

## Détection de la contamination microbienne dans un substitut de repas liquide aromatisé à base de soja à l'aide du système Innovate™

### Introduction

Le traitement aseptique est une méthode largement utilisée dans les applications pour l'alimentaire et les boissons. Il utilise des températures très élevées pour optimiser la stérilité des produits de longue durée de conservation. Cependant, une contamination reste toujours possible pendant les phases de fabrication et de production.

Pour minimiser les risques, il est essentiel de tester si le produit final est contaminé par des micro-organismes. Le système de détection microbienne rapide Innovate™ est conçu pour l'identification rapide de micro-organismes dans une gamme de produits. Afin de détecter de très faibles niveaux de contaminants dans ces types de produits, une étape d'enrichissement est nécessaire pour s'assurer qu'une quantité suffisante d'ATP est présente pour la détection. En règle générale, un produit est incubé dans son propre emballage pour enrichir la quantité d'ATP dans toutes les cellules microbiennes contaminantes. Des bases préétablies obtenues à partir de produits non contaminés sont utilisées pour déterminer si un résultat est positif.

### Objectif

L'objectif de cette étude était de valider le système Innovate à l'aide du kit RapiScreen™ Dairy pour la détection de la croissance de micro-organismes dans un substitut de repas liquide aromatisé à base de soja afin de démontrer l'équivalence avec les techniques d'étalement traditionnelles.

### Équipements, fournitures et réactifs

- Anses d'inoculation stériles
- Pipettes et embouts stériles
- Incubateurs calibrés pour une température de 35 + 2 °C
- Lingettes imbibées d'alcool
- Kit RapiScreen Dairy (comprend des réactifs, des flacons en polypropylène (PP) et des plaques microtitres)
- Plaques de gélose de Sabouraud dextrose (SDA)
- Bouillon de dextrose de pomme de terre (PDB)
- Plaques de gélose triptyque soja (TSA)
- Bouillon triptyque soja (TSB)
- pH-mètre et électrodes (c.-à-d. capteurs Mettler-Toledo InLab®)
- Système à sachets de production de gaz anaérobie GasPak™ EZ avec indicateur
- Seringues, 1 ml et 3 ml
- Solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco – DPBS (1X)
- Liquide de Ringer
- Shoe Goo, colle transparente pour réparation de chaussures et revêtement protecteur
- 16 aiguilles PrecisionGlide, calibre 1 ½ po
- Contrôle positif ATP
- Instrument du système Innovate

### Organismes et produits à l'essai

- Micro-organismes testés
  - *Cronobacter sakazakii*, ATCC# 29544
  - Endospores *Bacillus cereus*, ATCC# 11778
  - *Clostridium sporogenes* (forme végétative), ATCC# 7955 (PA 3679)
  - *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC# 9027
  - *Pseudomonas putida*, ATCC# 49128
  - *Staphylococcus aureus*, ATCC# 6538
- Types de produits laitiers testés
  - Substitut de repas liquide à base de soja, aromatisé

## Méthodes

### 1. Préparation des cultures

Pour *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, des suspensions cellulaires Quanti-Cult Plus™ ont été achetées et utilisées pour les tests. *Clostridium sporogenes* (forme végétative) et *Pseudomonas putida* ont été préparées à l'aide de cultures Culti-Loop® (préparées par Thermo Fisher Scientific et fournies par un laboratoire tiers). La réhydratation et l'inoculation de tous les micro-organismes ont été réalisées conformément aux instructions du fabricant.

*Pseudomonas putida* et *Clostridium sporogenes* ont été préparées en inoculant un Culti-Loop de charbon actif dans 5 ml de TSB. Les bouillons ont ensuite été incubés à 37 °C pendant 24 heures. Un ensemble de dilutions en série au dixième a ensuite été réalisé à l'aide du liquide de Ringer et des numérations sur plaque ont été préparées sur des plaques de TSA pour trouver une concentration <100 UFC. Un système GasPak a été utilisé pour les plaques de *Clostridium sporogenes* (forme végétative) lors de l'incubation pour assurer la croissance. L'inoculum réel pour tous les micro-organismes utilisés pendant le dopage de l'échantillon a été déterminé en plaçant chaque organisme en double exemplaire sur des plaques de TSA. Les plaques ont été incubées à 35 ± 2 °C et comptées après 24 heures.

