



Plan d'action pour assurer la sécurité des produits alimentaires

RAPPORT

2010-2011 Étude ciblée

Étude ciblée visant les bactéries pathogènes et *E. coli*
générique dans les fines herbes fraîches



Table des matières

Table des matières	1
Sommaire	2
1 Introduction	4
1.1 Plan d'action pour assurer la sécurité des produits alimentaires	4
1.2 Études ciblées.....	4
1.3 Codes d'usages, lois et règlements.....	5
2 Étude sur les fines herbes fraîches	6
2.1 Justification	6
2.2 Microorganismes ciblés.....	7
2.2.1 Bactéries pathogènes – <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> O157, <i>Shigella</i> et <i>Campylobacter</i>	7
2.2.2 <i>E. coli</i> générique – un indicateur de contamination fécale	8
2.3 Prélèvement des échantillons	8
2.4 Répartition des échantillons	9
2.5 Détails sur la méthode	11
2.6 Lignes directrices pour l'évaluation des échantillons	11
2.7 Limites de l'étude	12
3 Résultats	14
4 Discussion et conclusion	16
5 Références	18
Annexe A : Listes des acronymes	20
Annexe B : Éclosions mondiales de maladies d'origine alimentaire associées à des fines herbes fraîches contaminées par des bactéries pathogènes (1997-2010)*	21
Annexe C : Sommaire des éclosions mondiales de maladies d'origine alimentaire associées à des fines herbes fraîches contaminées par des bactéries pathogènes (1997-2010)	23
Annexe D : Méthodes d'analyse microbiologique	24

Sommaire

Le Plan d'action pour assurer la sécurité des produits alimentaires (PAASPA) vise à moderniser et à renforcer le système canadien de salubrité des aliments afin que l'on puisse parvenir à mieux protéger les Canadiens contre les aliments insalubres et, finalement, à réduire la fréquence des maladies d'origine alimentaire.

Au cours des dernières années, de nombreuses éclosions de maladies d'origine alimentaire causées par la consommation de fines herbes fraîches ont été signalées dans le monde. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture/Organisation mondiale de la santé (FAO/OMS) a désigné les fines herbes fraîches comme le groupe de fruits et de légumes frais ayant la priorité la plus élevée au chapitre des dangers microbiologiques. Les fines herbes fraîches peuvent devenir contaminées par divers pathogènes alimentaires au cours de la production, lors de la récolte, des manipulations après la récolte, de l'emballage et lors de la distribution. La présence de pathogènes dans les herbes fraîches constitue un risque potentiel de maladie d'origine alimentaire, vu que les fines herbes sont souvent consommées crues. Les principales bactéries pathogènes préoccupantes dans les fines herbes fraîches sont *Salmonella*, *Shigella*, et *Escherichia coli* (*E. coli*) O157.

Compte tenu de ces facteurs et de leur pertinence pour la santé des Canadiens, les fines herbes fraîches ont été sélectionnées comme l'un des groupes prioritaires de fruits et de légumes frais devant faire l'objet d'une surveillance accrue dans le cadre du PAASPA. Au cours d'une étude de base de quatre ans (2009/2010 – 2012/2013), nous avons prélevé environ 5 000 échantillons de fines herbes fraîches dans des commerces de détail, puis nous avons recherché divers pathogènes préoccupants dans ces échantillons. L'objectif principal de l'étude 2010/2011 était la production de données de surveillance de base sur la présence des bactéries pathogènes *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, et *E. coli* O157, ainsi que l'indicateur de contamination fécale *E. coli* générique, dans les fines herbes fraîches vendues sur le marché canadien. Nous avons prélevé et analysé au total 1 646 échantillons de fines herbes fraîches provenant de l'étranger ou du Canada et produites selon une méthode classique ou biologique.

Les résultats de l'étude 2010/2011 indiquent qu'aucune bactérie pathogène et *E. coli* génériques n'ont été détectées dans la majorité (98,8 %) des échantillons de fines herbes fraîches. Deux échantillons (0,1 %) étaient contaminés par *Salmonella* et quatre échantillons (0,2 %) présentaient des nombres élevés (> 1 000 UFC/g) d'*E. coli* génériques. Des enquêtes relatives à ces constatations ont donné lieu à deux rappels de produits. De plus, treize échantillons (0,8 %) affichaient des nombres d'*E. coli* génériques (100-1 000 UFC/g) élevés mais au-dessous du seuil d'insatisfaction (> 1 000 UFC/g) et n'ont pas exigé la prise de mesures immédiates. Ces résultats suggèrent que la vaste

majorité des fines herbes fraîches offertes sur le marché canadien qui ont été échantillonnées dans le cadre de la présente étude ont été produites selon de bonnes pratiques agricoles (BPA) et de bonnes pratiques de fabrication (BPF).

L'ACIA réglemente et supervise l'industrie. Elle collabore également avec les provinces et les territoires et fait la promotion d'une manipulation sécuritaire des aliments tout au long de la chaîne de production alimentaire. N'oublions pas cependant que l'industrie alimentaire et les secteurs du détail du Canada sont en définitive responsables des aliments qu'ils produisent et qu'ils vendent et qu'il appartient aux consommateurs de manipuler d'une manière sécuritaire les aliments qui sont en leur possession. Enfin, des conseils généraux sur la manipulation sécuritaire des aliments sont facilement disponibles pour le grand public. L'ACIA continuera ses activités de surveillance et informera le public de ses constatations.

1 Introduction

1.1 Plan d'action pour assurer la sécurité des produits alimentaires

En 2007, le gouvernement canadien a lancé une initiative quinquennale en réponse au nombre croissant de rappels de produits et de préoccupations liées à la salubrité des aliments. Cette initiative, appelée Plan d'action pour assurer la sécurité des produits alimentaires et de consommation (PAASPAC) (1), vise à moderniser et à renforcer le système canadien de salubrité des produits alimentaires, de santé et de consommation. L'initiative du PAASPAC rassemble de multiples intervenants dont l'objectif commun est d'assurer la salubrité des aliments vendus aux Canadiens.

Le Plan d'action pour assurer la sécurité des produits alimentaires (PAASPA) (2) de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) est l'un des volets de la vaste initiative gouvernementale que constitue le PAASPAC. Le but du PAASPA est de cerner les risques liés à l'approvisionnement alimentaire, de limiter les probabilités d'occurrence de ces risques, d'améliorer les mesures de contrôle applicables aux aliments de sources étrangères et canadiennes et, enfin, d'identifier les importateurs et les fabricants d'aliments.

