologies, elles offrent des performances spécifiques en lien avec les technologies mises en œuvre.

Dans une troisième partie, en prenant notamment appui sur les attendus ci-dessous, vous montrerez en quoi les avancées technologiques permettent de concevoir des méthodes émergentes répondant mieux à certains contextes d'utilisation. Vous discuterez des avantages que proposent ces innovations par rapport aux méthodes de référence et aux méthodes alternatives.

Attendus pour la partie 3 :

- Explication du principe de détection d'*E. coli* O157:H7 dans un échantillon par les deux méthodes émergentes proposées et présentation de leurs avantages.
- Analyse des tests d'optimisation et identification des améliorations.
- Regard critique sur les critères de performance de ces deux méthodes au vu des exigences réglementaires.

INFORMATION AUX CANDIDATS

Vous trouverez ci-après les codes nécessaires vous permettant de compléter les rubriques figurant en en-tête de votre copie. Ces codes doivent être reportés sur chacune des copies que vous remettrez.

Concours

EAE

Section/option

7100

Epreuve

103

Matière

1431

CORPUS DOCUMENTAIRE

DOC.	TITRE	PAGE
Éléments de contexte		
1	Communiqué de presse du 18 juin 2025 (Préfète de l'Aisne, ARS)	2
2	Quelques données sur <i>Escherichia coli</i>	4
3	Réglementations concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires et à l'eau potable	5
Méthodes de référence		
4	Méthode normalisée pour le dénombrement des coliformes par la technique du NPP	7
5	Tables NPP	9
6	Méthode normalisée pour le dénombrement des <i>E. coli</i> β -glucuronidase-positives par comptage des colonies sur milieu chromogène	11
7	Calcul des concentrations bactériennes à partir de comptages de colonies sur boîtes	13
8	Méthode normalisée pour la détection des <i>E. coli</i> STEC et la détermination des sérogroupes par la technique de qPCR en temps réel	14
Méthodes alternatives		
9	Colilert®-18 / Quanti-Tray®	15
10	Microsnap® <i>E. coli</i>	17
11	VIDAS® UP <i>E. coli</i> O157	19
Méthodes émergentes		
12	Un biosenseur à DNAzyme pour une détection rapide, spécifique et sensible de <i>E. coli</i> au point d'usage	21
13	Mise au point du biosenseur à DNAzyme pour la détection de <i>E. coli</i> au point d'usage	22
14	Technologie RPA-CRISPR/Cas12a pour détecter <i>E. coli</i> O157:H7	25
15	Détermination de la limite de détection du système RPA-CRISPR/Cas12a combiné à une filtration préalable	27

PLUSIEURS CAS D'INTOXICATIONS ALIMENTAIRES SÉVÈRES, DONT 4 CAS DE SYNDROME HÉMOLYTIQUE ET URÉMIQUE DANS L'AGGLOMÉRATION DE SAINT-QUENTIN.

Laon, le mercredi 18 juin 2025

Sept cas de diarrhées glairo-sanglantes ont été recensés chez des enfants de 1 à 12 ans résidant à Saint-Quentin et dans les environs. Les symptômes ont débuté entre le 12 et le 17 juin, 4 d'entre eux ont développé un syndrome hémolytique et urémique (SHU) dont l'un est décédé. Santé publique France (SPF) et l'agence régionale de santé (ARS) réalisent des investigations pour identifier l'origine des contaminations.

Point de situation au 18 juin

L'ARS a été informée du décès le 16 juin d'un enfant de 12 ans habitant Saint-Quentin d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Le SHU est une complication rare qui se caractérise notamment par une insuffisance rénale aiguë, due à la présence d'une shigatoxine.

Six autres enfants, résidant également à Saint-Quentin ou dans les environs, ont été pris en charge aux urgences du centre hospitalier de Saint-Quentin entre le 13 et le 18 juin pour symptomatologie digestive sévère (diarrhées sanglantes), dont trois présentent un SHU. Des analyses biologiques sont en cours pour identifier la souche bactérienne ayant infecté chaque enfant et pour déterminer si ces souches présentent des caractéristiques similaires entre elles.

Une enquête est en cours pour déterminer l'origine de cette intoxication

Dès le signalement de ces cas, SPF et ARS ont immédiatement engagé les investigations pour rechercher une éventuelle origine commune de la contamination. Les premiers éléments de l'enquête n'ont pas permis d'établir la prise de repas en commun pour ces 7 enfants.

Au stade actuel des investigations, il apparaît que les enfants ne fréquentent pas tous les mêmes collectivités et les sources d'approvisionnement alimentaire des familles sont multiples. Les investigations se poursuivent activement.

Le SHU, une complication d'une maladie bactérienne

Le SHU est une maladie infectieuse le plus souvent d'origine alimentaire qui survient dans la plupart des cas comme complication d'une intoxication à une bactérie de la famille des *Escherichia coli* (*E. coli*). Une infection par la bactérie *E. coli* se manifeste par de la diarrhée souvent accompagnée de sang, des douleurs abdominales et parfois de vomissements qui peuvent évoluer, après une semaine environ, vers une forme sévère de l'infection.

Celle-ci se manifeste par une grande fatigue, une pâleur et un malade qui urine beaucoup moins (voire pas du tout), avec des urines plus foncées. C'est ce qu'on appelle le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Le malade doit être hospitalisé rapidement et recevoir un traitement adapté. Cette maladie reste peu fréquente avec entre 100 et 165 enfants recensés chaque année par Santé publique France.

Consultez un médecin sans attendre en cas de diarrhées sanglantes

Si vous constatez que votre enfant présente des diarrhées sanglantes faites le 15.

La transmission de personne-à-personne est possible, en particulier en milieu familial ou dans des collectivités de jeunes enfants. Les mesures d'hygiène des mains doivent ainsi être systématiques en cas de diarrhées.

Recommandations d'hygiène pour prévenir le risque d'infection alimentaire

Comme pour toute toxi-infection alimentaire, la prévention passe par le respect des règles suivantes :

- Le lavage des mains doit être systématique avant la préparation des repas.
- Les enfants de moins de 5 ans ne doivent pas consommer de produits à base de lait cru.
- Les légumes, les fruits et les herbes aromatiques doivent être soigneusement lavés, particulièrement lorsqu'ils sont consommés crus.
- Les aliments crus doivent être conservés séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés.
- Les plats cuisinés et les restes alimentaires doivent être rapidement mis au réfrigérateur et suffisamment réchauffés et consommés rapidement.
- Les ustensiles de cuisine (surtout lorsqu'ils ont été en contact préalablement avec des aliments crus), ainsi que les plans de travail, doivent être soigneusement lavés.
- Les enfants ne doivent pas boire d'eau non traitée (eau de puits, torrent, etc.) et éviter d'en avaler lors de baignades (lac, étang, etc.).
- Les viandes doivent être cuites à cœur.

Document 2.1 : Généralités sur l'espèce *Escherichia coli*

Adapté de : <https://www.inspq.gc.ca/eau-potable/e-coli>
(consulté le 04/10/2025)

Le genre *Escherichia* fait partie du groupe des coliformes thermotolérants, lequel appartient à la famille des Entérobactéries. *Escherichia* comprend plusieurs espèces dont une seule est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux : *Escherichia coli* (*E. coli*). Il importe toutefois de préciser que bien que cette espèce comprenne plusieurs souches pathogènes, les souches considérées comme indicatrices sont non pathogènes.

E. coli est d'origine fécale humaine ou animale, car elle n'existe pas dans l'environnement naturel. Elle peut cependant survivre quelques mois dans l'eau, le sol ou sur les plantes, bien qu'elle se multiplie rarement dans ces milieux, à moins que des conditions de température élevée et la présence de nutriments le permettent. Sa détection dans l'eau doit donc être considérée comme reflétant la présence possible de micro-organismes pathogènes d'origine fécale ou entérique. *E. coli* est donc l'indicateur spécifique de ce type de contamination, et il est plus facile de l'identifier comparativement à d'autres indicateurs ou à d'autres micro-organismes pathogènes spécifiques.

Document 2.2 : Informations sur certains sérotypes

Adapté de : <https://www.anses.fr/sites/default/files/Fiche-EHEC-2024-MPEX-0031.pdf>
(consulté le 04/10/2025)

Une souche d'*E. coli* qui possède un gène *stx* (*stx1* et/ou *stx2*) codant une shigatoxine est appelée *E. coli* productrice de shigatoxines ou STEC (*shigatoxin-producing E. coli*) sans que cela ne présage du niveau de pathogénicité de cette souche pour l'Homme.

Les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) sont des souches de STEC responsables chez les humains de colite hémorragique et de micro-angiopathie thrombotique (MAT) dénommée dans ce cas syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique 2. Les EHEC produisent donc des shigatoxines et sont caractérisées par leur adhérence à la muqueuse intestinale, grâce à une adhésine appelée intimine, codée par le gène *eae*.

Les souches STEC peuvent être caractérisées par leur antigène somatique O et leur antigène flagellaire H. Le sérotype « O:H » n'intervient pas dans la virulence, mais certains sérotypes sont plus souvent identifiés comme origines des infections chez l'Homme, et ceci varie selon les pays. Les souches STEC considérées comme hautement pathogènes pour l'Homme (impliquées dans les cas d'infection grave et d'épidémies au niveau mondial) ont été définies dans l'avis de l'AFSSA ⁽¹⁾ du 15/07/2008, précisé par l'avis du 27/05/2010.

Il s'agit des souches présentant les caractéristiques des souches EHEC typiques majeures isolées chez l'Homme, c'est-à-dire possédant les gènes de virulence *stx* et *eae* et appartenant à l'un des 5 sérotypes suivants : O157:H7, O111:H8, O26:H11, O145:H28 et O103:H2.

⁽¹⁾ Agence française de sécurité sanitaire des aliments, qui depuis juillet 2010 est devenue l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail).

Document 3.1 : Introduction au règlement européen n° 2073/2005

Adapté du **Règlement (CE) n° 2073/2005** de la Commission, du 15 novembre 2005, et de : <https://agriculture.gouv.fr/denrees-alimentaires-criteres-microbiologiques-dhygiene-des-procedes> (consulté le 04/10/2025)

Le règlement (CE) n° 2073/2005, modifié par le règlement (CE) n° 1441/2007, concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, définit deux types de critères microbiologiques :

- les **critères de sécurité** définissent l'acceptabilité d'un produit ou d'un lot de denrées alimentaires. Ils sont applicables aux produits mis sur le marché jusqu'à la fin de leur durée de vie ;
- les **critères d'hygiène des procédés** évaluent l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production⁽²⁾. Ils ne sont pas applicables aux produits mis sur le marché. Chaque critère fixe une valeur indicative de contamination : si elle est dépassée, des mesures correctives doivent être mises en place pour maintenir l'hygiène du procédé, sans que cela permette de juger de la conformité du produit fini.

Les dispositions réglementaires du « Paquet Hygiène » imposent aux opérateurs du secteur alimentaire l'obligation de mettre en place, sous leur responsabilité, un **plan de maîtrise sanitaire (PMS)**, qui prend en compte les bonnes pratiques d'hygiène et les procédures fondées sur l'HACCP⁽³⁾. Il s'agit en particulier, pour les professionnels, de réaliser une analyse des dangers et de définir les moyens mis en œuvre de façon préventive pour garantir la maîtrise des dangers identifiés.

Un plan d'autocontrôles doit être intégré dans le PMS, incluant des analyses microbiologiques destinées à valider, surveiller et vérifier l'efficacité du dispositif préventif de maîtrise mis en place dans chaque établissement.

Certains critères d'hygiène des procédés sont définis de façon réglementaire pour différentes catégories de produits (**document 3.2**).

