

# EVALUATION DU SYSTEME PROMICOL POUR TESTER LA STERILITE DES PRODUITS LAITIERS UHT EN COMPARANT LES REACTIFS DE NOUVELLE GENERATION AUX REACTIFS ACTUELS

ACTALIA Cevalait a évalué le système Promicol® pour le contrôle de la stérilité des produits UHT en comparant les réactifs de nouvelle génération aux réactifs utilisés actuellement.

Cette méthode est utilisée pour détecter l'ATP (adénosine triphosphate) dans une large gamme de produits laitiers UHT et longue conservation dont les laits aromatisés, les laits à faible teneur en lactose, les desserts, les laits infantiles et les crèmes. Juste après leur production et incubation pendant 2 ou 3 jours à 30°C, les produits laitiers sont analysés par la méthode Promicol, pour évaluer la croissance bactérienne par extraction et détection de leur ATP.

Le système Promicol® inclut un kit de détection ATP spécifique aux produits laitiers UHT et à longue conservation, le luminomètre PromiLite M4 et le logiciel Proscreen.



## MATERIEL ET METHODES

Lors de cette étude, la méthode Promicol® utilisant les réactifs actuels (kit 1) et les réactifs de nouvelle génération (kit 2) a été comparée à la méthode officielle de détection des produits laitiers non-stériles.

5 types de produits ont été testés :

- lait entier UHT en brique de 1 l ;
- lait demi-écrémé UHT en brique de 1 l ;
- lait chocolaté UHT en brique ou bouteille en verre de 20 cl ;
- crème UHT en brique ou bouteille plastique de 20 cl ;
- dessert à la vanille en pot plastique de 115 g : pour ces produits conservés entre 0 et 6°C, le critère de la méthode officielle n'est pas applicable.

## Méthode officielle

La méthode officielle est décrite dans la directive (EU) 94/71(1994) modifiant la directive 92/46 (1992). Après incubation des produits pendant 15 jours à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , les microorganismes à  $30^\circ\text{C}$  sont dénombrés par inoculation de 0,1 ml dans la gélose « Plate Count Agar » avec du lait écrémé (PCAL) selon la norme ISO 4833-1. Le critère est  $\leq 10$  UFC pour 0,1ml de lait, ce qui correspond à  $< 100$  UFC/ml.

Remarque : ce critère n'est pas applicable aux produits habituellement conservés au réfrigérateur (par exemple les desserts lactés).

Lors de cette étude, le dénombrement a été réalisé dans 2 boîtes inoculées par 0,1 ml.

Pour les desserts et la crème, les boîtes obtenues étaient très opaques et difficiles à lire. Nous avons donc inoculé l'échantillon dans 1 boîte avec 0,1 ml de produit et dans 1 boîte avec 0,1 ml de dilution décimale.

## Méthode Promicol®

Le test Promicol® est réalisé après incubation du produit pendant 2 jours à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  selon la procédure décrite par le fournisseur incluse dans le kit.

Chaque puits d'une microplaque est inoculé avec 50 µl de produit avec un cône sans ATP. Pour les produits épais, comme la crème et les desserts, un cône à pointe large est utilisé. Après inoculation, la microplaque contenant 96 puits est introduite dans le luminomètre Promilite, qui, grâce au logiciel Proscreen Software V4.000, analyse automatiquement les échantillons. Des contrôles sont réalisés dans les premiers puits de chaque microplaque.

Chaque échantillon a été analysé 4 fois par les deux réactifs pour déterminer le coefficient de variation de répétabilité exprimé en pourcentage.

Les résultats sont exprimés en « Relative Light Units » (RLU), avec 3 types d'interprétation selon le tableau 1.

Tableau 1 : Interprétation des résultats

REPONSE	STERILITE DU PRODUIT	VALEUR RLU
Pass	Produit stérile	RLU < 2 x RLU blanc
Retest	Produit à re-tester après une incubation supplémentaire	2 x RLU blanc < RLU < 3 x RLU blanc
Fail	Produit non-stérile	RLU > 3 x RLU blanc

## PROTOCOLE

Tous les échantillons ont été homogénéisés manuellement (environ 25 fois), avant d'être pipetés sous conditions aseptiques directement dans la bouteille ou la brique, ou avec une seringue lorsqu'une incubation supplémentaire était nécessaire. Dans ce cas, le trou laissé par la seringue était recouvert par un film adhésif stérile

## Détermination des valeurs des blancs

20 échantillons de chaque type de produit ont été analysés pour déterminer la valeur des blancs nécessaire à l'interprétation des résultats Promicol® (voir tableau 1) :

- par la méthode Promicol®, après **2 jours** de pré-incubation à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , avec 4 répétitions pour le réactif de nouvelle génération et pour le réactif actuel ;
- par la méthode officielle après **2 et 15 jours** de pré-incubation à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .

La valeur des blancs a donc été obtenue en calculant la moyenne sur 80 résultats.

Pour certains types de produits, plusieurs marques ont été analysées. Dans ce cas, la valeur moyenne a été calculée seulement si des résultats homogènes étaient obtenus ; sinon, cette valeur était calculée pour chaque marque.

## Echantillons contaminés

### Contaminations

5 souches ont été utilisées pour la contamination, une souche par type de produit. Elles sont décrites dans le tableau 2.

Tableau 2 : Souches utilisées pour la contamination

PRODUIT LAITIER	Lait entier UHT	Lait écrémé UHT	Lait chocolaté UHT	Crème UHT	Dessert à la vanille longue conservation
<b>Souche</b>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<b>Numéro interne</b>	14001	98002	00002	99008	14065
<b>Origine</b>	Produit alimentaire	Produit laitier	Lait cru	Lait cru	Lait UHT

Chaque souche a été cultivée dans du bouillon BHI pendant 18 h à sa température optimale. Un volume du bouillon dilué a été utilisé pour obtenir une contamination de 5-10-15 UFC par brique, bouteille ou pot. La contamination a été répétée 2 fois, donnant 6 échantillons contaminés par souche et par produit.

Les échantillons ont été contaminés sous conditions aseptiques, avec un volume de bouillon dilué inoculé à l'aide d'une seringue à travers l'opercule en aluminium, ou directement à travers la brique. Le trou laissé par la seringue a été recouvert par un film adhésif stérile. Le niveau de contamination a été vérifié en inoculant 1 ml de la même dilution que la contamination dans 5 boîtes de PCAL.

## Analyses

6 échantillons de chaque type de produit ont été analysés :

- Par la méthode Promicol® après **2 et 3 jours** de pré-incubation à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , avec 4 répétitions par le réactif de nouvelle génération et par le réactif actuel ;
- Par la méthode officielle après **2, 3 et 15 jours** de pré-incubation à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## RESULTATS

### Détermination des valeurs des blancs

20 échantillons de chaque type de produit ont été analysés 4 fois avec les 2 kits pour déterminer la valeur des blancs (moyenne sur 80 analyses). Les coefficients de variation (CV) pour les 4 répétitions ont été calculés en pourcentage, puis la moyenne de ces valeurs a été déterminée.

Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résultats des échantillons négatifs

PRODUITS LAITIERS	20 laits entiers UHT (3 marques)	20 laits écrémés UHT (4 marques)	20 laits chocolatés UHT (3 marques)	Crèmes UHT 2 marques		20 desserts à la vanille longue conservation (1 marque)
				20 (marque 1)	6 (marque 2)	
<b>KIT1 J2</b> Moyenne en RLU	10	9	7	17	91	18
<b>KIT2 J2</b> Moyenne en RLU	6	7	6	24	76	17
<b>Flore totale</b> J2 J15	neg 2 pos <sup>(1)</sup>	neg neg	neg neg	neg neg	neg neg	neg 10 pos <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Cette contamination est sans doute due à une contamination croisée dans le bain-marie et non à l'échantillon lui-même.

<sup>(2)</sup> de 11 à 30 colonies ont été dénombrées par boîte, mais ces échantillons peuvent être considérés comme négatifs car le critère officiel ( $\leq 10$  UFC dans 0,1 ml) n'est pas applicable à ces produits conservés au réfrigérateur et le nombre de colonies était très faible.

Les valeurs des blancs étaient faibles (6 à 24 RLU), excepté pour la crème 2 (76 et 91 RLU).

Les valeurs de CV étaient élevées (entre 25% et 58%), ce qui peut s'expliquer par des valeurs peu élevées en RLU.

## Echantillons contaminés

### Echantillons contaminés artificiellement

Chaque couple produit/souche a été contaminé 2 fois à 5, 10 et 15 UFC par conditionnement, 6 échantillons par produit ont donc été analysés 4 fois avec les 2 kits (donnant 24 résultats).

Les valeurs réelles de contamination ont été calculées à partir du dénombrement sur les 5 boîtes de PCAL.