Le PAASPA comporte douze (12) principaux secteurs d'activités. L'un de ces secteurs, la cartographie et la surveillance de base des risques, a pour objectif principal de mieux identifier, évaluer et prioriser les dangers liés à la salubrité des aliments au moyen d'activités de cartographie des risques, de collecte d'information et d'analyse des aliments vendus sur le marché canadien. Les études ciblées sont l'un des moyens utilisés pour déterminer la présence et la gravité de dangers particuliers dans certains aliments.

1.2 Études ciblées

Les études ciblées servent à recueillir de l'information sur la probabilité d'occurrence de dangers dans les denrées alimentaires. Les études ciblées en microbiologie visent à recueillir des données de base sur les dangers microbiologiques prioritaires et/ou émergents dans des produits ciblés, principalement les fruits et les légumes ainsi que les ingrédients alimentaires importés. Un nombre statistiquement significatif d'échantillons est prélevé sur plusieurs années pour permettre la prise en compte des variations saisonnières et des changements inhérents à la production. Les études ciblées diffèrent des activités de surveillance microbiologique habituelles de l'ACIA, lesquelles consistent à vérifier la présence de dangers multiples dans des échantillons provenant d'un large éventail de denrées et visent à déterminer la conformité réglementaire de lots définis aux normes ou aux lignes directrices établies.

Pour déterminer les combinaisons d'aliments et de dangers qui sont susceptibles de présenter les risques les plus importants pour la santé et qui doivent faire l'objet d'études

ciblées, l'ACIA s'appuie sur une multitude de sources : documents scientifiques, rapports sur des éclosions de maladies d'origine alimentaire et/ou information recueillie par le Comité scientifique de la salubrité des aliments (CSSA), un groupe d'experts des gouvernements fédéral, provinciaux et territoriaux œuvrant dans le domaine de la salubrité des aliments (3).

La présente étude ciblée (2010/2011) porte sur une partie d'une collection de plus de 5 000 échantillons de fines herbes fraîches prélevés sur une période de quatre ans (2009/2010 – 2012/2013). Elle a été conçue en vue de la collecte d'information de base sur la présence de bactéries pathogènes préoccupantes ainsi que sur la présence et le nombre d'*E. coli* génériques dans les fines herbes fraîches vendues aux Canadiens dans les commerces de détail.

1.3 Codes d'usages, lois et règlements

Des normes, des codes d'usages et des lignes directrices internationales en matière d'alimentation, de production alimentaire et de salubrité alimentaire sont élaborés dans le cadre des évaluations conjointes FAO/OMS des travaux de la Commission du Codex Alimentarius. Les producteurs de fruits et de légumes frais sont encouragés à respecter ces codes d'usages internationaux. Deux codes d'usages sont pertinents pour la présente étude : le *Code d'usages en matière d'hygiène pour les fruits et légumes frais* (CAC/RCP 53-2003) (4) et le *Code d'usages international recommandé – Principes généraux d'hygiène alimentaire* (CAC/RCP 1-1969) (5). Ces codes traitent des bonnes pratiques agricoles (BPA) et des bonnes pratiques de fabrication (BPF) qui permettent, lorsqu'elles sont appliquées, de maîtriser et de réduire les risques de contamination inhérents aux dangers d'origine microbienne, chimique ou physique associés à toutes les étapes de la production des fruits et des légumes frais, de la production primaire à l'emballage.

Les fruits et les légumes frais disponibles sur le marché canadien doivent répondre aux exigences de la *Loi sur les aliments et drogues* (LAD) (6) et du *Règlement sur les aliments et drogues* (RAD) (7), qui prévoient certaines restrictions concernant la production, l'importation, la vente, la composition et le contenu des aliments et des produits alimentaires. Selon l'alinéa 4(1)a) de la LAD, il est interdit de vendre un aliment qui contient des pathogènes d'origine alimentaire, tandis que selon l'alinéa 4(1)e) et l'article 7, il est interdit de vendre des aliments produits dans des conditions non hygiéniques.

Les fruits et les légumes frais importés ou produits au Canada et vendus dans le commerce interprovincial doivent satisfaire aux exigences de salubrité énoncées dans le *Règlement sur les fruits et les légumes frais* (8) en application de la *Loi sur les produits agricoles au Canada* (9). Ce règlement est conçu pour que les fruits et légumes frais vendus aux consommateurs soient sans danger, sains et correctement classés, emballés et étiquetés.

Les fruits et légumes frais qui sont vendus en tant qu'aliments biologiques dans le commerce international et interprovincial ou qui portent le logo fédéral « Biologique Canada » doivent répondre aux exigences du *Règlement sur les produits biologiques, 2009* (10) en application de la *Loi sur les produits agricoles au Canada*. Ces produits doivent être certifiés par un organisme de certification reconnu par l'ACIA.

Le *Règlement sur les fruits et les légumes frais*, le *Règlement sur les produits biologiques*, et les articles de la LAD et du RAD qui ont trait aux aliments sont administrés par l'ACIA.

En général, les études ciblées du PAASPA sont menées à des fins de surveillance plutôt qu'à des fins de conformité réglementaire. Cependant, si les résultats d'analyse d'un échantillon prélevé dans le cadre d'une étude ciblée indiquent un risque potentiel pour la santé publique, une enquête sur la salubrité des aliments est déclenchée, ce qui peut inclure un échantillonnage de suivi, l'inspection des installations et la consultation de Santé Canada sur une évaluation des risques pour la santé. Les constatations découlant d'une telle enquête peuvent justifier le rappel du produit touché.

2 Étude sur les fines herbes fraîches

2.1 Justification

De nombreuses éclosons de maladies d'origine alimentaire causées par la consommation de fines herbes fraîches ont été signalées dans le monde. Entre 1997 et 2010, 21 éclosons de maladies d'origine alimentaire ont été associées à la consommation de fines herbes fraîches contaminées (annexe B). *E. coli* pathogène, *Shigella* spp. et *Salmonella* spp. ont été identifiés comme étant responsables d'environ 95 % de ces éclosons (annexe C). Trois de ces éclosons sont survenues au Canada et ont été liées à la consommation de fines herbes fraîches contaminées par *Shigella sonnei* (annexe B).