Ces critères ne sont pas toujours suffisants pour permettre un suivi des procédés utilisés par les fournisseurs. À ce titre, certains syndicats professionnels de la production ou de la transformation ont établi, sur la base de l'analyse des dangers, secteur par secteur, des critères d'hygiène des procédés applicables soit au stade de la fabrication, soit au stade de la DLC/DDM (date limite de consommation / date de durabilité minimale), qui seront à terme inclus dans les guides de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH) et d'application des principes HACCP (**document 3.3**).

L'eau est évaluée selon des critères qui n'apparaissent pas dans le règlement européen, mais qui dépendent d'autres directives réglementaires (**document 3.4**).

⁽²⁾ Par extension, les critères d'hygiène des procédés non réglementaires s'appliquent à l'étape du procédé pour laquelle ils ont été définis, dès lors qu'il y a des manipulations. Ils indiquent l'acceptabilité du fonctionnement du procédé considéré.

⁽³⁾ HACCP : Hazard Analysis Critical Control Points / Analyse des dangers, points critiques pour leur maîtrise.

Document 3.2 : Critères européens sur les denrées alimentaires

Extraits adaptés du Règlement (CE) n° 2073/2005, concernant la recherche d'*E. coli* dans certains aliments

Chapitre 1. Critères de sécurité des denrées alimentaires

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes / toxines, métabolites	Plan ⁽¹⁾ d'échantillonnage		Limites ⁽¹⁾		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère
		<i>n</i>	<i>c</i>	<i>m</i>	<i>M</i>		
Mollusques bivalves vivants et échinodermes, tuniciens et gastéropodes vivants	<i>E. coli</i> ⁽²⁾	1 ⁽³⁾	0	230 NPP/100 g de chair et de liquide intravalvaire		ISO/TS 16649-3 (recherche du NPP utilisant le BCIG)	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

NPP : nombre le plus probable

BCIG : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronate

Chapitre 2. Critères d'hygiène des procédés

2.1. Viandes et produits à base de viande

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes / toxines, métabolites	Plan ⁽¹⁾ d'échantillonnage		Limites ⁽¹⁾		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		<i>n</i>	<i>c</i>	<i>m</i>	<i>M</i>			
Viande hachée	<i>E. coli</i> ⁽²⁾	5	2	50 UFC/g	500 UFC/g	ISO 16649-2 (comptage des colonies à 44 °C au moyen de BCIG)	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et de la sélection et ou de l'origine des matières premières

⁽¹⁾ *n* = nombre d'unités constituant l'échantillon ; *c* = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs comprises entre les limites *m* et *M*. Pour certains critères, *m* = *M*.

⁽²⁾ *E. coli* est utilisée ici comme indicateur de contamination fécale.

⁽³⁾ Échantillon groupé comprenant au moins dix animaux différents.

Document 3.3 : Critères de la Fédération du Commerce et de la Distribution

Extrait adapté du document « Critères microbiologiques applicables à partir de 2024 aux marques de distributeurs, marques premiers prix et matières premières dans leur conditionnement initial industriel », établi par la Fédération du Commerce et de la Distribution (FCD) (27/09/2023)

Denrée	Germe	Critère règlement EU 2073	Critère FCD à réception ⁽⁴⁾	Critère FCD à DLC/DDM ⁽⁵⁾	Commentaires
Carpaccio, toutes viandes hachées à l'avance, sauf porc Produits réfrigérés	<i>E. coli</i>	50 UFC/g	50 UFC/g	50 UFC/g	Critère applicable en particulier au stade de la fabrication (sur matière première, mêlée ou produit fini)
	<i>E. coli</i> O157:H7	--	Non détecté / 25 g	Non détecté / 25 g	

⁽⁴⁾ Critères applicables aux produits dans leur conditionnement initial industriel et valables à partir de la sortie usine tant que le profil microbien n'est pas susceptible d'avoir évolué significativement par rapport au profil en sortie usine : produits détenus en chambre froide, à réception sur plateforme/entrepôt et à réception en magasin.

⁽⁵⁾ Critères applicables aux produits dans leur conditionnement initial industriel, pendant toute leur durée de vie et jusqu'à leur DLC/DDM. L'interprétation des résultats analytiques tient compte du cycle de vie des produits.

Document 3.4 : Critères concernant les eaux potables

Extrait adapté de la Directive (UE) 2020/2184 du Parlement Européen et du Conseil, du 16 décembre 2020, relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

Paramètres	Valeur paramétrique	Unité	Méthode d'analyse	Notes
Entérocoques intestinaux	0	nombre / 100 mL	Dénombrement par filtration sur membrane déposée sur gélose au BCIG et incubée à 44 °C	Pour les eaux mises en bouteilles ou en récipient, l'unité est le nombre / 250 mL
<i>Escherichia coli</i>	0	nombre / 100 mL		

1. RÉSUMÉ

Adapté du résumé de la **Norme ISO 4831:2006** sur la microbiologie des aliments :
Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des coliformes
Technique du nombre le plus probable

Cette méthode pour le dénombrement des coliformes est réalisée par calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 30 °C ou 37 °C en milieu liquide. Le dénombrement est applicable lorsque le nombre attendu est compris entre 1 et 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon soumis à l'essai.

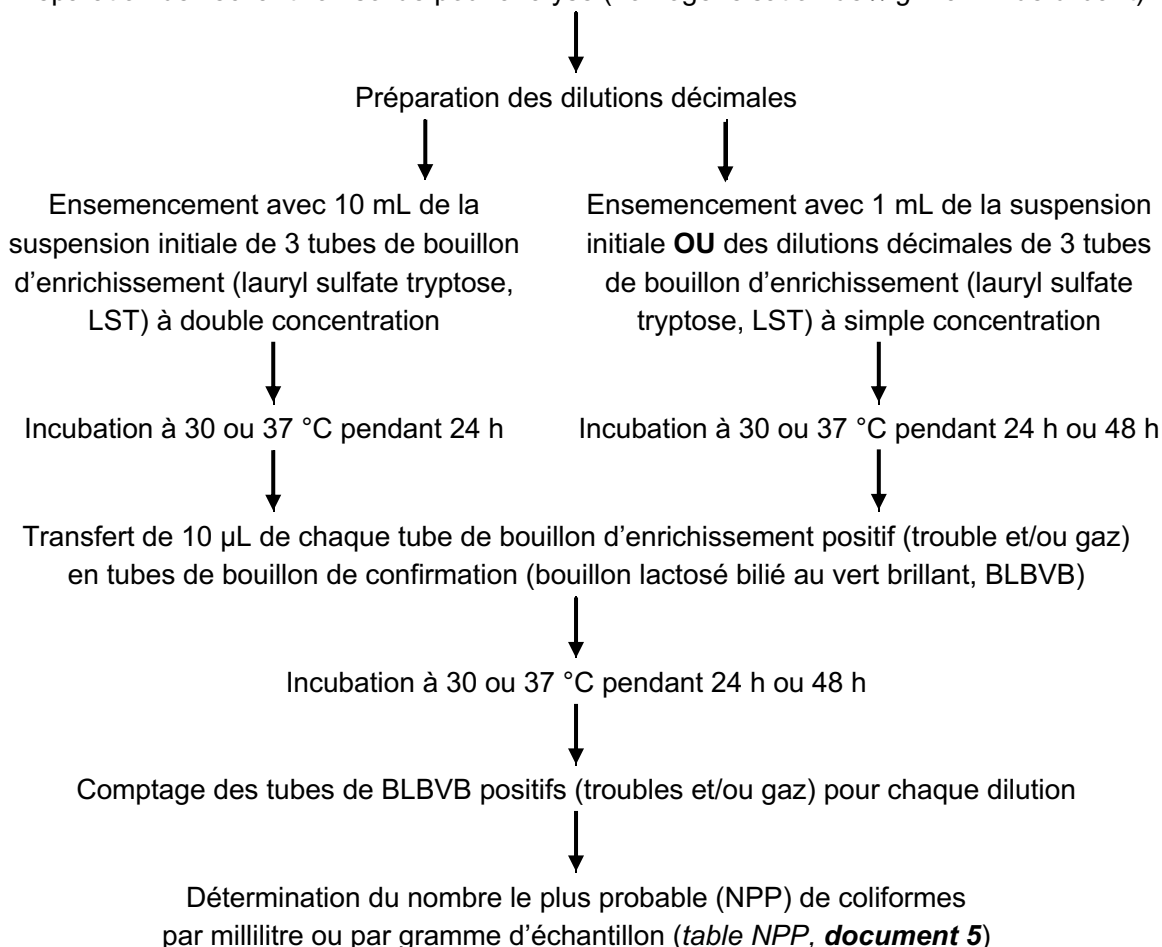
Cette méthode s'applique aux produits alimentaires destinés à la consommation humaine et à l'alimentation des animaux, ou aux échantillons environnementaux prélevés au voisinage de la production et de la manipulation des aliments.

2. MICRO-ORGANISMES CIBLÉS

Coliformes	Bactéries qui, à 30 °C ou 37 °C, fermentent le lactose avec production de gaz.
-------------------	--

3. LOGIGRAMME

Préparation de l'échantillon solide pour analyse (homogénéisation de x g + 9 mL de diluant)



4. MILIEUX DE CULTURE

Milieu d'enrichissement sélectif : bouillon lauryl sulfate tryptose (LST)

	Milieu double concentration	Milieu simple concentration
Digestat enzymatique de lait et protéines animales	40 g	20 g
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , H ₂ O)	10 g	5 g
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	5,5 g	2,75 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	5,5 g	2,75 g
Chlorure de sodium	10 g	5 g
Lauryl sulfate de sodium	0,2 g	0,1 g
Eau	1000 mL	1000 mL

Milieu de confirmation : bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB)

Digestat enzymatique de caséine	10 g
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , H ₂ O)	10 g
Bile de bœuf déshydratée	20 g
Vert brillant	0,0133 g
Eau	1000 mL

Les milieux sont conditionnés en tubes contenant une cloche de verre renversée (cloche ou tube de Durham). Leur lecture se fait par la détection d'un trouble (traduisant la culture bactérienne) et l'emprisonnement de gaz sous la cloche (bulle), voire son éventuel soulèvement (traduisant la production de gaz).

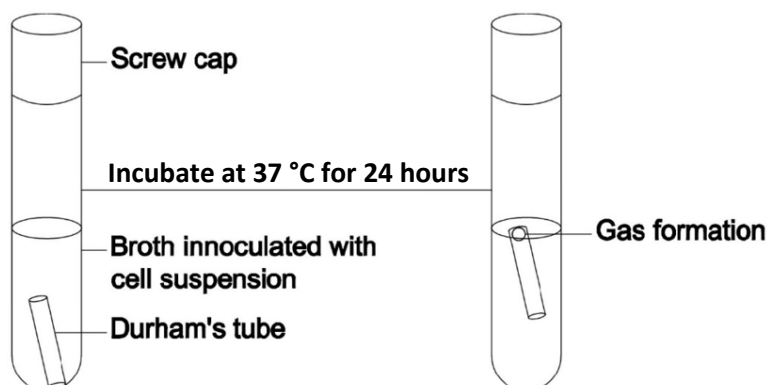


Image tirée de la thèse de Carlito Eugenio-Monteiro, Assessing non-traditional yeasts species for the purpose of brewing beer, 08/2020, DOI: 0.13140/RG.2.2.30491.90406

Adapté de : *Bacteriological Analytical Manual* / appendix 2: most probable number from serial dilutions (FDA, US Food & Drugs Administration, august 2023)

1. DÉFINITION

Le Nombre le Plus Probable (NPP), ou *Most Probable Number* (MPN), est une méthode statistique utilisée pour estimer la concentration de micro-organismes cibles dans un échantillon.

Le NPP est particulièrement pertinent pour :

- les faibles concentrations d'organismes (< 100 par gramme), notamment dans le lait et l'eau ;
- les aliments dont la composition particulière pourrait fausser les comptages précis de colonies sur milieu gélosé.

Seuls les organismes viables sont comptés par cette méthode.