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats des échantillons contaminés

PRODUITS LAITIERS	6 laits entiers UHT	6 laits écrémés UHT	6 laits chocolatés UHT	6 crèmes UHT (Marque 2)	6 desserts à la vanille longue conservation
Contamination réelle en UFC/bouteille, brique ou pot	7-14-21 <i>B. cereus</i>	5-10-15 <i>Salmonella</i>	3-6-10 <i>L. mono</i>	8-15-23 <i>E. coli</i>	7-14-20 <i>Candida parapsilosis</i>
KIT1 (n = 24) RLU J2 RLU J3	pos pos	pos pos	pos pos	pos 21 pos/2 retest/1 nég	20 pos/2 retest/2 nég pos
KIT2 (n = 24) RLU J2 RLU J3	pos pos	pos pos	pos pos	23 pos/1 nég 20 pos/3 retest/1 nég	18 pos/6 retest pos
Flore totale (n = 6) J2 J15	pos pos	pos pos	pos pos	pos pos	pos pos

Les valeurs moyennes étaient élevées (entre 200 et 9800 RLU) et ont toujours donné des résultats positifs, sauf 3 négatifs pour les crèmes et 2 pour les desserts. Nous pouvons supposer que les résultats « retest » auraient été positifs après une incubation supplémentaire (d'un jour par exemple).

Nous avons observé des valeurs de CV basses (environ 5%) pour le lait entier et le lait chocolaté, mais plus élevées (entre 26% et 56%) pour :

- les laits écrémés, peut-être à cause de l'altération du lait qui a entraîné une contamination hétérogène ;
- les crèmes et desserts : dues à leur viscosité.

### Echantillons contaminés naturellement

Durant l'examen des échantillons négatifs de crème (marque 1) après incubation de 2 jours à 30°C, 6 d'entre eux ont donné des résultats très élevés avec la méthode Promicol®, alors qu'aucune colonie n'avait été dénombrée sur PCAL après 2 jours et 15 jours d'incubation à 30°C (voir tableau 5). La contamination n'a pu être observée qu'en surface de boîtes de gélose au sang incubées à 30°C ou 37°C. Ces résultats montrent que la méthode Promicol® est plus sensible pour détecter ce type de contamination que la méthode officielle.

La souche isolée de cet échantillon a été identifiée par la méthode MALDI-ToF en tant que *Bacillus sporothermodurans*, une bactérie sporulée qui est connue pour être mésophile sous forme végétative (elle peut se développer à 30°C) et très thermorésistante sous forme sporulée.

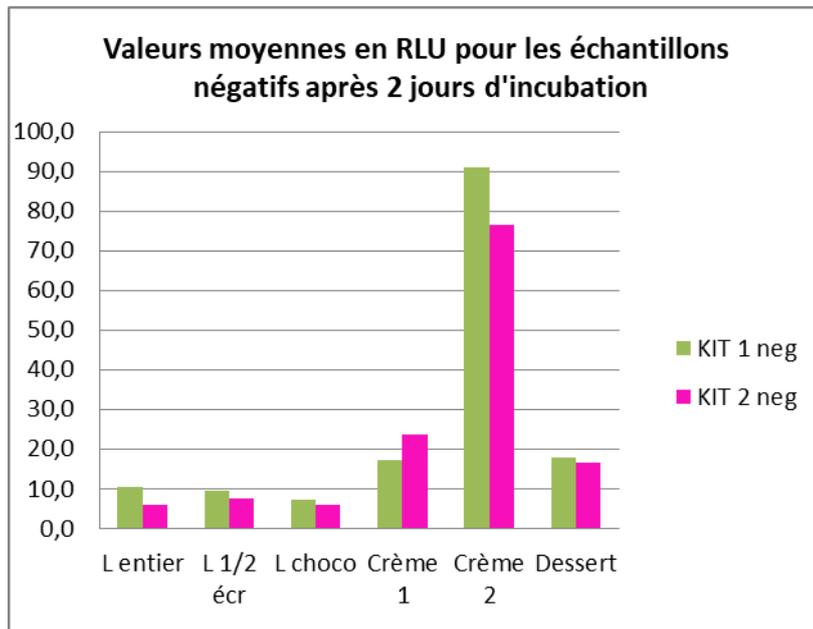
Tableau 5 : Résultats des échantillons de crème naturellement contaminés (marque 1)

Crème UHT (Marque 1)	20 échantillons négatifs	6 échantillons positifs
KIT1 J2 RLU	moyenne = 17	270 - 4400
KIT2 J2 RLU	moyenne = 24	180 - 3000
Flore totale J2 J15	Nég Nég	Nég Nég*

\* pas de croissance sur PCAL à 30°C, mais culture en surface de boîtes de gélose au sang (0,1 ml de dilution -1) à 30°C et 37°C