Les fines herbes fraîches, tout comme d'autres légumes-feuilles, peuvent être contaminées par divers pathogènes d'origine alimentaire durant la production, la récolte, la manipulation post-récolte, la transformation et la distribution. Les fines herbes fraîches contaminées peuvent introduire des pathogènes depuis un pays producteur de fines herbes vers un pays consommateur de fines herbes, où elles peuvent causer des éclosons de maladies d'origine alimentaire. De récentes éclosons de maladies d'origine alimentaire qui sont survenues au Royaume-Uni (11,12) et au Danemark (13) ont été associées à des fines herbes fraîches importées qui renfermaient des bactéries pathogènes (ex. *Salmonella*, *E. coli* pathogène). Les méthodes de production peuvent également avoir un effet sur la charge microbienne des fines herbes fraîches. Ainsi, l'utilisation de fumier animal composté d'une manière non appropriée suscite des préoccupations concernant la contamination possible des fruits et légumes frais par des pathogènes humains. Comme les méthodes de production biologique reposent davantage sur l'utilisation du fumier pour la fertilisation des champs, certains ont

laissé entendre – sans être en mesure de le prouver à ce jour – que les produits biologiques pourraient présenter des taux de contamination microbienne plus élevés.

Durant une réunion conjointe d'experts FAO/OMS tenue en 2007 (14), les fines herbes fraîches et les légumes-feuilles ont été désignés comme le groupe de fruits et de légumes frais ayant la priorité la plus élevée au chapitre des dangers microbiologiques. Cette désignation repose sur des facteurs multiples, y compris des éclosions antérieures, le potentiel de contamination et d'autres éléments de preuve.

Compte tenu de l'information susmentionnée et des recommandations du Comité scientifique de la salubrité des aliments (3), les fines herbes fraîches ont été sélectionnées comme l'un des groupes prioritaires de fruits et de légumes frais devant faire l'objet d'une surveillance en vertu du PAASPA pendant une période de quatre ans (2009/2010 – 2012/2013). L'objectif général de cette étude de quatre ans (2009/2010 - 2012/2013) est de recueillir de l'information de base sur la présence de bactéries pathogènes préoccupantes dans les fines herbes fraîches vendues dans les commerces de détail au Canada.

La présente étude ciblée (2010/2011) s'inscrit dans le cadre d'un processus de collecte d'information visant à déterminer la présence et la répartition de bactéries pathogènes (*E. coli* O157:H7/NM, *Salmonella* et *Shigella*) ainsi que la présence, la répartition et le nombre d'*E. coli* génériques (un indicateur de contamination fécale) dans les fines herbes fraîches provenant de l'étranger ou du Canada et produites selon une méthode classique ou biologique. La présente étude vise également à déterminer la présence et la répartition de *Campylobacter* dans des fines herbes fraîches provenant de l'étranger ou du Canada et produites selon une méthode classique.

2.2 Microorganismes ciblés

2.2.1 Bactéries pathogènes – *Salmonella*, *E. coli* O157, *Shigella* et *Campylobacter*

Les bactéries pathogènes *Salmonella* et *E. coli* O157 sont naturellement présentes dans les intestins d'animaux comme les volailles et les bovins (15). La plupart des éclosions associées à ces bactéries pathogènes sont liées à la consommation d'aliments d'origine animale contaminés (ex. poulet, bœuf). Cependant, au cours de la dernière décennie, les fruits et les légumes frais sont apparus comme des sources importantes de maladies associées à la présence de ces bactéries pathogènes (16). En général, les fruits et les légumes frais deviennent contaminés par *Salmonella* et *E. coli* O157 lorsqu'ils sont dans les champs, en raison d'un fumier incorrectement composté, d'une eau contaminée et d'excréments d'animaux sauvages ou de pratiques d'hygiène inadéquates par les travailleurs agricoles (17).

Les humains sont les seuls hôtes des espèces de *Shigella*. La contamination des aliments par des manipulateurs d'aliments infectés et l'eau contaminée par des fèces humaines sont les causes les plus courantes de shigellose. Des cas de shigellose ont été associés à la consommation de fruits, de légumes, de mollusques, de crustacés et de viandes de poulet contaminés (15).

Comme pour *Salmonella* et *E. coli* O157, *Campylobacter* est naturellement présent dans les intestins de la plupart des animaux producteurs d'aliments, comme les poulets, les porcs et les bovins. *Campylobacter* est l'une des principales bactéries responsables de maladies d'origine alimentaire aux États-Unis et au Canada. Les volailles crues et le lait non pasteurisé (cru) sont les principales sources d'aliments contaminés, mais les légumes peuvent aussi être contaminés par *Campylobacter* (15).

2.2.2 *E. coli* générique – un indicateur de contamination fécale

Les bactéries *E. coli* qui vivent dans le gros intestin des humains et des animaux sont généralement inoffensives. D'ordinaire présente dans les matières fécales humaines et animales, la bactérie *E. coli* est un indicateur de contamination fécale directe ou indirecte des aliments (18). La présence de la bactérie *E. coli* dans les aliments indique également une contamination possible par des microorganismes entériques pathogènes, tels que *Salmonella* ou *E. coli* O157, qui vivent également dans les intestins d'humains et d'animaux infectés. Soulignons cependant que si la présence d'*E. coli* génériques dans les aliments montre qu'il existe un risque accru de contamination par des microorganismes pathogènes, elle ne constitue néanmoins pas une preuve concluante d'une telle contamination. Des nombres élevés d'*E. coli* génériques dans les fruits et légumes frais vendus dans les commerces de détail sont une indication qu'une contamination est survenue à un point quelconque entre la production et le moment de la vente.