2. UTILISATION DES TABLES

Les tables utilisées pour déterminer le NPP, souvent appelées tables de MacGrady, sont construites sur des principes statistiques fondés sur la loi de Poisson et le concept de vraisemblance maximale.

La méthode du NPP repose sur l'hypothèse que les micro-organismes sont distribués de manière aléatoire dans l'échantillon, modélisable par la loi de Poisson. La fonction de vraisemblance calcule ensuite la probabilité d'obtenir l'issue observée (positivité des tubes) en fonction d'une concentration hypothétique en bactéries dans un échantillon.

Le NPP correspond à la valeur de la concentration hypothétique qui maximise cette fonction de vraisemblance. En d'autres termes, le NPP est le nombre qui rend l'issue observée la plus probable.

La table du NPP est un outil de référence qui liste les NPP calculés numériquement (par la méthode de vraisemblance maximale) pour toutes les combinaisons possibles de résultats positifs.

Pour chaque technique (à 2 tubes, 3 tubes, 5 tubes, 10 tubes, 15 tubes...), plusieurs dilutions successives sont testées, chacune dans un nombre donné de tubes dépendant de la technique choisie. Le nombre de tubes positifs est compté pour chaque dilution. Ensuite, les dilutions successives sont regroupées trois par trois, ce qui donne un nombre caractéristique (combinaison de tubes positifs à trois dilutions successives, ex. 3-2-1). Ce nombre est reporté en entrée sur la table adéquate, afin de lui affecter l'indice NPP correspondant (ex. 150 pour la technique à 3 tubes), ainsi que les intervalles de confiance pour cette estimation (ex. 37 à 420 dans cet exemple).

Le résultat doit ensuite tenir compte des dilutions de la combinaison caractéristique retenue.

3. INTERVALLES DE CONFIANCE

Les intervalles de confiance dans la méthode du NPP sont calculés en utilisant la même approche statistique que le NPP lui-même à savoir la vraisemblance maximale.

L'intervalle de confiance est généralement asymétrique autour du NPP du fait de la nature de la distribution de Poisson, qui modélise le comptage d'événements rares.

4. TABLES NPP (TABLES DE MACGRADY)

Légendes des tables ci-après :	Tubes pos. 0.10	nombre de tubes positifs à la dilution 1/10 (1 ^e dilution)
	Tubes pos. 0.01	nombre de tubes positifs à la dilution 1/100 (2 ^e dilution)
	Tubes pos. 0.001	nombre de tubes positifs à la dilution 1/1000 (3 ^e dilution)
	Lim. inf. Conf.	limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 %
	Lim. sup. Conf.	limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 %

Des tables existent pour chaque type de technique (à 3 tubes, à 5 tubes, à 10 tubes, à 15 tubes).

Tableau 1 – Indices NPP par gramme d'échantillon et limites de confiance à 95 % pour la technique à 3 tubes (chaque dilution est testée sur 3 tubes)

Tubes pos. 0.10	Tubes pos. 0.01	Tubes pos. 0.001	NPP/g	Lim. inf. Conf.	Lim. sup. Conf.
0	0	0	ND	-	9.5
0	0	1	3.0	0.15	9.6
0	1	0	3.0	0.15	11
0	1	1	6.1	1.2	18
0	2	0	6.2	1.2	18
0	3	0	9.4	3.6	38
1	0	0	3.6	0.17	18
1	0	1	7.2	1.3	18
1	0	2	11	3.6	38
1	1	0	7.4	1.3	20
1	1	1	11	3.6	38
1	2	0	11	3.6	42
1	2	1	15	4.5	42
1	3	0	16	4.5	42
2	0	0	9.2	1.4	38
2	0	1	14	3.6	42
2	0	2	20	4.5	42
2	1	0	15	3.7	42
2	1	1	20	4.5	42
2	1	2	27	6.87	94

Tubes pos. 0.10	Tubes pos. 0.01	Tubes pos. 0.001	NPP/g	Lim. inf. Conf.	Lim. sup. Conf.
2	2	0	21	4.5	42
2	2	1	28	8.7	94
2	2	2	35	8.7	94
2	3	0	29	8.7	94
2	3	1	36	8.7	94
3	0	0	23	4.6	94
3	0	1	38	8.7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1,000
3	3	0	240	42	1,000
3	3	1	460	90	2,000
3	3	2	1100	180	4,100
3	3	3	> 1100	420	-

Tableau 2 [extrait] – Indices NPP par gramme d'échantillon et limites de confiance à 95 % pour la technique à 10 tubes (chaque dilution est testée sur 10 tubes)

Tubes pos. 0.10	Tubes pos. 0.01	Tubes pos. 0.001	NPP/g	Lim. inf. Conf.	Lim. sup. Conf.
0	0	0	ND	-	3.1
0	0	1	0.9	0.04	3.1
0	0	2	1.8	0.33	5.1
0	1	0	0.9	0.04	3.6
0	1	1	1.8	0.33	5.1
0	2	0	1.8	0.33	5.1
0	2	1	2.7	0.8	7.2
0	3	0	2.7	0.8	7.2

Tubes pos. 0.10	Tubes pos. 0.01	Tubes pos. 0.001	NPP/g	Lim. inf. Conf.	Lim. sup. Conf.
8	2	0	17	7.7	34
8	2	1	19	9	34
8	2	2	21	10	39
8	2	3	23	11	44
8	3	0	19	9	34
8	3	1	21	10	39
8	3	2	24	11	44
8	3	3	26	12	50

ND : non déterminable

1. RÉSUMÉ

Adapté du résumé de la **Norme ISO 16649-2:2001** sur la microbiologie de la chaîne alimentaire :
Méthode horizontale pour dénombrement des *E. coli* β -glucuronidase positives
Partie 2 : comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate (BCIG)

Cette méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase-positives utilise une technique de comptage des colonies après incubation à 44 °C sur un milieu solide contenant un substrat chromogène (milieu TBX, tryptone-bile-X-glucuronide) pour la détection de l'enzyme β -glucuronidase, sans qu'il soit nécessaire de pratiquer une étape de confirmation. Cette méthode s'applique aux produits alimentaires destinés à la consommation humaine et à l'alimentation des animaux.

Certaines souches d'*E. coli* qui ne poussent pas à 44 °C, ainsi que celles qui sont β -glucuronidase négatives telles que le sérotype entéro-hémorragique O157, ne peuvent pas être mises en évidence par cette méthode.

2. MICRO-ORGANISMES CIBLÉS

Escherichia coli
 β -glucuronidase
positives

Bactéries qui, à 44 °C, forment des colonies bleues caractéristiques sur le milieu chromogène tryptone-bile-X-glucuronide (TBX).

3. LOGIGRAMME

Préparation de l'échantillon solide pour analyse (homogénéisation de x g + 9 mL de diluant)



Préparation des dilutions décimales



Ensemencement avec 1 mL en masse de gélose TBX (double-essai pour chaque dilution)



Incubation à (44 ± 1) °C pendant 18 à 24 h



Comptage des colonies caractéristiques sur gélose TBX
comme étant des *E. coli* β -glucuronidase positives



Calcul du nombre d'*E. coli* β -glucuronidase positives
par gramme ou par millilitre d'échantillon (*mode de calcul, document 7*)

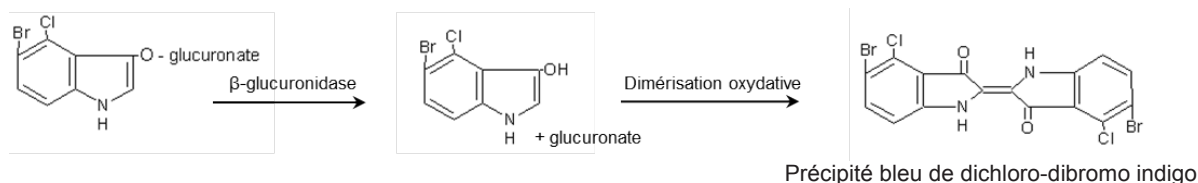
4. MILIEU DE CULTURE : GÉLOSE TBX (tryptone-bile-X-glucuronide)

Adapté de *notices de fournisseurs* (Biokar, Merck)

Principe

Le BCIG (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronate) est un substrat chromogène.

La plupart des souches d'*E. coli* possédant une β -D-glucuronidase agissent par clivage du BCIG, entraînant la coloration des colonies en bleu à bleu-vert selon le mécanisme réactionnel suivant :



E. coli O157 étant β -D-glucuronidase négative, elle présente des colonies blanches.

Les sels biliaires inhibent la croissance des micro-organismes à Gram positif et favorisent la récupération des *Escherichia coli*. L'incubation réalisée à 44 °C et impérativement limitée à 24 heures permet d'inhiber la croissance de la majorité des micro-organismes contaminants.

Formule-type (pouvant être ajustée pour des performances optimales)

Tryptone de caséine	20,0 g
Sels biliaires n°3	1,5 g
BCIG (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate)	75,0 mg
Agar agar bactériologique	9,0 à 18,0 g
Eau	1000 mL

Composition conforme
aux normes :
NF ISO 16649-1,
NF ISO 16649-2
et NF EN ISO 16649-3

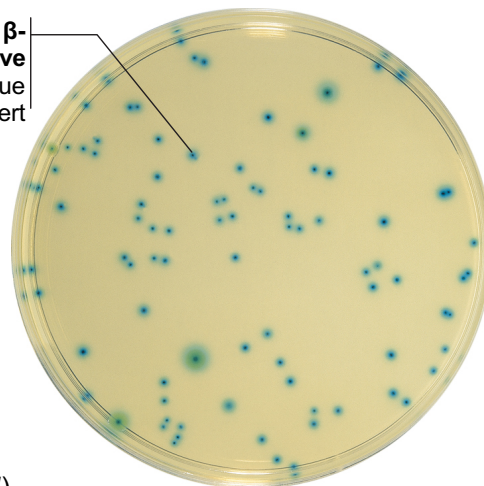
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,2 \pm 0,2

Lecture

Les colonies caractéristiques sont bleues à bleu-vert.

Procéder au comptage des boîtes contenant < 150 colonies caractéristiques et < 300 colonies au total (caractéristiques et non).

E. coli β -
glucuronidase-positif
Colonie caractéristique
bleue à bleu-vert



Contrôle qualité

Culture typique après 18-24 h d'incubation à (44 \pm 1) °C
(tests réalisés selon la Norme de validation ISO 11133:2014)

Fonctions	Micro-organismes contrôles (American Type Culture Collection)	Culture	Caractéristiques
Productivité ⁽¹⁾	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Croissance \geq 50 %	Colonies bleues
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
Sélectivité ⁽²⁾	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	Totalem inhibées	--
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		
Spécificité ⁽³⁾	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	Non inhibées	Colonies beiges à vert-beige
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		

⁽¹⁾ évalue la capacité du milieu à permettre la récupération et la croissance du micro-organisme ciblé

⁽²⁾ évalue la capacité d'un milieu sélectif d'inhiber la croissance d'un micro-organisme non ciblé

⁽³⁾ évalue que les micro-organismes non ciblés, lorsqu'ils se développent éventuellement sur le milieu, ne présentent pas les mêmes caractéristiques visuelles que le micro-organisme ciblé

Adapté de la Norme EN ISO 7218:2024 sur la microbiologie de la chaîne alimentaire :
Exigences générales et recommandations pour les examens microbiologiques

1. DÉNOMBREMENT SUR BOÎTE (cas général seulement)

Pour qu'un résultat soit valide, il est nécessaire de retenir au moins deux boîtes dénombrables (duplicats de la même dilution ou boîtes de deux dilutions successives au dixième).

