

Détection de *Cronobacter sakazakii* dans des boissons à base de soja à l'aide du système Innovate™ et du kit RapiScreen™ Dairy

Introduction

Cronobacter sakazakii est une bactérie coliforme motile, à Gram négatif, non sporulée, en forme de bâtonnet de la famille *Enterobacteriaceae*, du genre *Cronobacter*. Elle a été impliquée dans des épidémies de maladies néonatales (enfants prématurés), dans des cas isolés de personnes gravement immunodéprimées et dans des maladies chez les personnes âgées, mais elle provoque rarement de maladies chez des adultes en bonne santé. *Cronobacter* peut survivre dans les aliments secs, comme les préparations en poudre pour nourrissons, le lait en poudre, les tisanes et les amidons, même tout au long du processus de dessiccation.

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, y compris le lait et les préparations pour nourrissons. 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 *Cronobacter sakazakii* dans diverses boissons protéinées à base de soja pour 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)
- Gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA)
- Plaques de gélose triptyque soja (TSA)
- Bouillon triptyque soja (TSB)
- pH-mètre et électrodes (c.-à-d. capteurs Mettler-Toledo InLab®)
- Seringues, 1 ml et 3 ml
- Solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco – DPBS (1X)
- 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
 - *Cronobacter sakazakii*, ATCC# 29544
- Types de produits laitiers testés
 - Boisson protéinée à base de soja, chocolat
 - Boisson protéinée à base de soja, vanille
 - Boisson UHT à base de soja, chocolat
 - Boisson UHT à base de soja, vanille

Méthodes

1. Cultures

Les cultures de *Cronobacter sakazakii* ont été préparées en étalant l'organisme lyophilisé sur des plaques de TSA. Les cultures ont été préparées dans du TSB et cultivées pendant 24 heures à 35 ± 1 °C. Un ensemble de dilutions en série au dixième a ensuite été réalisé à l'aide d'une DPBS, et des numérations sur plaque ont été préparées sur des plaques de TSA pour trouver une concentration <100 UFC. L'inoculum réel pour l'organisme utilisé pendant le dopage de l'échantillon a été déterminé en l'étalant en double exemplaire sur des plaques de TSA. Les plaques ont été incubées à 35 ± 2 °C et comptées après 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. L'évaluation du pH et les tests de fond/base à l'aide du kit RapiScreen Dairy ont été effectués.

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 μ L d'ATX – agiter pendant 10 minutes – suivre les instructions de RapiScreen Dairy pour la détection
- Protocole de fond : Verser 60 μ L 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 DPBS avec 100 μ l 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, chaque jour, 10 μ L 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.

Résultats

Dans tous les types de boissons testés, la croissance de faibles niveaux de dopage de *Cronobacter sakazakii* a été détectée après 24 heures d'incubation à l'aide du système Innovate et du kit RapiScreen Dairy (tableau 1). Les valeurs URL variaient de 1 600 à plus de 81 000, démontrant une croissance robuste et une production d'ATP, même en cas de dopage à <100 UFC. Aucune donnée n'a été prise après le 3e jour sur les quatre produits

inoculés en raison d'une fuite de produit résultant d'une formation excessive de gaz. Tous les résultats positifs avec le système Innovate ont été confirmés par des stries de produits dans la TSA. Les contrôles non inoculés avaient des valeurs de base comprises entre 3 et 14 UFC, typiques pour des produits UHT correctement transformés.

Tableau 1. Détection de *Cronobacter sakazakii* dans diverses boissons 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 : s.o.		Produit – Base : s.o.		Seuil : s.o.						
<i>C. sakazakii</i>	Inoculum cible	Inoculum réel	Confirmation Résultat des plaques	Jours : Valeur URL (moyenne)						
	Nb de cellules UFC	Nb de cellules UFC		1	2	3	4	5	6	7
Chocolat à base de soja (CBS)	<100	90	Croissance	4 379	2 861	1 601	Fuite*	Fuite	Fuite	Fuite
Vanille à base de soja (VBS)	<100	90	Croissance	32 269	45 726	8 208	Fuite	Fuite	Fuite	Fuite
Chocolat UHT (CU)	<100	90	Croissance	31 496	31 367	Fuite	Fuite	Fuite	Fuite	Fuite
Vanille UHT (VU)	<100	90	Croissance	65 270	81 627	5 553	Fuite	Fuite	Fuite	Fuite
Panneau vide	Inoculum cible	Inoculum réel	Confirmation Résultat des plaques	1	2	3	4	5	6	7
<i>Contrôle négatif CBS : 35 °C</i>	0	0	Négatif	5	4	4	4	6	4	5
<i>Contrôle négatif VBS : 35 °C</i>	0	0	Négatif	13	11	10	12	12	14	14
<i>Contrôle négatif CU : 35 °C</i>	0	0	Négatif	5	5	3	5	6	4	4
<i>Contrôle négatif VU : 35 °C</i>	0	0	Négatif	12	10	9	8	12	11	11

Conclusions

Comme montré dans le tableau ci-dessus (tableau 1), *C. sakazakii* a été détectée à l'aide du système Innovate et du kit RapiScreen Dairy après 24 h d'incubation dans tous les produits dopés. Comme avec la méthode d'étalement traditionnelle, des résultats positifs ont été obtenus pour tous les échantillons testés, avec la morphologie attendue.

Aucun résultat de croissance au 4^e jour et au-delà n'a été obtenu sur les produits inoculés en raison de la croissance excessive de l'organisme dans tous les produits. Au 3^e jour, tous les récipients de produit étaient gonflés et au 4^e jour, ils ont fui en raison d'une production excessive de gaz, indiquant la croissance d'organismes.

Résumé



Le traitement aseptique des boissons 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. En outre, la contamination de *Cronobacter sakazakii* à de faibles niveaux (<100 UFC par récipient) a pu être détectée à 24 heures à l'aide du système Innovate et du kit RapiScreen Dairy. D'ailleurs, des valeurs URL très élevées de *C. sakazakii* ont été détectées dans le chocolat protéiné à base de soja, la vanille à base de soja, la vanille UHT et le chocolat UHT, validant ainsi que le système Innovate serait un outil utile pour détecter *C. sakazakii* dans tous ces types de produits.

Sur la base de ces résultats, Hygiena® recommande d'utiliser le système Innovate pour la détection de faibles niveaux d'espèces *Cronobacter* dans les produits laitiers UHT.