2.3 Prélèvement des échantillons

Les échantillons de fines herbes fraîches prélevés pour la présente étude comprenaient des fines herbes en bottes parées et des fines herbes fraîches non coupées et préemballées. Les fines herbes séchées ont été exclues de la présente étude. Tous les échantillons ont été prélevés dans des divers types de commerces, y compris des grands magasins à succursales multiples d'envergure nationale, des épicerie locales/régionales, d'autres magasins de détail traditionnels et des magasins d'aliments naturels, situés dans diverses villes à travers le Canada. Le nombre d'échantillons prélevés dans chacune des régions du Canada était fondé sur la proportion de la population des régions respectives. Les échantillons de fines herbes canadiennes ont été prélevés durant les mois d'été (juin-septembre), tandis que les échantillons de fines herbes importées l'ont été principalement durant l'automne, l'hiver et le printemps. Aux fins de la présente étude, les échantillons dont l'étiquette portait la mention « biologique » ont été identifiés comme étant issus d'une méthode de production

« biologique » et les autres échantillons ont été identifiés comme étant issus d'une méthode de production « classique ».

Aux fins de la présente étude, un échantillon était constitué d'une seule unité d'échantillonnage (ex. une ou des portions-consommateurs prélevées sur un seul lot) d'un poids total d'au moins 200 g. Les échantillons prélevés devaient être expédiés dans des conditions propres à limiter la multiplication des microorganismes durant le transport. Les échantillons dont on a mis en doute les conditions auxquelles ils ont été soumis durant leur manipulation ou leur expédition ont été déclarés impropres à l'analyse.

2.4 Répartition des échantillons

Selon la conception de la présente étude, 1 646 échantillons ont été prélevés au total; 67,3 % (1 107 échantillons) étaient de sources étrangères et 32,7 % (539 échantillons) étaient de sources canadiennes. Les fines herbes produites selon une méthode classique représentaient environ 70 % du nombre total des échantillons; le reste étant des échantillons de fines herbes produites selon une méthode biologique.

La plupart des échantillons de fines herbes importées provenaient des États-Unis (62 %) et de trois autres pays (31,7 %), soit la Colombie, la République dominicaine et le Mexique (tableau 1). Le pays d'origine de 17 échantillons (1,5 %) n'a pu être identifié.

Plus de 14 types de fines herbes ont été prélevés dans des commerces de détail du Canada. Trois types de fines herbes – persil, coriandre et basilic – représentaient 63,2 % du nombre total des échantillons prélevés (tableau 2).

Tableau 1. Répartition des échantillons de fines herbes fraîches importées par pays d'origine

Pays d'origine	Classique	Biologique	Total	
	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons	Pourcentage des échantillons
Chine	1	0	1	0,1
Colombie	75	39	114	10,3
Costa Rica	2	0	2	0,2
République dominicaine	125	0	125	11,3
Israël	34	5	39	3,5
Italie	0	1	1	0,1
Mexique	96	16	112	10,1
États-Unis	417	269	686	62,0
Vietnam	9	0	9	0,8
Thaïlande	1	0	1	0,1
Pays non identifié	17	0	17	1,5
Total	777	330	1 107	100

Tableau 2. Types d'échantillons de fines herbes fraîches

Type de fines herbes	Sources importées		Sources canadiennes		Total	
	Classique	Biologique	Classique	Biologique	Nombre d'échantillons	Pourcentage des échantillons
	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons		
Basilic	64	32	58	24	178	10,8
Ciboulette	32	7	53	13	105	6,4
Coriandre	160	99	59	11	329	20,0
Aneth	8	17	4	9	38	2,3
Marjolaine	3	1	0	2	6	0,4
Menthe	58	13	44	16	131	8,0
Origan	45	5	20	10	80	4,9
Persil	283	130	72	49	534	32,4
Romarin	53	11	18	6	88	5,4
Sauge	11	3	1	10	25	1,5
Sarriette	0	1	1	8	10	0,6
Oseille	0	0	0	4	4	0,2
Estragon	3	3	0	6	12	0,7
Thym	45	6	25	7	83	5,0
Autres*	12	2	7	2	23	1,4
Total	777	330	362	177	1 646	100

* Autres : fines herbes pour lesquelles peu d'échantillons ont été prélevés (ex. un ou deux échantillons au total) ou types de fines herbes non identifiées.

2.5 Détails sur la méthode

Les échantillons de la présente étude ciblée ont été analysés au moyen des méthodes du Compendium de méthodes pour l'analyse microbiologique des aliments de Santé Canada (19) (annexe D). Ces méthodes d'analyse, qui sont utilisées par l'ACIA à des fins de vérification de la conformité réglementaire, sont entièrement validées pour l'analyse des fruits et légumes frais, y compris les fines herbes fraîches.

Pour la détection d'*E. coli* O157:H7/NM, de *Salmonella* spp. et de *Shigella* spp., nous avons suivi une procédure en deux étapes : analyse des échantillons au moyen de méthodes PCR (réaction en chaîne de la polymérase) et confirmation des résultats présumés positifs au moyen de méthodes d'isolement, de purification et d'identification. Pour la détection de *Campylobacter* spp., nous avons utilisé une méthode de mise en culture non combinée à une méthode de dépistage par PCR. Le dénombrement d'*E. coli* génériques a été effectué par la méthode du nombre le plus probable (NPP) ou par ensemencement direct.

Lorsque des pathogènes ont été détectés, les isolats ont été caractérisés par électrophorèse en champ pulsé (ECP), c'est-à-dire par typage génétique, au Centre d'électrophorèse en champ pulsé de l'ACIA. Le sérotypage de *Salmonella* spp. a été effectué au laboratoire de typage de *Salmonella* du Laboratoire de lutte contre les zoonoses d'origine alimentaire de l'Agence de santé publique du Canada (ASPC), à Guelph, en Ontario.

2.6 Lignes directrices pour l'évaluation des échantillons

Les critères d'évaluation utilisés lors de cette étude (tableaux 3 et 4) sont basés sur les principes des *Normes et lignes directrices de la direction générale des produits de santé et aliments sur l'innocuité microbiologique des aliments* (20) et méthodes associées publiées dans le Compendium des méthodes de Santé Canada (19).

Les échantillons présentant des résultats insatisfaisants ont donné lieu à des mesures de suivi, tel que : un échantillonnage dirigé de suivi, l'inspection de l'établissement, l'évaluation des risques pour la santé et/ou la prise de mesures applicables au produit (ex. rappel).

Les échantillons ayant obtenu des résultats sujets à enquête ont donné lieu à certaines mesures de suivi, comme par exemple une analyse plus poussée (détermination du nombre d'*E. coli* génériques présent dans les échantillons en question) ou la collecte de données pour contribuer à la conception des programmes.