À partir du comptage des colonies totales ou des colonies caractéristiques sans confirmation, calculer le nombre N de micro-organismes en unités formant colonie par gramme ou par millilitre (UFC / g ou UFC / mL) de la prise d'essai à l'aide de la formule :

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

- ΣC somme des colonies dénombrées dans toutes les boîtes retenues à partir d'une ou de deux dilutions successives
- V volume d'inoculum appliqué sur chaque boîte de Pétri, en mL
- n_1 nombre de boîtes retenues à la première dilution
- n_2 nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ($n_2 = 0$ si elle n'a pas été préparée)
- d dilution correspondant à la première dilution retenue ($d = 1$ si produit liquide non dilué)

2. INTERVALLES DE CONFIANCE

Pour évaluer la validité des résultats et éviter des interprétations trop strictes, il est nécessaire d'estimer l'incertitude, ou si elle n'est pas disponible, d'estimer l'intervalle de confiance qui caractérise la répartition statistique des micro-organismes dans l'échantillon. Cet intervalle de confiance δ peut être calculé à l'aide de la formule (avec une probabilité de 95 %) :

$$\delta = \left[\left(\frac{\Sigma C}{B} \right) \pm \frac{1,96\sqrt{\Sigma C}}{B} \right] \left(\frac{1}{d} \right)$$

- B correspond à $V \times (n_1 + 0,1 \times n_2)$ de la formule du dénombrement ci-avant
- ΣC somme des colonies dénombrées dans toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives
- d dilution correspondant à la première dilution retenue
- 1,96 estimé à partir du z-score associé à l'intervalle de confiance à 95 % (distribution normale)

Le **Tableau 1** présente les intervalles de confiance δ calculés selon la formule ci-avant, pour des nombres moyens de colonies comptées sur gélose en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre.

Tableau 1 – Intervalles de confiance δ en fonction des nombres de colonies

Moyenne pondérée du nombre de colonies comptées sur deux dilutions successives	Système « 1 boîte par dilution » Intervalle de confiance δ	Système « 2 boîtes par dilution » Intervalle de confiance δ
300	268 à 334	277 à 323
150	127 à 173	134 à 166
100	81 à 119	87 à 113
30	20 à 40	23 à 37
15	7 à 22	10 à 20
10	4 à 16	6 à 14
7	Non applicable	3 à 10
NOTE Les valeurs en gras sont les valeurs optimales pour une utilisation de routine		

1. RÉSUMÉ

Adapté du résumé la **Spécification Technique ISO/TS 13136:2012** sur la microbiologie des aliments :
Méthode basée sur la PCR en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments
Méthode horizontale pour la détection des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC)
et la détermination des sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145

Cette méthode pour la détection des principaux gènes de virulence des STEC et des gènes associés aux sérogroupes d'intérêt repose sur l'utilisation de la PCR en temps réel. Dans le cas de la détection de ces gènes, une procédure d'isolement de souches est mise en place afin de confirmer la présence simultanée des gènes dans une seule et même cellule bactérienne vivante. Cette méthode s'applique aux produits alimentaires destinés à la consommation humaine et à l'alimentation des animaux, ou aux échantillons environnementaux dans la zone de production et de manipulation des aliments.

2. PRINCIPAUX GÈNES DE VIRULENCE POUR LES STEC :

- Gènes **stx1/stx2** (shigatoxines), et gène **eae** (intimine).
- Gènes **rfbE** (O157), **wbd1** (O111), **wzx** (O26), **ihp1** (O145) et **wzx** (O103), caractéristiques des sérogroupes d'intérêt.

3. PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

La sensibilité et la limite de détection de la PCR en temps réel ont été déterminées en utilisant des dilutions de plasmides contenant les gènes clonés codant les différentes cibles (voir **Tableau 1**).

Tableau 1 – Sensibilité et limite de détection des réactions PCR 5'-nucléase pour certains des gènes cibles

Gène cible	Limite de détection [nombre de copies / réaction]	Efficacité [%]
stx1/stx2	5 / 5	94,7 / 94
rfbE	1	94,2
wbd1	5	94
wzx	5	97,7
ihp1	5	99,6

Ont également été analysées des cultures pures de souches STEC appartenant aux sérogroupes d'intérêt en co-culture avec une souche de laboratoire *E. coli* K-12 (voir **Tableau 2**).

Tableau 2 – Détection de petits nombres de STEC en co-cultures

Sérotype STEC	UFC/mL	Valeurs de C _t							
		stx1/stx2	eae	rfbE (O157)	wbd1 (O111)	wzx (O26)	ihp1 (O145)	wzx (O103)	FliC (H7)
O26:H11	2 à 3	28 à 31	31 à 32	--	--	31 à 33	--	--	--
	10 à 20	25 à 27	28 à 29	--	--	29	--	--	--
O103:H2	2 à 3	29 à 30	31 à 32	--	--	--	--	32 à 33	--
	10 à 20	26 à 27	29 à 30	--	--	--	--	29 à 31	--
O111:[H8]	2 à 3	26 à 27	30 à 31	--	30 à 31	--	--	--	--
	10 à 20	24 à 25	29 à 30	--	27 à 28	--	--	--	--
O145:[H28]	2 à 3	32 à 33	31 à 32	--	--	--	31 à 34	--	--
	10 à 20	30 à 32	29 à 31	--	--	--	30	--	--
O157:H7	2 à 3	29 à 30	29 à 31	31 à 32	--	--	--	--	33 à 38
	10 à 20	26 à 28	26 à 29	29 à 31	--	--	--	--	31 à 33

Document 9.1 : Présentation et principe

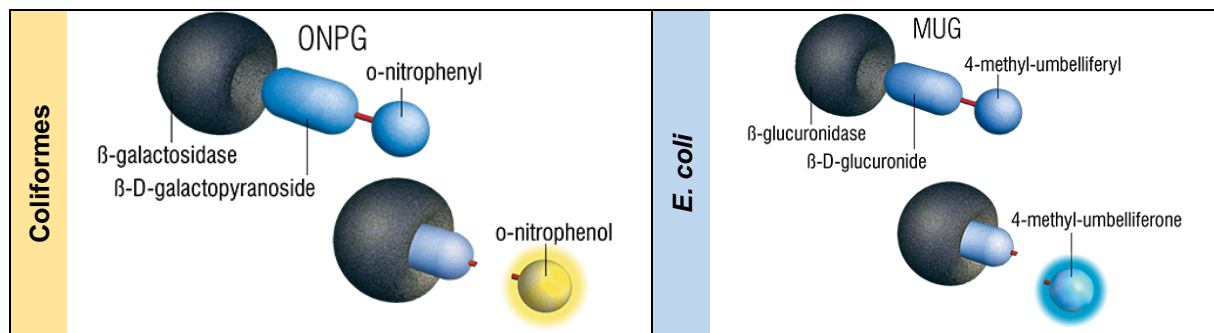
Adapté de : <https://www.idexx.fr/fr/water/water-products-services/colilert-18/>
et : <https://www.idexx.fr/fr/water/water-products-services/quanti-tray-system/> (consultée le 03/10/2025)

Cette méthode détecte et quantifie simultanément les coliformes totaux et *E. coli* dans les eaux.

- Norme ISO : la méthode Colilert®-18/Quanti-Tray® est reconnue méthode de référence pour la détection des coliformes totaux et des *E. coli* dans l'eau (ISO 9308-2:2014).
- Test de présence/absence (P/A) ou de quantification avec le Quanti-Tray®.
- Manipulation rapide : moins d'1 minute pour ensemercer le test.
- Résultat en 18 heures : les échantillons incubés la nuit sont lus le matin suivant, apportant gain de temps et rapidité de réponse en cas de contamination.
- Sensibilité : la détection précoce de coliformes dans le système de distribution peut contribuer à la réduction de la formation d'un biofilm et des cas de contamination en amont.
- Spécificité : réduit sensiblement les fausses alertes créées par des résultats faux-positifs inexacts sans nécessiter d'étape de confirmation.

1. COLILERT®-18

Le test Colilert®-18 utilise les indicateurs sources de nutriments ONPG (orthonitrophényl- β -galactoside) et MUG (4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide) relevant de la technologie brevetée *Defined Substrate Technology* (DST) pour détecter les coliformes et les *E. coli*. Pendant l'incubation, les coliformes synthétisent la β -galactosidase qui métabolise l'ONPG incolore en chromophore jaune. Les *E. coli* synthétisent la β -glucuronidase qui métabolise le MUG et génère une fluorescence bleue sous lumière UV. La grande majorité des non-coliformes ne possèdent pas ces enzymes et ne peuvent donc pas interférer. Les quelques non-coliformes qui possèdent ces enzymes sont sélectivement éliminés par les agents sélectifs de la poudre Colilert®-18.



2. QUANTI-TRAY®

Le Quanti-Tray® est conçu pour dénombrer les *E. coli* et les bactéries coliformes présentes dans l'eau potable et d'autres eaux similaires traitées ou non, à l'aide du nombre le plus probable (NPP, **document 5**), en utilisant la méthode de détection du Colilert®-18.

Un échantillon de 100 mL est ajouté à la poudre Colilert®-18, puis automatiquement réparti dans un plateau contenant 51 puits sans avoir à utiliser ni tubes de Durham, ni dilutions. Après incubation à 37 °C pendant 18 heures, les puits jaunes et les puits fluorescents sont comptés pour déterminer le résultat final, exploité à l'aide du NPP afin de déterminer le nombre de bactéries d'intérêt dans l'échantillon d'origine. L'automatisation minimise le temps de manipulation et maximise le débit (jusqu'à 4 échantillons par minute). Le grand nombre de puits offre une plage de comptage étendue sans nécessité de diluer (de 1 à 200 bactéries), tout en garantissant des limites de confiance à 95 % plus étroites que celles des techniques classiques à 5 ou 10 tubes.

La version Quanti-Tray®/2000, à 97 puits, présente des performances encore améliorées.

Document 9.2 : Validation de Colilert®-18 / Quanti-Tray®

Adapté du rapport de validation de la méthode (IDEXX, 2008), selon Norme de validation ISO 13843:2000

1. ÉPREUVE AVEC CULTURES PURES

La méthode a été soumise à essai avec des cultures pures de souches de référence d'*E. coli*, de bactéries coliformes et de bactéries non coliformes à Gram négatif extraites de l'ATCC.

Tableau 1 – Réactions des souches de référence dans Colilert®-18

Souches de référence (American Type Culture Collection)		Croissance	Coloration jaune	Fluorescence bleue sous UV
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Oui	Oui	Oui
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	Oui	Oui	Non
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 31488	Oui	Oui	Non
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	Oui	Oui	Non
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	Non	Non	Non
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 35654	Non	Non	Non

2. ÉTUDES QUANTITATIVES

202 échantillons naturels, préparés par mélange d'eau de rivière et d'eau potable déchlorée, ont été soumis à cette méthode. Les résultats ont été analysés pour calculer les paramètres ci-après.

Tableau 2 – Résultats (n = 202 échantillons naturels) ⁽¹⁾

	Bactéries coliformes (coloration jaune)	<i>E. coli</i> (fluorescence bleue)
Sensibilité	100 %	100 %
Spécificité	100 %	99 %
Pourcentage de faux-positifs	0 %	1 %
Pourcentage de faux-négatifs	0 %	0 %
Efficacité	100 %	99,5 %

⁽¹⁾ Pour chaque analyse, les résultats ont été divisés en quatre catégories (selon ISO 13843:2000) :

TP = puits apparaissant positifs, et qui contiennent bien des coliformes ou *E. coli* (vrais-positifs, *true positive*)

FN = puits apparaissant négatifs, mais qui contiennent des coliformes ou *E. coli* (faux-négatifs, *false negative*)

FP = puits apparaissant positifs, mais qui ne contiennent ni coliforme ni *E. coli* (faux-positifs, *false positive*)

TN = puits apparaissant négatifs et qui ne contiennent ni coliforme ni *E. coli* (vrais-négatifs, *true negative*)

Les paramètres pour les coliformes et *E. coli* ont alors été calculés comme suit, à partir de ces données :

Sensibilité = TP / (TP + FN)

Spécificité = TN / (FP + TN)

Pourcentage de faux-positifs = FP / (TP + FP)

Pourcentage de faux-négatifs = FN / (FN + TN)

Efficacité = (TP + TN) / (TP + FN + FP + TN)

3. ROBUSTESSE

Des analyses répétées ont été réalisées sur des suspensions contenant de faibles concentrations de souches de référence (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*) après 18 et 22 heures d'incubation, à partir d'un même lot de Colilert®-18 conservé jusqu'à 541 jours (près de 18 mois) à 25 °C.

