

Détection de *Cronobacter spp.* à l'aide du système Innovate™ et du kit RapiScreen™ Dairy

Introduction

Les espèces *Cronobacter* sont des bactéries à Gram négatif qui se trouvent naturellement dans l'environnement. *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. Elles sont connues pour provoquer des infections graves et souvent mortelles chez les nourrissons.

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 mytjensii* et de *Cronobacter sakazakii* dans divers produits à base de lait d'avoine 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 30 ou 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®)
- 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)
- 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 mytjensii*, ATCC # 51329
 - *Cronobacter sakazakii*, ATCC# 29544
- Types de produits laitiers testés
 - Lait chocolaté ESL
 - Lait écrémé ESL
 - Lait original ESL
 - Lait Barista UHT
 - Lait chocolaté UHT
 - Lait original UHT



Méthodes

Les cultures de *Cronobacter* ont été préparées en réhydratant les culots ATCC, en les striant sur des plaques de TSA et en les cultivant pendant 24 heures à la température appropriée (30 ± 1 °C et 35 ± 1 °C, respectivement, pour *C. muytjensii* et *C. sakazakii*). Les colonies ont été sélectionnées et une série de dilutions au dixième ont été préparées dans de la DPBS et des numérations sur plaque ont été préparées pour identifier une concentration <100 UFC.

Pour déterminer les niveaux de base d'ATP, chaque produit a été initialement incubé pendant 48 heures à 32 °C. Les échantillons ont été mélangés et 25 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.

Une fois les bases établies et les cultures préparées, chaque type de produit a été inoculé en triple exemplaire avec <100 UFC par récipient (des niveaux de dopage élevés ont également été inoculés à des fins de comparaison). 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 un bouillon triptyque soja. Les échantillons pour *C. muytjensii* ont été incubés à 30 ± 1 °C tandis que les échantillons pour *C. sakazakii* ont été incubés à 35 ± 1 °C pendant deux jours au total. Les jours 1 et 2, des aliquotes ont été prélevées dans chaque récipient et testées avec le système Innovate à l'aide du kit RapiScreen Dairy. En parallèle, 10 µL de chaque échantillon de produit ont été inoculés sur des plaques de TSA et incubés pendant 24 heures pour confirmer la croissance et la morphologie.

Résultats

Dans tous les types de boissons testés, la croissance de niveaux faibles et élevés de dopage des espèces *Cronobacter* a été détectée après 24 heures d'incubation à l'aide du système Innovate et du kit RapiScreen Dairy (tableaux 1 et 2). Les valeurs URL typiques se situaient entre 40 000 et 175 000, démontrant une croissance robuste et une production d'ATP, même en cas de dopage à <100 UFC. Les contrôles non inoculés avaient des valeurs de base comprises entre 6 et 25 UFC, typiques pour des produits UHT et ESL correctement transformés.

En revanche, la détection de *Cronobacter* sur les plaques n'a été observée qu'après 48 heures d'incubation. Il a été confirmé que tous les échantillons positifs avec le système Innovate se sont développés par étalement de culture, même ceux avec de faibles niveaux de dopage (<100 UFC). Même les cultures dopées n'ont été confirmées qu'après 48 heures. Cette méthode standard n'a confirmé la contamination à 24 heures dans aucun type d'échantillon, même si le système Innovate et le kit RapiScreen Dairy auraient pu.

Tableau 1. Détection de *Cronobacter muytjensii* dans divers types de produits à base de lait d'avoine

Détection de <i>C. muytjensii</i> (heures)				
Type de produit	Système Innovate		Étalement	
	Dopage élevé d'UFC	Dopage faible d'UFC	Dopage élevé d'UFC	Dopage faible d'UFC
Lait d'origine ESL	24 h	24 h	48 h	48 h
Lait d'origine UHT	24 h	24 h	48 h	48 h
Lait chocolaté ESL	ND	24 h	ND	48 h
Lait écrémé ESL	ND	24 h	ND	48 h
Lait Barista UHT	ND	24 h	ND	48 h
Lait chocolaté UHT	ND	24 h	ND	48 h
Non inoculé	-	-	-	-

Tableau 2. Détection de *Cronobacter sakazakii* dans divers types de produits à base de lait d'avoine

Détection de <i>C. sakazakii</i> (heures)				
Type de produit	Système Innovate		Étalement	
	Dopage élevé d'UFC	Dopage faible d'UFC	Dopage élevé d'UFC	Dopage faible d'UFC
Lait d'origine ESL	24 h	24 h	48 h	48 h
Lait d'origine UHT	24 h	24 h	48 h	48 h
Lait chocolaté ESL	ND	24 h	ND	48 h
Lait écrémé ESL	ND	24 h	ND	48 h
Lait Barista UHT	ND	24 h	ND	48 h
Lait chocolaté UHT	ND	24 h	ND	48 h
Non inoculé	-	-	-	-

Conclusions

Comme montré dans les tableaux ci-dessus (tableaux 1 et 2), *C. muytjensii* et *C. sakazakii* ont tous deux été détectés à l'aide du système Innovate après 24 h d'incubation dans tous les produits dopés avec les organismes. Comme pour la méthode d'ensemencement traditionnelle, des résultats positifs ont été obtenus après 48 h pour tous les échantillons testés.

Aucun résultat de croissance au 3e jour et au-delà n'a été obtenu en raison de la croissance excessive des deux organismes dans tous les produits. Au 2e jour, tous les contenants de produit étaient gonflés. De ce fait, les contenants ont été éliminés après le 2e jour pour éviter le risque d'éclatement des produits à l'intérieur de l'incubateur. De même, seuls les faibles dopages pour les types de lait chocolaté ESL, écrémé ESL, Barista UHT et chocolaté UHT ont été testés en raison de la croissance rapide des deux organismes dans tous les produits laitiers à base d'avoine.



Résumé

Le traitement aseptique des produits à base de lait d'avoine 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* 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. Ceci est 24 heures plus rapide que la détection à l'aide de méthodes d'étalement standard, confirmant que le système de détection microbienne rapide Innovate surpassait la méthode de référence lorsqu'il était utilisé pour la détection de *Cronobacter*.

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 et ESL.