Tableau 3. Lignes directrices pour l'évaluation de la présence de bactéries pathogènes dans les fines herbes fraîches

Analyse microbiologique* (numéro d'identification de la méthode)	Critères d'évaluation	
	Résultat satisfaisant	Résultat insatisfaisant
<i>E. coli</i> O157:H7/NM (MFLP-30 avec suppléments 1 et 2; MFLP-80)	Absence dans 25 g	Présence dans 25 g
<i>Salmonella</i> spp.** (MFLP-29 modifiée; MFHPB-20)	Absence dans 25 g	Présence dans 25 g
<i>Shigella</i> spp. ** (MFLP-26; MFLP-25)	Absence dans 25 g	Présence dans 25 g
<i>Campylobacter</i> spp. ** (MFLP-46 modifiée)	Absence dans 25 g	Présence dans 25 g

* *Compendium de méthodes pour l'analyse microbiologique des aliments* (19).

**Aucun critère n'a été établi par Santé Canada à ce jour quant à la présence de ces bactéries pathogènes dans les fruits et les légumes frais. Cependant, en l'absence de critères précis, la présence de ces bactéries dans les aliments est considérée comme une violation de l'alinéa 4(1)a) de la LAD et l'ACIA considère que le résultat d'évaluation est insatisfaisant.

Tableau 4. Lignes directrices pour l'évaluation de la présence d'*E. coli* génériques dans les fines herbes fraîches

Analyse microbiologique* (numéro d'identification de la méthode)	Critères d'évaluation		
	Résultat satisfaisant	Résultat sujet à enquête	Résultat insatisfaisant
<i>E. coli</i> générique (MFHPB-19; MFHPB-27)**	≤ 100	100 < x ≤ 1 000	> 1 000

* *Compendium de méthodes pour l'analyse microbiologique des aliments* (19).

** L'unité de concentration est fonction de la méthode utilisée. Pour la méthode MFHPB-19 : NPP/g; pour la méthode MFHPB-27 : UFC/g.

2.7 Limites de l'étude

Les échantillons analysés durant la présente étude ont été prélevés dans des commerces de détail de tout le Canada, contrairement aux échantillons de surveillance qui sont prélevés aux points de distribution et dans les entrepôts. Ainsi, les produits échantillonnés dans les commerces de détail peuvent être mélangés et provenir d'envois et/ou de fournisseurs différents. Si la présente étude reflète l'expérience des consommateurs canadiens, elle comporte néanmoins certaines limites en ce qui a trait à la traçabilité des produits et à l'identification de la source de contamination dans les cas de résultats positifs.

Les résultats obtenus pour un échantillon dans le cadre d'une étude ciblée proviennent de l'analyse d'une seule unité d'échantillonnage. Cette stratégie d'échantillonnage et d'analyse empêche l'extrapolation des résultats de laboratoire au lot de production dans son ensemble, puisqu'ils ne sont pas statistiquement représentatifs du lot. Elle comporte également certaines limites dans l'interprétation des résultats en l'absence de renseignements additionnels.

Les raisons possibles de la contamination ne peuvent être élucidées à partir d'un seul point d'échantillonnage (c'est-à-dire dans les commerces de détail seulement). Ainsi, on ne peut pas dire s'il y a eu une faille dans les BPA (c'est-à-dire avant ou durant la récolte) ou dans les BPF (c'est-à-dire pendant que l'aliment est lavé, emballé et livré sur le marché) ou, encore, si une contamination croisée est survenue pendant le transport, l'entreposage ou dans le magasin de détail où l'échantillon a été prélevé.

Enfin, étant donné la variabilité saisonnière et la diversité des circuits commerciaux, la source des produits peut changer d'une manière considérable d'une saison à une autre. Ainsi, le nombre d'échantillons prélevés durant cette étude n'est pas suffisant pour permettre l'analyse détaillée des résultats selon le pays d'origine. En cas de résultats positifs, les taux insatisfaisants obtenus par les divers pays ne sont pas considérés comme étant statistiquement comparables.

3 Résultats

Sur les 1 646 échantillons de fines herbes fraîches analysés, 98,8 % d'entre eux étaient satisfaisants (tableau 5). Les bactéries *E. coli* O157 (H7 et NM) et *Shigella* spp. n'ont été détectées dans aucun des échantillons de fines herbes fraîches prélevés dans le cadre de la présente étude. De plus, aucune espèce de *Campylobacter* n'a été détectée dans les 1 139 échantillons de fines herbes produites selon une méthode classique ayant également été soumis à une recherche de ce pathogène. Six échantillons (0,4 %) ont obtenu des résultats d'évaluation insatisfaisants; cinq d'entre eux étaient de sources étrangères. Enfin, treize échantillons ont présenté des résultats sujets à enquête; neuf d'entre eux étaient de sources canadiennes.

Tableau 5. Sommaire des résultats sur les échantillons de fines herbes fraîches

Origine du produit	Méthode de production	Nombre d'échantillons	Évaluation					
			Résultat sujet à enquête		Résultat satisfaisant		Résultat insatisfaisant	
			Nombre d'échantillons	Pourcentage des échantillons	Nombre d'échantillons	Pourcentage des échantillons	Nombre d'échantillons	Pourcentage des échantillons
Étranger	Classique	777	2	0,3	5	0,6	770	99,1
	Biologique	330	2	0,6	0	0	328	99,4
	Sous-total	1 107	4	0,4	5	0,5	1 098	99,2
Canada	Classique	362	4	1,1	0	0	358	98,9
	Biologique	177	5	2,8	1	0,6	171	96,6
	Sous-total	539	9	1,7	1	0,2	529	98,1
Total		1 646	13	0,8	6	0,4	1 627	98,8

Parmi les six échantillons ayant obtenu des résultats insatisfaisants (tableau 6), deux étaient positifs pour *Salmonella* spp. et quatre présentaient des nombres élevés d'*E. coli* génériques (> 1 000 UFC/g). *Salmonella* Weltevreden var.15+(15:r:z6) et *Salmonella* IIIb:60:r:z53 ont été identifiées à partir d'isolats d'échantillons positifs pour *Salmonella*.

Les échantillons ayant obtenu des résultats insatisfaisants provenaient des États-Unis (deux échantillons), de la République dominicaine (deux échantillons), du Mexique (un échantillon) et du Canada (un échantillon). En outre, les résultats insatisfaisants touchaient quatre variétés de fines herbes : le basilic (deux échantillons), le persil (deux échantillons), le romarin (un échantillon) et la sauge (un échantillon).