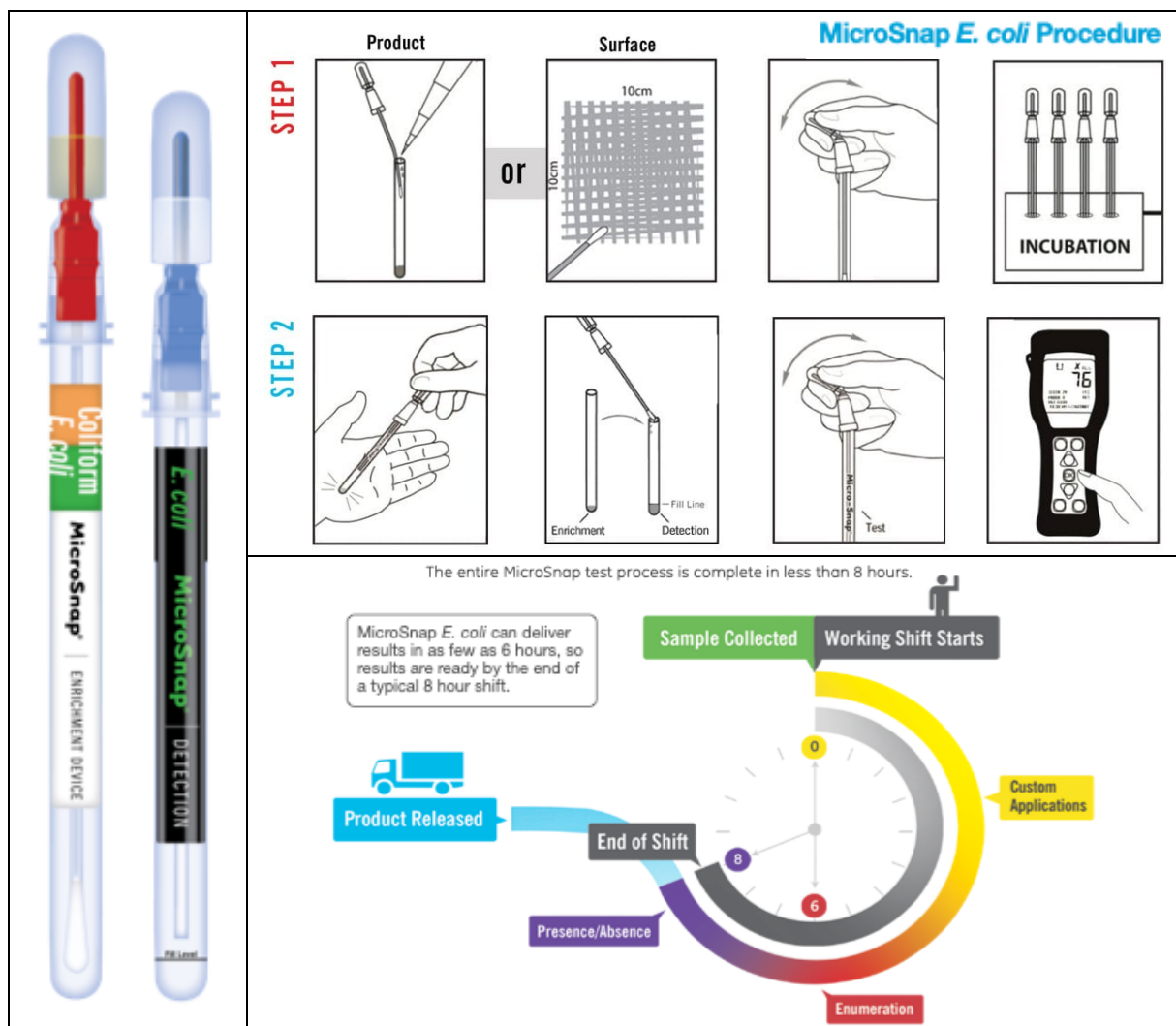
Les résultats confirment que la période d'incubation recommandée de 18 à 22 heures est appropriée pour *E. coli* et les coliformes robustes tels que *Klebsiella pneumoniae*. Pour certaines bactéries à croissance plus lente ou faibles productrices d'enzymes, des augmentations de comptages peuvent être observées après 22 heures. Néanmoins, ces variations restent acceptables, et les comptages après 18 heures sont considérés fiables pour un usage pratique.

Concernant la stabilité, le milieu Colilert®-18 présente une durée de conservation indiquée de 12 mois à 4-25 °C. Les tests effectués avec un lot stocké à 25 °C pendant 541 jours ne montrent aucune perte de performance, démontrant que le milieu reste stable bien au-delà de la durée prescrite, même pour une température de stockage hors réfrigération.

Adapté de la **brochure** et de la **notice du fournisseur** (Hygièna),
 et de : P. Meighan, **Validation of the MicroSnap Coliform and *E. coli* Test System for Enumeration and Detection of Coliforms and *E. coli* in a Variety of Foods**, *Journal of AOAC International*, 97 (2), 2014
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-361>

MicroSnap® is a rapid bioluminogenic test method to detect and enumerate bacteria (here, *E. coli*) in various food and water samples, in less than 8 hours. The two-step test procedure requires a short incubation period facilitating recovery of bacteria, followed by a detection step.

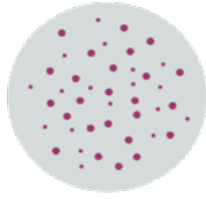
Step 1 begins with a *Coliform-E. coli* Enrichment Device, where a sample (liquid or 10 % food suspension) is incubated in a specific growth medium containing enzyme inducers, at $(37 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ for 6-8 hours. During this time, bacteria produce and accumulate the diagnostic enzymes β -galactosidase and β -glucuronidase in proportion to their initial numbers, allowing early quantification from 100 CFU upward at 6 hours, while even very low levels (< 10 CFU) can be detected by 8 hours. Step 2 continues with 0.1 mL of enriched solution transferred to the *E. coli* Detection Device, activated and incubated for 10 minutes. It contains lysis reagents, ATP and a specific substrate for β -glucuronidase. Cleavage of the substrate releases luciferin (which was linked to the substrate), which reacts with ATP and luciferase to generate a light signal measured in a hand-held luminometer within a few seconds, then correlated into CFUs. Light output is directly proportional to the initial concentration of bacteria in the pre-enriched samples, enabling both quantification and presence/absence testing. The method has been validated across multiple food matrices (although some, such as opaque suspensions or extreme pH samples, may require dilution), showing good agreement with reference methods, accurate detection of target strains, no cross-reactivity, and consistent performance across shelf-life, while robustness studies highlighted that precise incubation times (6-8 h then 10 min) are critical for reliable results.



CFU

Colony Forming Units

Traditional plating methods utilize colony counting techniques to determine CFU levels. MicroSnap technology derives equivalent CFU values using light detection.



No more counting colonies.

RLU

Relative Light Units

EnSURE displays measurements in relative light units (RLU's). The RLU number is correlated to colony forming units (CFU's). Total, Coliform, and *E. coli* are AOAC-RI Performance TestedSM Methods.



CFU : RLU - Conversion

CFU/ml or swab*	<i>E. coli</i>	Coliform	Enterobacteriaceae**	Total
<10	<2	<2	NA	<10
<20	<4	<4	NA	<20
<50	<7	<7	<10	<50
<100	<12	<12	<20	<100
<200	<20	<20	<40	<200
<500	<35	<35	<100	<500
<1,000	<60	<60	<200	<1,000
<5,000	<180	<180	<1,000	<5,000
<10,000	<300	<300	TNTC	TNTC

*Direct sample e.g., 1 mL liquid or surface swab. Dilution factors must be accounted for with product samples.
 **Data reflects dynamic range after 6 hour incubation. See product instructions for more details.

Method Comparison : Time to Results



Microorganism Testing Methods



	Traditional Methods	MicroSnap®
Rapid results	-	+
Labor and material savings	-	+
Probability of detection	-	+
Precision & accuracy	+	++
Easy to use	-	+

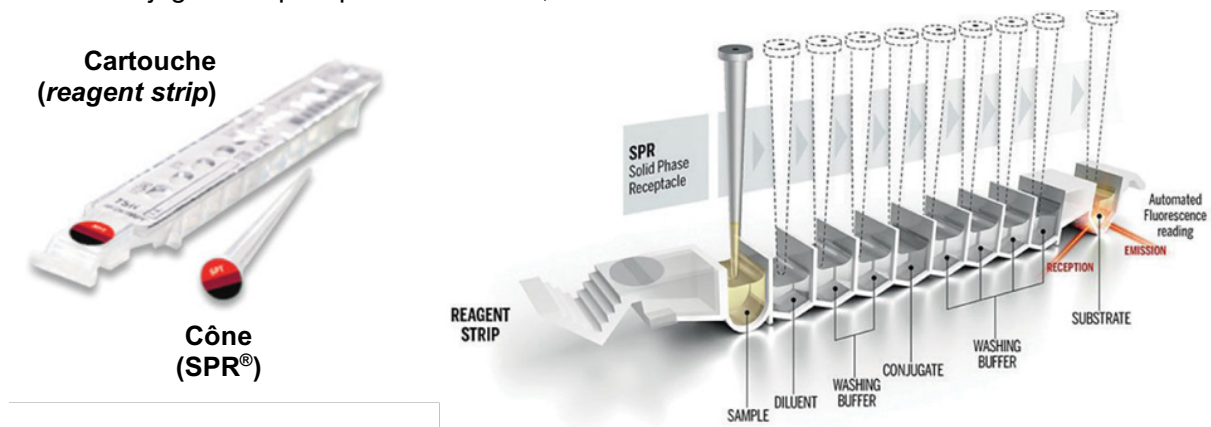
Document 11.1 : Présentation et principe de VIDAS® UP

Adapté du **rapport de validation** de la méthode (AFNOR, 2021), selon Norme de validation ISO 16140-2:2016

La méthode VIDAS® UP *E. coli* O157 (incluant H7) est un test qualitatif permettant la détection des *E. coli* O157 potentiellement entéro-hémorragiques (EHEC) dans les produits alimentaires comme la viande bovine. C'est un test immuno-enzymatique utilisant un ligand phagique et permettant la détection d'*E. coli* O157 (incluant H7) par la méthode ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) grâce à l'instrument de la famille VIDAS®.

Chaque test est composé de 2 parties :

- le cône à usage unique (SPR®) sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. À l'intérieur du SPR®, une protéine recombinante de spicule de bactériophage est immobilisée afin de lier spécifiquement *Escherichia coli* O157 ;
- les réactifs de la réaction de détection enzymatique sont prêts-à-l'emploi et pré-répartis dans les différents puits de la cartouche (*reagent strip*) : tampons de lavage, anticorps conjugué à la phosphatase alcaline, substrat.



Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'instrument. Elles sont constituées d'une succession de cycles d'aspiration / refoulement dans le cône SPR® du milieu réactionnel.

Une partie du bouillon d'enrichissement est déposé dans le puits "échantillon" de la cartouche. *E. coli* O157 est capturée à l'aide des protéines recombinantes de spicule de bactériophage dans le SPR®. Des étapes de lavage éliminent les composés non fixés. Un anticorps de reconnaissance spécifique aux *E. coli* O157, conjugué à la phosphatase alcaline, est ensuite aspiré dans le SPR® puis refoulé. Un dernier lavage permet l'élimination des conjugués libres.

Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-méthyl-ombelliféryl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse l'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-méthyl-ombelliférone) qui émet une fluorescence mesurée à 450 nm, après excitation aux UV.