La suspension d'endospores *Bacille cereus* a été préparée en ajoutant un culot EZ-Spore™ à 10 ml de DPBS (1X) pour obtenir une concentration de 10<sup>3</sup> UFC/ml. Cette suspension de culot bactérien a été incubée à 37 °C pendant 30 minutes puis mélangée soigneusement pour obtenir une solution homogène. La suspension de *B. cereus* est ensuite chauffée à 80 °C dans un bain-marie pendant 30 minutes. L'échantillon a été dilué en série au dixième dans de la DPBS (1X) stérile et des numérations sur plaque ont été préparées sur des plaques de TSA pour trouver une concentration <100 UFC. La plaque a été incubée à 37 °C pendant 24 heures.

### 2. Évaluations du pH

Les produits dont le pH a été évalué ont été mesurés en triple exemplaire pour assurer l'exactitude des mesures. Le pH-mètre utilisé pour la mesure des produits a été étalonné avant utilisation. Cela a démontré qu'aucun test supplémentaire n'était nécessaire pour confirmer que le kit RapiScreen Dairy était capable de neutraliser suffisamment les produits.

### 3. Détermination des URL de fond et de base

Pour déterminer les niveaux de base d'ATP, chaque produit a été initialement incubé pendant 24 heures à 37 °C. Les échantillons ont été soigneusement mélangés et 20 ml de chaque produit ont été transférés dans un récipient stérile pour l'évaluation du pH et les tests de fond/base.

Le niveau d'ATP de fond de chaque produit a été déterminé en exécutant un test utilisant une solution tampon d'ATX plutôt qu'un réactif ATX reconstitué. Le test a ensuite été répété en utilisant de l'ATX reconstitué pour permettre la déplétion du signal ATP de fond. Ces résultats sont appelés « valeurs URL de base ». Les valeurs URL de base doivent être faibles et constantes pour démontrer que la déplétion du signal URL de fond est complète. Une valeur URL de base stable permet de définir une valeur seuil limite (positive/négative) pour identifier les échantillons contaminés.

- Protocole de base : Verser 60 µL d'ATX – agiter pendant 10 minutes – suivre les instructions de RapiScreen Dairy pour la détection
- Protocole de fond : Verser 60 µL de tampon ATX – agiter pendant 10 min – suivre les instructions de RapiScreen Dairy pour la détection

Une fois les bases établies et les cultures préparées, chaque type de produit a été inoculé en double exemplaire avec <100 UFC par récipient. Les micro-organismes ont été dopés à l'aide d'une seringue à travers le haut du récipient ensuite scellé avec de la colle Shoe Goo. Un récipient non inoculé a été incubé avec chaque ensemble

inoculé en tant que contrôle négatif. Des contrôles positifs ont été mis en place en inoculant du TSB ou du PDB avec 100 µl de la culture <100 UFC.

Les échantillons ont été incubés à 35 ± 2 °C pendant un maximum de sept jours. Les jours 1 à 7, des aliquotes ont été prélevées dans chaque récipient et testées avec le système Innovate à l'aide du kit RapiScreen Dairy. En parallèle, 50 µL de chaque échantillon de produit ont été inoculés sur des plaques de TSA et incubés pendant 24 heures à 35 ± 2 °C pour confirmer la croissance et la morphologie. Des sachets de production de gaz anaérobie GasPak EZ ont été utilisés pour incuber des plaques de confirmation marquées avec des *C. sporogenes* afin de permettre à l'organisme de se développer efficacement s'il est présent. La croissance observée sur les plaques de confirmation correspondait à la morphologie du micro-organisme utilisé pour le dopage.

**Résultats**

Pour le produit initial non inoculé, les tests n'ont démontré aucune propriété inhabituelle susceptible d'interférer avec l'étude (voir le tableau 1, a, b et c). Le pH du produit était neutre comme prévu pour ces boissons et aucune croissance n'a été observée lors de l'étalement des échantillons. De plus, l'échantillon de fond était faible (395) et constant dans 32 tests individuels (gamme de 357 à 481 URL). Lorsque les tests de base ont été effectués, les résultats des URL étaient encore plus bas et, encore une fois, constants avec une moyenne de 11 URL. En conséquence, le seuil a été fixé à 32.

Dans les tests de produits dopés, *C. sakazakii*, *P. aeruginosa* et *P. putida* ont toutes été détectées avec le système Innovate dans les 24 heures suivant le dopage (tableaux 2 et 3). *B. cereus*, *C. sporogenes* et *S. aureus* ont été détectées après 48 heures. Les valeurs URL n'ont été recueillies que pour les jours 1 à 4 pour *C. sakazakii* et *C. sporogenes* en raison de la surcroissance dans ce produit et de la production excessive de gaz provoquant des fuites dans les récipients. Tous les résultats positifs avec le système Innovate ont été confirmés par des stries de produits dans la TSA. Un résumé des résultats est présenté dans le tableau 3.