Des nombres élevés (100-1 000 UFC/g) d'*E. coli* génériques ont été trouvés dans un total de 13 échantillons (0,8 %) et ont été considérés comme des résultats sujets à enquête étant

donné qu'ils se situaient en deçà de la limite de 1 000 UFC/g (tableau 7). Ces échantillons étaient de sources canadiennes et de sources étrangères.

Tableau 6. Sommaire des échantillons associés à des résultats insatisfaisants

Origine du produit	Type de produit/méthode de production/pays d'origine	Justification des résultats d'évaluation insatisfaisants
Étranger	Basilic thaï/classique /États-Unis	<i>Salmonella</i> Weltevreden var.15+(15:r:z6)
	Persil/classique/États-Unis	<i>Salmonella</i> IIIb:60:r:z53
	Sauge/classique/République dominicaine	<i>E. coli</i> générique : 1 300 UFC/g
	Romarin/classique/République dominicaine	<i>E. coli</i> générique : 1 800 UFC/g
	Basilic/classique/Mexique	<i>E. coli</i> générique : > 1 000 UFC/g
Canada	Persil/biologique/Canada	<i>E. coli</i> générique : 1 400 UFC/g

Tableau 7. Sommaire des échantillons présentant des résultats sujets à enquête

Origine du produit	Type de produit/méthode de production/pays d'origine	Nombre d'<i>E. coli</i> génériques (UFC/g)
Étranger	Romarin/classique/États-Unis	690
	Persil/classique/États-Unis	340
	Menthe/biologique/Mexique	180
	Basilic/biologique/États-Unis	130
Canada	Menthe/classique/Canada	830
	Menthe/classique/Canada	710
	Coriandre/classique/Canada	170
	Ciboulette/classique/Canada	110
	Menthe/biologique/Canada	200
	Menthe/biologique/Canada	110
	Basilic/biologique/Canada	200
	Coriandre/biologique/Canada	180
	Coriandre/biologique/Canada	170

4 Discussion et conclusion

À la lumière de la présente étude (2010/2011), il a été déterminé que 98,8 % des échantillons étaient négatifs pour les pathogènes recherchés et présentaient des nombres acceptables d'*E. coli* génériques. Aucun des 1 646 échantillons de fines herbes analysés ne présentait de bactéries pathogènes *E. coli* O157 H7/NM et *Shigella*, et aucun des 1 139 échantillons de fines herbes produites selon une méthode classique ne présentait de bactéries *Campylobacter*. Cependant, nous avons obtenu des résultats insatisfaisants pour deux échantillons où *Salmonella* était présente et pour quatre échantillons qui présentaient des nombres élevés d'*E. coli* génériques (>1 000 UFC/g). Treize échantillons présentaient des nombres d'*E. coli* génériques relativement élevés (> 100 UFC/g) mais au-dessous du seuil d'insatisfaction ($\leq 1\ 000$ UFC/g) et ont été évalués comme sujets à enquête.

Pour donner suite aux résultats insatisfaisants, l'ACIA a effectué les enquêtes de salubrité des aliments appropriées, y compris une évaluation des risques pour la santé, un échantillonnage dirigé, un examen des procédures à l'importation, etc. Deux rappels de produits ont été effectués à la suite de ces enquêtes. Il importe de souligner qu'aucun cas de maladies n'a été déclaré en lien avec la consommation de l'un ou l'autre des produits contaminés par *Salmonella* durant la présente étude. Enfin, après une évaluation ultérieure des résultats sujets à enquête, aucune autre mesure n'a été jugée nécessaire.

Les échantillons utilisés dans le cadre de la présente étude ont été prélevés dans des commerces de détail. Leur contamination peut avoir eu lieu dans un certain nombre d'endroits le long de la chaîne de production alimentaire. Il peut y avoir eu des failles dans les bonnes pratiques agricoles (BPA) (contamination survenue avant et durant la récolte) ou dans les bonnes pratiques de fabrication (BPF) (contamination survenue pendant que l'aliment est manipulé, emballé, transporté et livré sur le marché). Une contamination peut aussi survenir dans le magasin où a eu lieu le prélèvement des échantillons.

Les constatations générales faites durant la présente étude donnent à penser que la vaste majorité des fines herbes fraîches vendues sur le marché canadien sont produites et manipulées selon des BPA/BPF acceptables. Cependant, une contamination par *Salmonella* peut toucher des fines herbes fraîches de sources canadiennes et importées, ce qui représente un risque pour la salubrité des aliments. Les fines herbes fraîches peuvent également être contaminées par *E. coli* générique. Bien que les souches d'*E. coli* génériques ne causent pas de maladie, leur présence est utilisée par l'ACIA comme indicateur de l'introduction possible de microorganismes pathogènes durant la production, la transformation et la commercialisation des denrées.

Tandis que les secteurs de l'industrie alimentaire et du détail au Canada sont responsables en définitive des aliments qu'ils produisent et qu'ils vendent, et que les consommateurs

sont responsables de la manipulation sécuritaire des aliments qu'ils ont en leur possession, l'ACIA réglemente l'industrie, assure une surveillance et fait la promotion d'une manipulation sécuritaire des aliments tout au long de la chaîne de production alimentaire. Les activités de surveillance se poursuivront et l'ACIA informera les intervenants de ses constatations.