À la fin des 50 minutes du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument qui fournit une valeur de test pour chaque échantillon. Cette valeur est comparée à des références internes (seuils) et chaque résultat est interprété (positif, négatif). Le standard est mesuré sur le puits "substrat" avant aspiration. Le calcul de la RFV (*Relative Fluorescence Value*) est obtenu en soustrayant le bruit de fond à la mesure de fluorescence finale.

La RFV obtenue pour chaque échantillon est interprétée par l'instrument de la manière suivante :

- valeur du test (*test value*, TV) = RFV échantillon / RFV standard ;
- si TV < 0,04, le test est négatif ; et si TV ≥ 0,04, le test est positif.

En cas de résultat positif, une étape de confirmation doit être effectuée par isolement sur une gélose chromogène spécifique.

Document 11.2 : Étude comparative des performances de la méthode normalisée ISO 16654 (méthode de référence) et de la méthode alternative VIDAS® UP assay pour la détection de *E. coli* O157:H7

Adapté de : G. Kürşad Incili, A. Koluman, A. Aktüre, A. Ataşalan, *Validation and verification of LAMP, ISO, and VIDAS UP methods for detection of Escherichia coli O157:H7 in different food matrices. Journal of Microbiological Methods*, volume 165, 2019
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105697>

Six different food matrices including beef cuts, minced lamb meat, whole milk, full-fat white cheese, apple puree, and soybean sprouts were used in the study. Three reference and five wild type *E. coli* O157:H7 strains were used. Three spike levels used in the study were as follows, high (4.58 Log₁₀ CFU/g-mL), medium (2.32 Log₁₀ CFU/g-mL) and low (0.30 Log₁₀ CFU/g-mL). For the negative control, analyses were performed without any contamination to the food samples that were already found negative for *E. coli* O157:H7 analysis.

1. ISO 16654 ASSAY

25 g/mL samples were taken from spiked food samples into the sterile sampling bag under aseptic conditions and 225 mL modified Tryptic Soy Broth with novobiocin added. Subsequently, pre-enrichment culture were incubated at (41.5 ± 1) °C for 18-24 h. After pre-enrichment step, immunomagnetic separation was carried out by using the Dynabeads anti-*E. coli* O157.

After immunomagnetic separation, 50 µL of Dynabead and bacterial complexes were added on Sorbitol MacConkey agar containing Cefixime Tellurite and plates were incubated at 37 °C for 18-24 h. At the end of the incubation period, non-fermentative suspect colonies in Petri plates were confirmed using latex agglutination test.

2. VIDAS® UP ASSAY

25 g/mL samples were taken from spiked food samples into the sterile sampling bag, then 225 mL buffered peptone water added and homogenized. Subsequently, pre-enrichment culture were incubated at (41.5 ± 1) °C for 24 h. After the pre-enrichment step, 0.5 mL of samples were added to the VIDAS® UP test kits wells. Then kits were heated on the VIDAS® UP HEAT&GO for 5 min and VIDAS® UP analyses were made according to the manufacturer's instructions, subsequently the results were evaluated.

Table : Sensitivity and specificity values of ISO, and VIDAS® UP methods for detection of *Escherichia coli* O157:H7 (n: 360 for positive control, n: 240 for negative control)

	True Positive (TP) ⁽¹⁾	False Negative (FN) ⁽¹⁾	Total positive control	Sensitivity ⁽²⁾
VIDAS	351	9	360	97,5 %
ISO	353	7	360	98,1 %

	True Negative (TN) ⁽¹⁾	False Positive (FP) ⁽¹⁾	Total negative control	Specificity ⁽²⁾
VIDAS	233	7	240	97,1 %
ISO	236	4	240	98,3 %

⁽¹⁾ TP : positive controls showing positive results
FN : positive controls showing negative results

TN : negative controls showing negative results
FP : negative controls showing positive results

⁽²⁾ Sensitivity = TP / (TP + FN)
Specificity = TN / (FP + TN)

Adapté de : H. Mann, S. Khan, A. Prasad, F. Bayat, J. Gu, K. Jackson, Y. Li, Z. Hosseinidoust, T. F. Didar, C. D. M. Filipe, **Bacteriophage-Activated DNAzyme Hydrogels Combined with Machine Learning Enable Point-of-Use Colorimetric Detection of *Escherichia coli***. *Adv. Mater.* 2025, vol. 37 (3) <https://doi.org/10.1002/adma.202411173>

Rapid detection of *E. coli* is crucial for both environmental monitoring and clinical diagnosis. Conventional methods, including bacterial culturing, remain the gold standard approach but are time-consuming, require trained personnel, and depend on laboratory infrastructure that is often unavailable in low-resource or remote settings. As a result, there is a growing need for low-cost, easy-to-use diagnostic platforms that enable point-of-use detection without specialized equipment. We present a DNAzyme-based colorimetric hydrogel biosensor for the on-site detection of *E. coli* in complex samples.

The biosensor consists of a polyacrylamide hydrogel crosslinked with a novel *E. coli*-responsive DNAzyme construct. The DNAzyme is a synthetic DNA strand that becomes catalytically active upon binding to a specific protein, in this case, ECP1 – a highly conserved protein among both pathogenic and non-pathogenic strains of *Escherichia coli*. When ECP1 from *E. coli* binds the DNAzyme, it induces a conformational change that activates its catalytic activity. This activation leads to the cleavage of the DNA crosslinker by the DNAzyme within the hydrogel network, partially dissolving the gel and releasing the entrapped gold nanoparticles (AuNPs). The diffusion of AuNPs produces a distinct colorimetric shift, providing a visible readout of *E. coli* detection.

To lower the detection limit of the system, the biosensor also incorporates bacteriophage T7, an *E. coli*-infecting phage with high lytic activity, to specifically maximize ECP1 extracellular availability, yielding signal amplification.

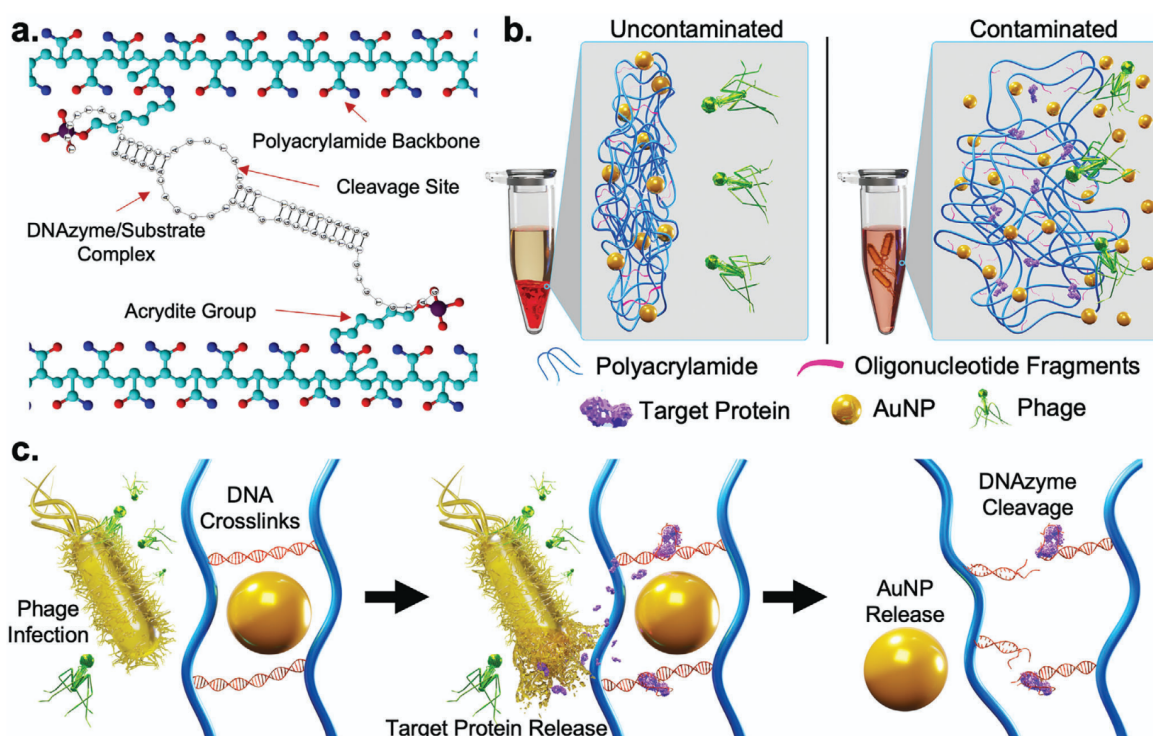


Figure 1. Schematics of colorimetric *E. coli* detecting platform.

- Chemical structure of the polymeric matrix showing an acrydite DNAzyme/substrate crosslink.
- Macro and microscale schematics of the hydrogel matrix performance under contaminated or uncontaminated conditions.
- Intended functionality of the sensor under contaminated sample conditions.

Adapté de : H. Mann, S. Khan, A. Prasad, F. Bayat, J. Gu, K. Jackson, Y. Li, Z. Hosseinidoust, T. F. Didar, C. D. M. Filipe, **Bacteriophage-Activated DNAzyme Hydrogels Combined with Machine Learning Enable Point-of-Use Colorimetric Detection of Escherichia coli**. *Adv. Mater.* 2025, vol. 37 (3) <https://doi.org/10.1002/adma.202411173>

The following documents present the optimization and characterization of the hydrogel-based detection system, including polymerization parameters, sensor sensitivity and limit of detection with and without bacteriophage T7, specificity against non-target bacteria, and stability under different conditions.

Document 13.1 : Optimization of hydrogel polymerization parameters for the detection system

The polymer components of the developed hydrogel detection platform were synthesized using free radical polymerization (FRP). The performance of the hydrogel biosensor depends on careful optimization of polymerization parameters to balance DNAzyme accessibility and crosslinking density.

In particular, the concentrations of the initiator (APS), catalyst (TEMED), and acrylamide monomer dictate chain length and determine the viscosity of the resultant hydrogel. With regards to sensing, this impacts the accessibility of the DNAzyme crosslinking sites, as well as the hydrogel's ability to effectively entrap colored agents (gold nanoparticles, AuNPs).

To identify optimal conditions, hydrogels must be systematically tested under both *E. coli*-positive and *E. coli*-negative (control) conditions.

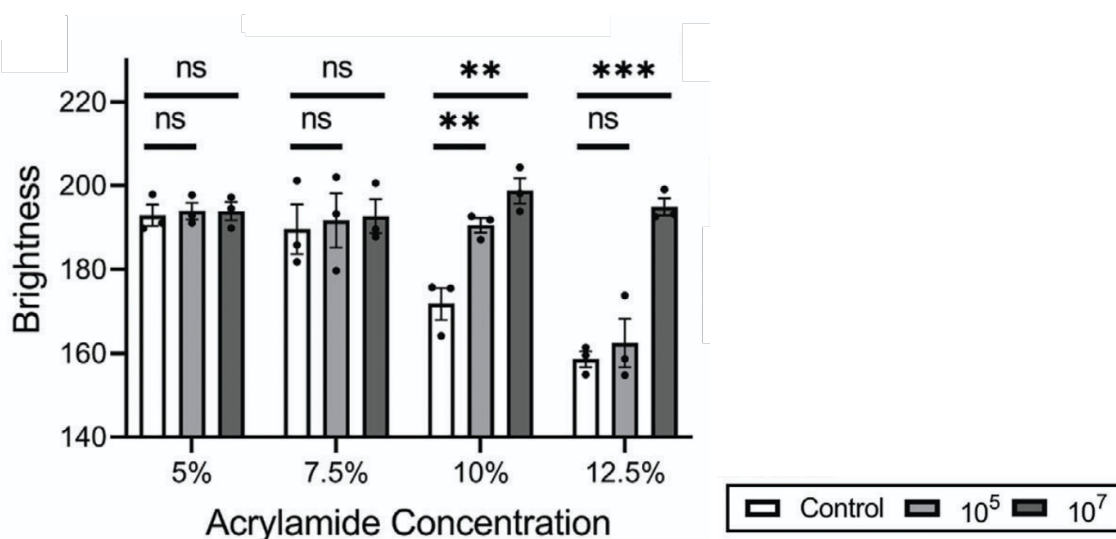


Figure 2. Optimization of acrylamide concentration for the hydrogel-based detection system.