**Tableau 1.** Évaluations du produit : pH, fond, base et stérilité

a) pH

pH de l'échantillon de produit			
Lecture 1	Lecture 2	Lecture 3	Moyenne
7,13	7,12	7,12	7,12

b) Lectures de fond et de base

Moyennes URL (n=32)		
Fond	Base	Seuil
395	11	32

c) Confirmation de stérilité

Plaques de stérilité	
TSA	SDA
Pas de croissance	Pas de croissance

**Tableau 2.** Détection de la croissance des micro-organismes au fil du temps dans le substitut de repas aromatisé à base de soja

\*Fuite : la production de gaz par l'organisme a provoqué l'éclatement ou des fuites au niveau du récipient du produit.

Produit – Fond : 395 URL		Produit – Base : 11 URL		Seuil : 32 URL						
Panneau des organismes	Inoculum cible	Inoculum réel	Confirmation Résultat des plaques	Jours : Valeur URL (moyenne)						
	Cellules ou *spores (UFC)	Cellules ou *spores (UFC)		1	2	3	4	5	6	7
Endospores <i>Bacille cereus</i>	<100	28	Croissance	10	70	33 144	1 068	2 489	2 782	1 460
<i>Clostridium sporogenes</i> (forme végétative)	<100	20	Croissance	18	52 063	89 495	85 773	FUITE	FUITE	FUITE
<i>Cronobacter sakazakii</i>	<100	92	Croissance	39 812	56 762	60 615	14 594	FUITE	FUITE	FUITE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<100	138	Croissance	10 141	2 338	2 590	877	1 555	1 902	1 517
<i>Pseudomonas putida</i>	<100	59	Croissance	1 010	6 842	5 232	317	573	37 263	14 846
<i>Staphylococcus aureus</i>	<100	35	Croissance	9	461	7 056	892	6 821	20 111	9 441
Panneau vide	Inoculum cible	Inoculum réel	Confirmation Résultat des plaques	1	2	3	4	5	6	7
Contrôle négatif	0	0	Pas de croissance	8	12	9	12	8	12	28

**Tableau 3.** Résumé du délai de détection de la croissance des micro-organismes dans le substitut de repas

Délai de détection du produit avec le système Innovate					
<i>B. cereus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>S. aureus</i>
48 heures	48 heures	24 heures	24 heures	24 heures	48 heures

### Conclusions

Le substitut de repas aromatisé à base de soja a été inoculé avec une cible de <100 UFC et incubé à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , avec des lectures effectuées les jours 1 à 7. Les niveaux d'UFC ont été déterminés comme étant 28, 20, 92, 138, 59 et 35 pour les organismes *B. cereus*, *C. sporogenes*, *C. sakazakii*, *P. aeruginosa*, *P. putida* et *S. aureus*, respectivement.

Comme montré dans les tableaux ci-dessus (tableaux 2 et 3), *C. sakazakii*, *P. aeruginosa* et *P. putida* ont toutes été détectées avec le système Innovate dans les 24 heures suivant le dopage. *B. cereus*, *C. sporogenes* et *S. aureus* ont été détectées après 48 heures. Des valeurs URL pour *C. sakazakii* et *C. sporogenes* n'ont pu être obtenues que les jours 1 à 4 en raison de la prolifération du produit et de la production excessive de gaz provoquant une fuite au niveau des récipients du produit. Tous les résultats positifs avec le système Innovate ont été confirmés par des stries de produits dans la TSA.



## Résumé

Le traitement aseptique des produits à base de soja peut aider à réduire le risque de contamination microbienne des produits. Ceci est clairement montré par les faibles valeurs de base pour la détection d'ATP dans les échantillons non inoculés. De plus, les valeurs URL de base étaient constamment stables, permettant l'établissement d'une valeur seuil positive/négative. Le seuil pour ce produit a été fixé à 32 URL. Les valeurs URL supérieures à ce seuil indiquaient un résultat positif.

Le signal de la croissance des cultures de tous les organismes testés dans ce produit a démontré que le rapport signal/bruit n'était pas un problème. Même lorsqu'ils étaient inoculés avec de faibles niveaux de micro-organismes (<100 UFC), les échantillons testés produisaient des URL très élevées en 24 à 48 heures, validant ainsi que le système Innovate serait un outil utile pour détecter la contamination microbienne des substituts de repas aromatisés à base de soja.

Sur la base de ces résultats, Hygiena® recommande d'utiliser le système Innovate pour la détection de faibles niveaux de contamination microbienne dans les substituts de repas à base de soja.