5 Références

1. Gouvernement du Canada. *Plan d'action pour assurer la sécurité des produits alimentaires et de consommation* [en ligne]. Septembre 2012 (consulté en octobre 2012), <http://www.tbs-sct.gc.ca/hidb-bdih/initiative-fra.aspx?Hi=85>
2. Agence canadienne d'inspection des aliments. *Plan d'action pour assurer la salubrité des aliments* [en ligne]. Juin 2012 (consulté en octobre 2012), <http://www.inspection.gc.ca/food/consumer-centre/industry-s-role/food-safety-action-plan/eng/1335455338583/1335455420137>
3. Agence canadienne d'inspection des aliments. *Rapport sommaire du comité des sciences sur la salubrité des aliments 2008* [en ligne]. 2008 (consulté en octobre 2012), <http://merlin.cfia-acia.inspection.gc.ca/francais/fssa/invenq/guidocf.asp#refman5>
4. Comité du Codex sur l'hygiène alimentaire. *Code d'usages en matière d'hygiène pour les fruits et légumes frais (CAC/RCP 53-2003)*. [en ligne]. 2011 (consulté en 2011), http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10200/CXP_053f.pdf
5. Comité du Codex sur l'hygiène alimentaire. *Code d'usages international recommandé – Principes généraux d'hygiène alimentaire (CAC/RCP 1-1969)* [en ligne]. 2011 (consulté en 2011), http://www.codexalimentarius.net/download/standards/23/cxp_001f.pdf
6. Ministère de la Justice du Canada. *Loi sur les aliments et drogues* [en ligne]. Juin 2008 (consulté en octobre 2012), <http://laws-lois.justice.gc.ca/fra/lois/F-27/>
7. Ministère de la Justice du Canada. *Règlement sur les aliments et drogues* [en ligne]. Août 2012 (consulté en octobre 2012), http://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/C.R.C.%2C_ch._870/index.html
8. Ministère de la Justice du Canada. *Règlement sur les fruits et les légumes frais* [en ligne]. Septembre 2011 (consulté en octobre 2012), http://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/C.R.C.%2C_ch._285/index.html
9. Ministère de la Justice du Canada. *Loi sur les produits agricoles au Canada* [en ligne]. Décembre 2005 (consulté en octobre 2012), <http://laws-lois.justice.gc.ca/fra/lois/C-0.4/>
10. Ministère de la Justice du Canada. *Règlement sur les produits biologiques, 2009* [en ligne]. Mars 2013 (consulté en mars 2013), <http://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/DORS-2009-176/>
11. Elviss NC, Little CL, Hucklesby L *et al.* Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *Int J Food Microbiol* 2009;**134**(1-2):83-8.

12. Pezzoli L, Elson R, Little CL *et al.* Packed with Salmonella--investigation of an international outbreak of Salmonella Senftenberg infection linked to contamination of prepacked basil in 2007. *Foodborne Pathog Dis* 2008;**5**(5):661-8.
13. Pakalniskiene J, Falkenhorst G, Lisby M *et al.* A foodborne outbreak of enterotoxigenic E. coli and Salmonella Anatum infection after a high-school dinner in Denmark, novembre 2006. *Epidemiol Infect* 2009;**137**(3):396-401.
14. OMS/FAO. *Microbiological Risk Assessment Series 14: Microbiological Hazards in Fresh Leafy Vegetables and Herbs* [en ligne]. 2011 (consulté en 2011), http://www.fao.org/ag/agn/agns/jemra/Jemra_Report%20on%20fresh%20leafy%20vegetables%20and%20herbs.pdf
- 15 Food and Drug Administration (FDA). *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. 2^e édition. 2012, <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/default.htm>
- 16 Kozak G.K., MacDonald D., Landry L., Farber J.M. Foodborne Outbreaks in Canada Linked to Produce: 2001 through 2009. *J Food Protection*, 2013; 76(1):173-183.
- 17 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Ongoing multistate outbreak of Escherichia coli serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach--United States, septembre 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006;**55**(38):1045-6.
- 18 Forsythe, S.J. *The Microbiology of Safe Food*. 2^e édition. Blackwell Publishing Ltd., 2011.
19. Santé Canada. *Compendium de méthodes* [en ligne]. Avril 2011 (consulté en octobre 2012), <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index-fra.php>
20. Santé Canada. *Normes et lignes directrices de la direction générale des produits de santé et des aliments (DGPSA) sur l'innocuité microbiologique des aliments - sommaire explicatif [online]*. 2008. Consulté en Octobre 2012, <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume1-fra.php>

Annexe A : Acronymes

ACIA : Agence canadienne d'inspection des aliments

ASPC : Agence de la santé publique du Canada

BPA : Bonnes pratiques agricoles

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

CDC : Centres for Disease Control and Prevention

CSSA : Comité scientifique de la salubrité des aliments

DGPS/MFHPB : Direction générale de la protection de la santé/Microbiology Food Health Protection Branch

E. coli : *Escherichia coli*

ECP : électrophorèse en champ pulsé

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

g : gramme

LAD : *Loi sur les aliments et drogues*

MFLP : Procédures de laboratoire concernant l'analyse microbiologique des aliments

NM : non mobile

NPP : nombre le plus probable

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAASPA : Plan d'action pour assurer la sécurité des produits alimentaires

PAASPAC : Plan d'action pour assurer la sécurité des produits alimentaires et de consommation

PCR : réaction en chaîne de la polymérase

RAD : *Règlement sur les aliments et drogues*

SC : Santé Canada

spp. : espèces

UFC/g : unité formatrice de colonies par gramme

Annexe B : Éclosions mondiales de maladies d'origine alimentaire associées à des fines herbes fraîches contaminées par des bactéries pathogènes (1997-2010)*

Numéro de cas	Année	Produit	Microorganisme	Pays	Nombre de cas	Source
1	1998	Persil	Organismes multiples	Pays multiples	1 126	J Food Protection 2003, 66(4):535-541
2	1998	Persil	<i>Shigella boydii</i>	Massachusetts, É.-U.	6	Journal of Food Protection 2003, 66(4):535-541; JFP, 68 (3):521-527
3	1998	Persil	<i>Shigella boydii</i>	Florida, É.-U.	37	Journal of Food Protection, 2003, 66(4):535-541; JFP 68, (3):521-527
4	1998	Persil	<i>Shigella sonnei</i>	Alberta, Canada	4	Journal of Food Protection 2003, 66(4):535-541
5	1998	Persil	<i>Shigella sonnei</i>	Ontario, Canada	35	Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) (rapport hebdomadaire de morbidité et de mortalité), 1998, 48(14):285-9
6	1998	Persil	<i>Shigella sonnei</i>	Colombie-Britannique, Canada	13	Relevé des maladies transmissibles au Canada, 1999, vol. 25
7	1998	Persil	<i>Shigella sonnei</i>	Californie, É.-U.	9	J Food Protection 2003, 66(4):535-541
8	1998	Persil	<i>E. coli</i> O6:H16	Minnesota, É.-U.	42	Emerging Infectious Diseases (maladies infectieuses émergentes), 2004, 10(3); Journal of Food Protection, 2003, 66(4):535-541
9	1998	Persil	<i>E. coli</i> entérotoxigène	Minnesota, É.-U.	35	J Food Protection 2003; 66(4):535-541
10	1999	Coriandre	<i>Salmonella</i> Thompson	Californie, É.-U.	35	CDC