Brightness response analysis of hydrogels polymerized using different concentrations of acrylamide monomer. The response of hydrogels was evaluated at 10^5 and 10^7 CFU·mL⁻¹ of *E. coli*. Sample size $n = 3$ for each test category.

Method for Brightness response analysis: Gels were imaged on an Epson Perfection V850 Pro scanner. Results were quantified by measuring the mean brightness of a consistent area of each tube (50 pixels in height and 100 pixels in width) with ImageJ software. The brightness increases when gold nanoparticles are released from the hydrogel matrix, as their dispersion reduces light scattering and enhances the overall optical transparency of the system.

Asterisks represent “ns” ($p > 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$) from ANOVA with Dunnett’s multiple comparisons test. All error bars represent the standard error of the mean.

Document 13.2 : Optimization of detection system sensitivity

With optimal polymerization parameters identified, the sensitivity of the sensor was tested through incubation with *E. coli* suspensions ranging from 10^1 to 10^7 CFU·mL⁻¹.

Further optimization of the platform was proposed. Performance of the platform was subsequently verified using artificially contaminated lake water samples.

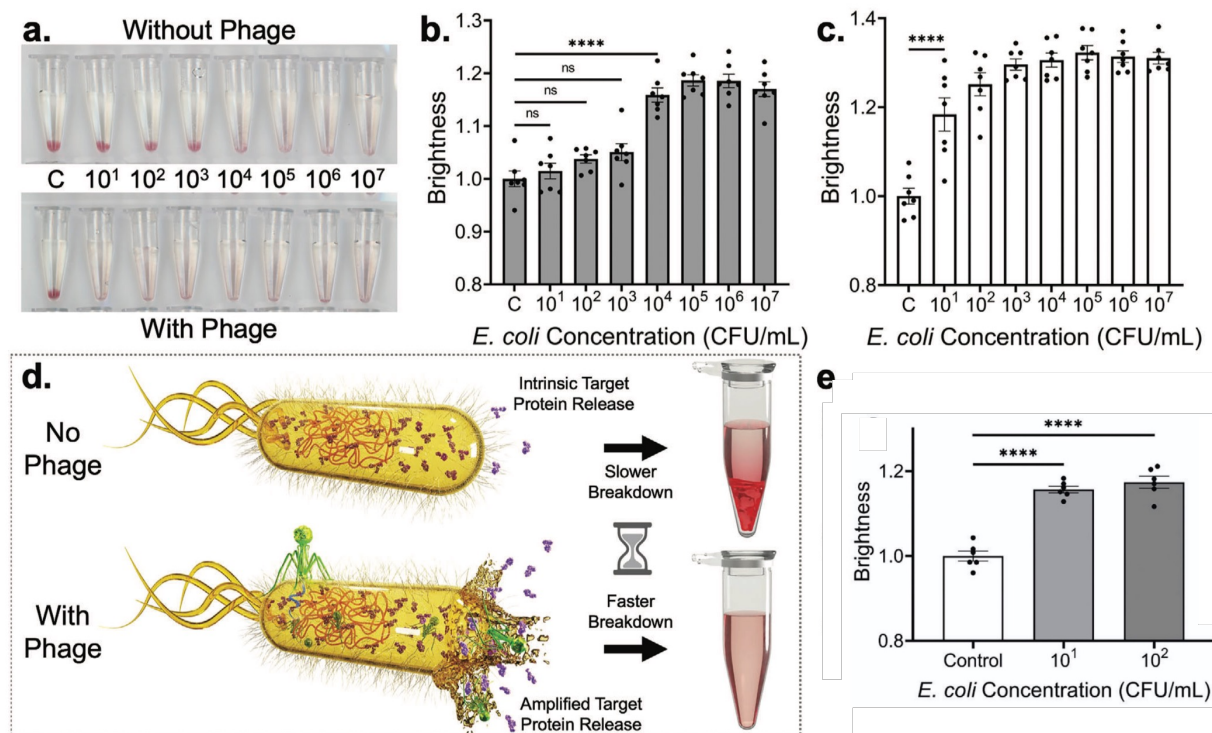


Figure 3. Determination of the limit of detection of the hydrogel-based detection system in the presence or absence of bacteriophage T7.

a) Optical images of colorimetric detection of *E. coli* after an 18 h incubation at 40 °C, with and without the addition of T7 phage after 6 h. Numbers represent CFU·mL⁻¹.

b–c) Quantified results for the experiments pictured in part **a**.

Panel **b**. shows results without phage, panel **c**. shows results with phage introduced after 6 h.

Sample size $n = 7$ for each concentration.

Materials for gel Sensitivity Testing: Resuspended E. coli was serially diluted in deionized water to concentrations from 10^1 to 10^7 CFU·mL⁻¹.

70 μ L of dilutions were added to each gel, along with 15 μ L of an autolyzed yeast extract solution at a concentration of 50 mg·mL⁻¹. The tubes containing the hydrogel, buffer, yeast extract, and bacteria were then incubated at 40 °C and 180 RPM. After 6 h, 70 μ L of T7 bacteriophage was added, and after 18 h the samples were removed from the shaker and imaged on an Epson Perfection V850 Pro scanner. Results were quantified by measuring the mean brightness of a consistent area of each tube (50 pixels in height and 100 pixels in width) with ImageJ software.

d) Schematic of the proposed mechanism of phage increasing DNAzyme cleavage.

T7 bacteriophage attaching to *E. coli*, injecting its DNA, and inducing bacterial cell lysis, resulting in increased amounts of bacterial proteins being released into the extracellular environment.

e) Detection performance of the platform for 10^1 and 10^2 CFU·mL⁻¹ *E. coli* lake water samples.

Sample size $n = 6$ for each concentration.

Asterisks represent “ns” ($p > 0.05$) and **** ($p \leq 0.0001$) from ANOVA with Dunnett’s multiple comparisons test. All error bars represent the standard error of the mean.

Each dataset’s brightness values have been normalized to their respective controls.

Document 13.3 : Sensor specificity

Next, we sought to test the specificity of the developed sensor. Here, *E. coli* O157:H7 (EC O157) was used as a positive test sample, while *Acinetobacter lwoffii* (AL), *Bacillus subtilis* (BS), *Listeria monocytogenes* (LM), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were used as non-specific test samples.

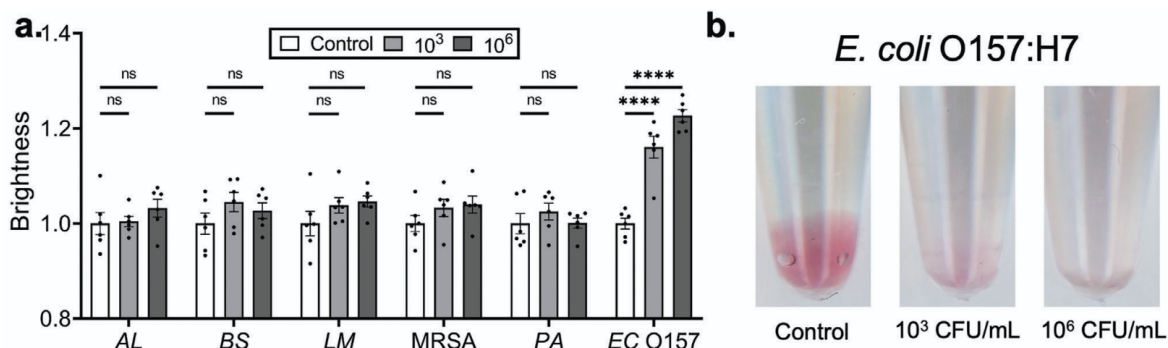


Figure 4. Detection specificity of the platform

a) Quantified results of the detection specificity of the platform when tested with various other species of bacteria at concentrations of 10^3 and 10^6 CFU·mL⁻¹. Sample size $n = 6$ for each concentration.

b) Optical images showing naked-eye detection of *E. coli* O157:H7. Image taken after 18 h at 40 °C.

Asterisks represent “ns” ($p > 0.05$) and **** ($p \leq 0.0001$) from ANOVA with Dunnett’s multiple comparisons test. All graphs have error bars representing standard error of the mean. Each dataset’s brightness values have been normalized to their respective controls.

Document 13.4 : Sensor stability

We then assessed the stability of the developed sensor within various long-term storage conditions. Sensors were stored at temperatures of -20 , $+4$, and $+20$ °C for two weeks and then tested using uncontaminated, 10^3 CFU·mL⁻¹ *E. coli*, and 10^6 CFU·mL⁻¹ *E. coli* test samples. To further assess the robustness of the sensor for analyzing samples of varying acidity and alkalinity, the impact of sample pH on sensor performance was examined. Water samples with pH values ranging from 5 to 9 were used to test sensors in both uncontaminated and contaminated conditions.

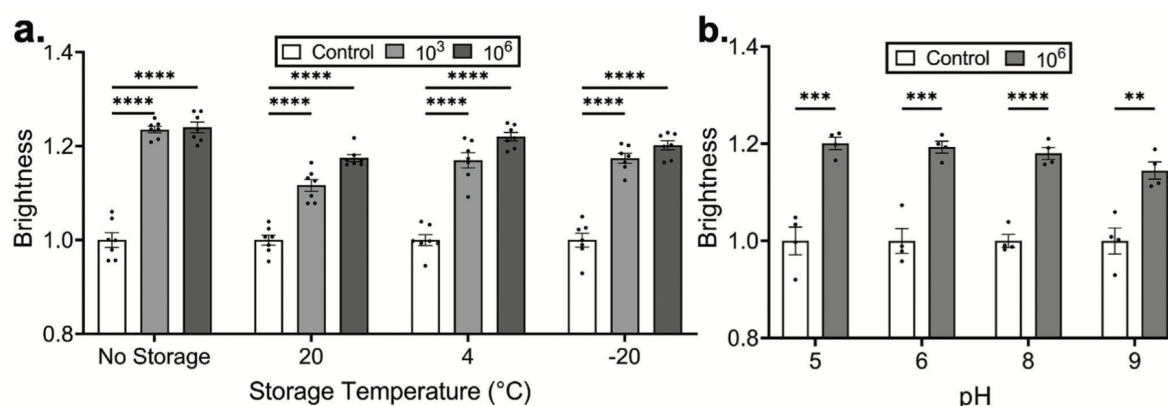


Figure 5. Quantified results of the sensor stability assessment

a) Detection stability after storage for two weeks under different temperature conditions. Sample size $n = 7$ at each condition.

b) Detection performance of the platform for 10^6 CFU·mL⁻¹ *E. coli* with water samples of differing pH values. Sample size $n = 4$ at each condition.

Asterisks represent ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$), and **** ($p \leq 0.0001$) from ANOVA with Dunnett’s multiple comparisons test. All error bars represent the standard error of the mean. Each dataset’s brightness values have been normalized to their respective controls.

Adapté de : S-Y. Lee, S-W. Oh. *Rapid and visual detection of Escherichia coli O157:H7 using an RPA-CRISPR/Cas12a-based syringe filter*. *Microchemical Journal*, volume 208, 2025
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112624>

Document 14.1 : Principe

La technologie RPA (*Recombinase Polymerase Amplification*, amplification par recombinaise polymérase) est une technologie d'amplification de l'ADN utilisant une recombinaise et une polymérase à 37- 42 °C.

Cette technologie se démarque par des avantages significatifs liés à sa basse température et son court temps d'amplification, conduisant ainsi à un gain énergétique.

Grâce à ces avantages, cette technologie est largement étudiée dans le domaine de la sécurité alimentaire et le diagnostic médical.

La technologie RPA peut être combinée à la technologie CRISPR/Cas pour améliorer sa polyvalence et son efficacité.

CRISPR-Cas est décrit comme un système immunitaire adaptatif qui permet aux bactéries et aux archées de se défendre contre les acides nucléiques hétérologues, viraux ou étrangers.

Dans ce système, l'ARN guide (ARNcr) reconnaît une séquence d'ADN spécifique puis les enzymes Cas réalisent un clivage, inactivant ainsi le gène. En particulier, les endonucléases Cas de classe 2 (Cas9, Cas12, Cas13 et Cas14...), sont utilisées dans de nombreux domaines comme l'édition de gènes ou les biocapteurs, du fait de leur constitution monomérique.

Le système CRISPR/Cas12a fonctionne en reconnaissant et clivant une séquence spécifique sur l'ADN lors de la fixation de l'ARN guide. L'ARN guide reconnaît par complémentarité une séquence d'ADN spécifique à proximité proche d'un site PAM (*protospacer-adjacent motif*) riche en T entraînant le clivage par Cas12a.

Cas12a possède en plus une activité de clivage collatéral en trans d'ADN simple brin, permettant l'obtention d'un signal coloré ou fluorescent lors de l'utilisation d'un ADN rapporteur (ADN exogène marqué par un fluorochrome et un extincteur (6-FAM-TTTTTTTT-BHQ1), présentant un transfert d'énergie par résonance).

En exploitant ces mécanismes, CRISPR/Cas12a constitue un système de biocapteur sensible et précis, facilitant la détection rapide et efficace des agents pathogènes.

Document 14.2 : Optimisation des conditions de réaction pour détecter *E. coli* O157:H7 à l'aide du système CRISPR/Cas12a

L'obtention d'une intensité maximale de fluorescence suite au clivage de l'ADN rapporteur a été optimisée en étudiant l'effet de la durée de la réaction, du rapport des concentrations en endonucléase Cas12a et en ARN guide et des différentes concentrations en ADN rapporteur.

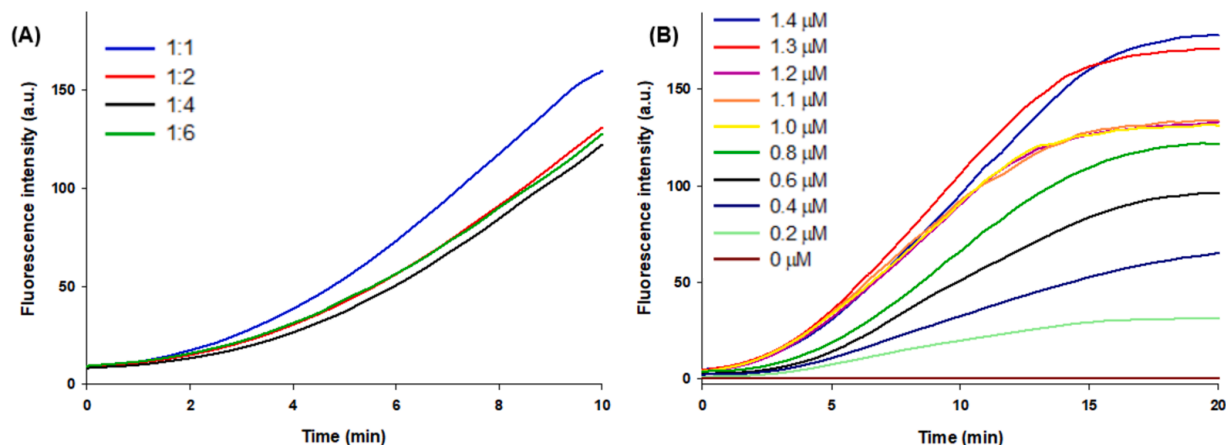


Figure 1. Condition optimization for CRISPR/Cas12a.

Fluorescence kinetic curves for:

(A) Cas12a/crRNA ratios (Cas12a enzyme: crRNA = 1:1, 1:2, 1:4, and 1:6)

(B) Concentrations of ssDNA reporters.

(C) Visualized detection and fluorescence intensity at 0, 5, 10, and 15 min during the Cas12a-mediated trans-cleavage at a temperature of 37 °C with 1.0 μM of ssDNA reporter.

Letters **a**, **b**, **c**, **d** indicate significant differences ($p < 0.05$) among the positive signals of the ssDNA reporter measured at each time point.

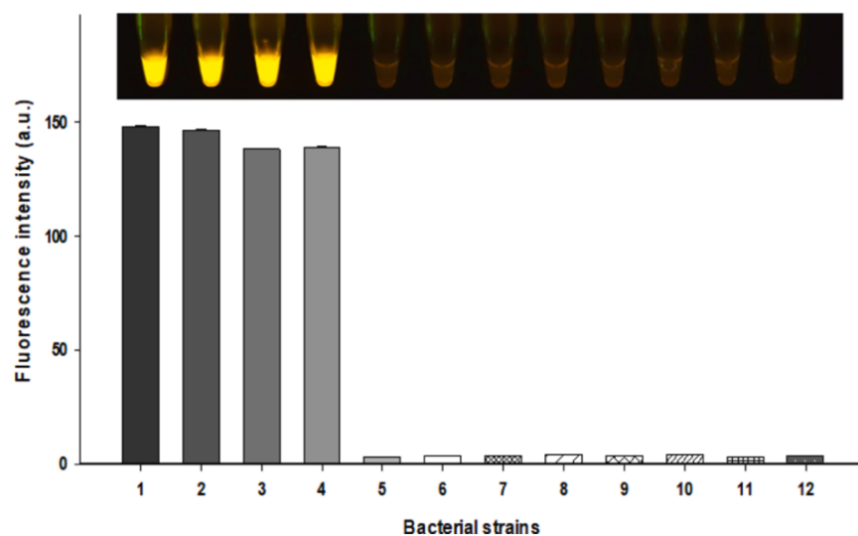
Document 14.3 : Spécificité du système CRISPR/Cas12a

L'étude de la spécificité de la technique a été conduite à partir de cultures microbiennes pures.

Figure 2. Specificity of RPA-CRISPR/Cas12a.

Lanes 1–4: *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895, 43889, 35150, and 43890)

Lanes 5–12: non-*Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli*, *E. faecalis*, *C. sakazakii*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *P. aeruginosa*).



Adapté de : S-Y. Lee, S-W. Oh. *Rapid and visual detection of Escherichia coli O157:H7 using an RPA-CRISPR/Cas12a-based syringe filter. Microchemical Journal, volume 208, 2025*
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112624>

Le système de détection RPA-CRISPR/Cas12a combiné à une concentration bactérienne préalable par filtration est soumis à validation sur des échantillons de laitue romaine préalablement inoculée avec $10 \cdot 10^6$ UFC·g⁻¹. L'ADN génomique extrait de chaque échantillon après l'étape de concentration par filtration sur seringue d'*E. coli* O157:H7 est analysé par RPA-CRISPR/Cas12a. La validation est réalisée par comparaison avec une RPA-CRISPR/Cas12a sans filtration préalable. Les résultats sont comparés à ceux obtenus par PCR en temps réel sur les mêmes ADN génomiques obtenus avec ou sans filtration.

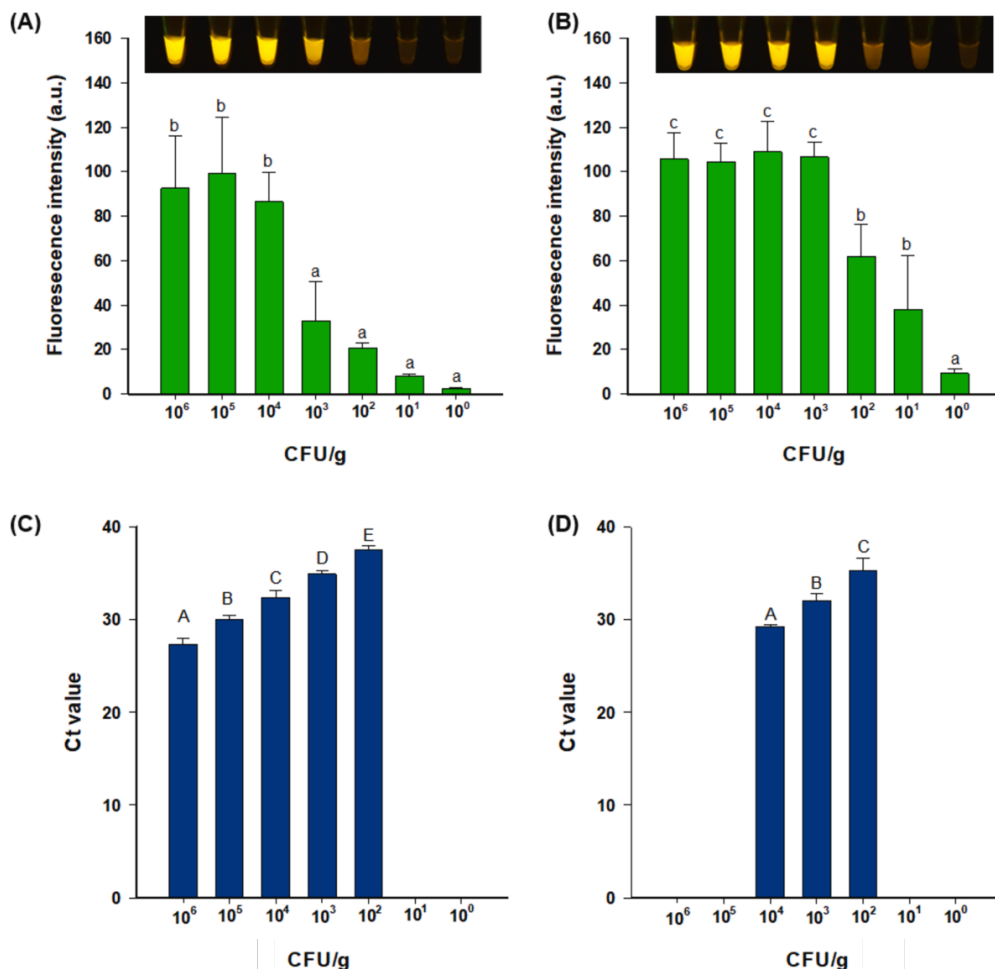
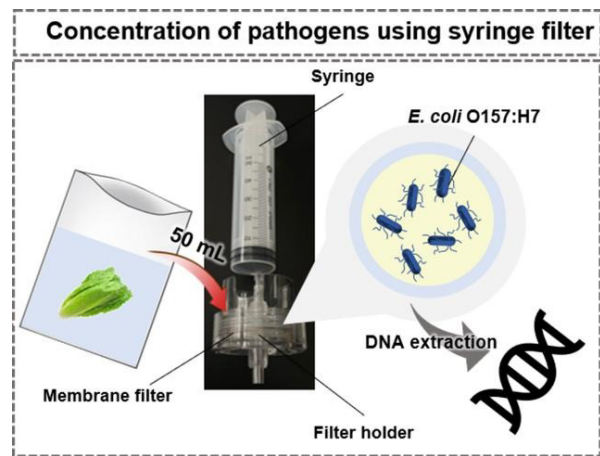


Figure 3. Comparison of the sensitivity of the RPA-CRISPR/Cas12a system on artificially inoculated romaine lettuce without (A) and with (B) syringe-based filtration, and comparison of the sensitivity of real-time PCR without (C) and with (D) syringe-based filtration.

CFU/g represents the concentration of inoculated bacteria.

Letters **a, b, c** indicate significant differences ($p < 0.05$) in fluorescence intensity. A non template control (NTC) shows a fluorescence intensity non significantly different than group **a** (data not shown).

Letters **A, B, C, D, E** indicate significant differences ($p < 0.05$) in Ct value.