Numéro de cas	Année	Produit	Microorganisme	Pays	Nombre de cas	Source
11	1999	Basilic	<i>Shigella sonnei</i>	États multiples, É.-U.	10	CDC
12	2000	Basilic	<i>E. coli</i> O169:H41	Washington, É.-U.	100	Emerging Infectious Diseases (maladies infectieuses émergentes), vol. 10; n° 3, 2004
13	2001	Coriandre	<i>Salmonella</i> Newport	Californie, É.-U.	8	CDC
14	2002	Coriandre	<i>Salmonella</i> Newport	Colorado, É.-U.	13	CDC
15	2005	Persil	<i>E. coli</i> O157:H7	Oregon, É.-U.	18	ProMed, 25 oct. 2005; FSNet, 31 oct. 2005
16	2005	Persil	<i>E. coli</i> O157:H7	Washington, É.-U.	4	CDC, 2005
17	2005	Persil	<i>E. coli</i> O157:H7	Washington, É.-U.	2	CDC, 2005
18	2006	Basilic	<i>E. coli</i> entérohémorragique	Danemark	250	Autorité européenne de sécurité des aliments
19	2007	Basilic	<i>Salmonella</i> Senftenberg	Royaume-Uni	32	Foodborne Pathogens and Disease (pathogènes et maladies d'origine alimentaire), vol. 5, n° 5
20	2007	Basilic	<i>Salmonella</i> Senftenberg	États multiples, É.-U.	11	CDC, 2007
21	2009	Persil	<i>E. coli</i> O157	Australie-Méridionale	31	Rapport trimestriel d'OzFoodNet, 2009 : oct.-déc.

* L'auteur souhaite remercier Judy D. Greig, Laboratoire de lutte contre les zoonoses d'origine alimentaire, ASPC (Agence de la santé publique du Canada) pour l'information fournie. Les données présentées ont été tirées de plusieurs sources d'information, y compris des revues à comité de lecture, des journaux, des communiqués, des unités sanitaires, des laboratoires nationaux et des sites Web gouvernementaux.

Annexe C : Sommaire des éclosions mondiales de maladies d'origine alimentaire associées à des fines herbes fraîches contaminées par des bactéries pathogènes (1997-2010)

Bactérie pathogène	Éclosions	
	Nombre d'éclosions	Pourcentage d'éclosions
<i>E. coli</i> pathogène	8	38,1
<i>Salmonella</i> spp.	5	23,8
<i>Shigella</i> spp.	7	33,3
Bactéries pathogènes multiples	1	4,8
Total	21	100

* Résumé tiré de l'annexe B.

Annexe D : Méthodes d'analyse microbiologique

Bactérie	Numéro d'identification de la méthode (date de publication)*	Titre de la méthode
<i>E. coli</i> O157:H7/NM	MFLP-30 (mai 2003, supplément 1 : mai 2005; supplément 2 : novembre 2006)	Méthode du système Qualicon Bax® de Dupont pour la détection d' <i>E. coli</i> O157:H7 dans le bœuf cru et les jus de fruits
	MFLP-80 (mars 2008)	Isolement d' <i>E. coli</i> O157:H7 ou NM dans les aliments
<i>Salmonella</i> spp.	MFLP-29** (juillet 2007, modifiée)	Méthode du système Qualicon Bax® pour la détection de <i>Salmonella</i> dans une variété d'aliments et des échantillons du milieu
	MFHPB-20 (mars 2009)	Méthodes pour l'isolement et l'identification des salmonelles dans les aliments et les échantillons environnementaux
<i>Shigella</i> spp.	MFLP-26 (février 2006)	Détection des <i>Shigella</i> spp. dans les aliments par méthode d'amplification en chaîne par polymérase (ACP)
	MFLP-25 (mars 2006)	Détection et identification des <i>Shigella</i> spp. dans les aliments
<i>Campylobacter</i> spp.	MFLP-46*** (mars 2002, modifiée)	Isolement de <i>Campylobacter</i> thermophile des aliments
<i>E. coli</i> générique	MFHPB-19 (avril 2002)	Dénombrement des coliformes, des coliformes fécaux et des <i>Escherichia coli</i> dans les aliments au moyen de la méthode du NPP
	MFHPB-27 (septembre 1997)	Dénombrement des <i>Escherichia coli</i> dans les aliments par ensemencement direct (ED)

* *Compendium de méthodes pour l'analyse microbiologique des aliments* (19)..

** La méthode MFLP-29 a été utilisée de la manière décrite par écrit avec la modification suivante : un enrichissement secondaire de la manière décrite pour les cantaloups (transférer d'un bouillon d'eau peptonée tamponnée, tel que prescrit, à des bouillons RVS et TBG [bouillon Rappaport-Vassiliadis Soya et bouillon au tétrathionate et au vert brillant] et incuber pendant 24 ± 2 h à 42,5 °C). Après l'incubation, combiner 2 mL de chaque bouillon RVS et TBG en un échantillon et passer à l'étape 7.3.1.4 de la méthode.

*** La méthode MFLP-46 a été utilisée de la manière décrite par écrit avec la modification suivante : ajouter 25 g de chaque échantillon dans un sac Stomacher avec filtre et faire digérer avec 50 mL d'eau peptonée pendant 2 min à 200 tr/min. Retirer 25 mL de surnageant et ajouter 100 mL d'un bouillon d'enrichissement Park et Sanders, lequel comprend de 100 mL de bouillon pour Brucella, 0,5 mL de supplément A par 100 mL de bouillon, 0,5 mL de supplément B par 100 mL de bouillon et 5 mL de sang par 100 mL de bouillon. Incuber ensuite l'échantillon en microaérophilie dans un incubateur trois gaz (5 % d'O₂, 10 % de CO₂, 85 % de N₂) à 37 °C pendant 3 à 4 heures, puis transférer dans un incubateur à 42 °C et incuber en microaérophilie (comme il est indiqué précédemment) pendant 24 et 48 heures. Après l'incubation, étaler le bouillon d'enrichissement de la manière décrite à la section 6.3 de la méthode MFLP-46.