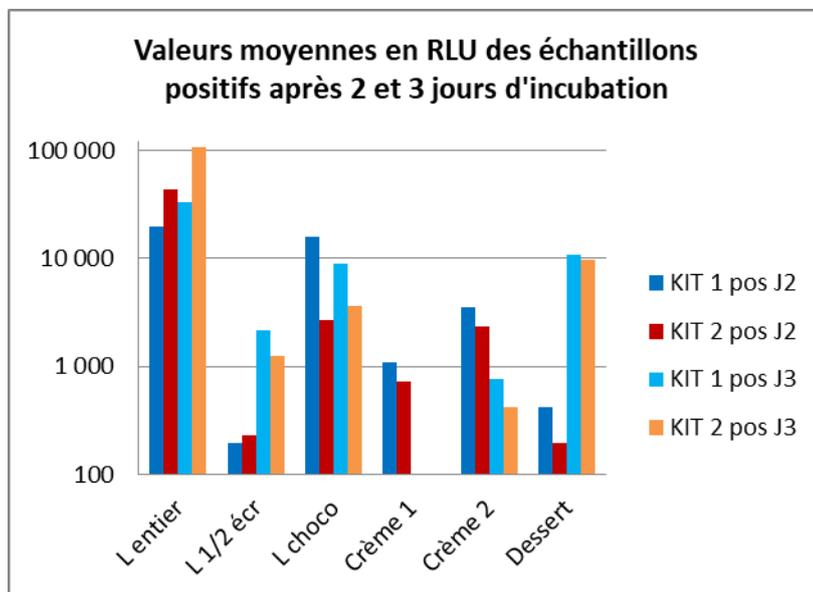
## ■ Comparaison entre les kits

Figure 1 : Comparaison entre les kits pour les échantillons négatifs en valeurs moyennes de RLU



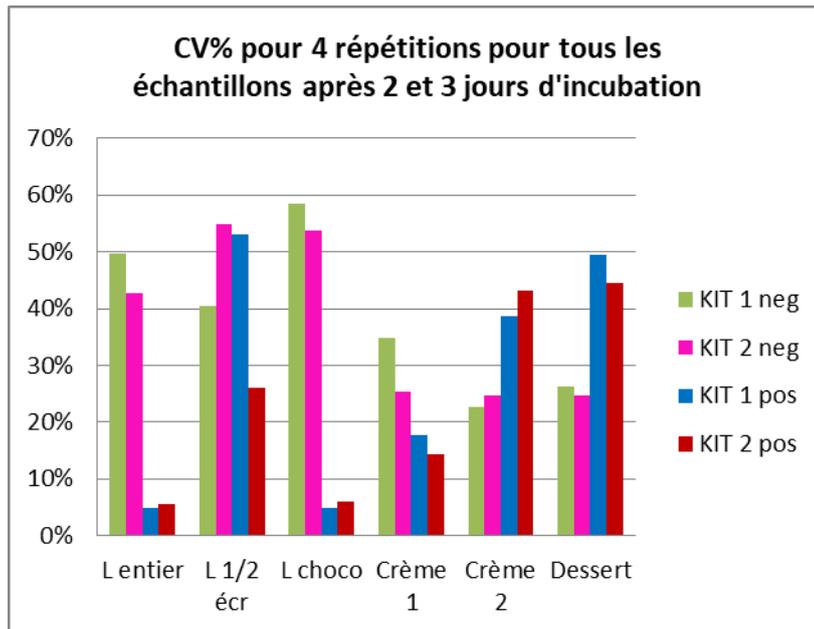
Pour les échantillons négatifs, les valeurs en RLU sont équivalentes pour les 2 kits et en général légèrement plus faibles pour le nouveau kit, sauf pour la crème de marque 1.

Figure 2 : Comparaison entre les kits pour les échantillons positifs en valeurs moyennes de RLU (en échelle semi logarithmique)



Pour les échantillons positifs, les valeurs RLU sont équivalentes pour les 2 kits et souvent plus faibles pour le nouveau kit.

Figure 3 : Comparaison entre les kits pour tous les échantillons en CV% sur 4 répétitions



Pour tous les échantillons, les CV% sur 4 répétitions sont équivalents pour les 2 kits, en général légèrement plus faibles pour le nouveau kit, et significativement plus faibles pour les échantillons positifs de lait écrémé. Pour les échantillons positifs, la viscosité des desserts et de la crème peut expliquer leurs valeurs élevées en CV%. Pour le lait écrémé, sa coagulation due à un développement bactérien important, peut être à l'origine de son hétérogénéité.

## CONCLUSION

Pour la comparaison entre les réactifs actuels (kit 1) et les réactifs de nouvelle génération (kit 2) :

- les valeurs en RLU après 2 jours d'incubation pour les échantillons négatifs ou positifs sont équivalentes pour les 2 kits, ou quelques fois plus faibles pour le nouveau kit ;
- le coefficient de variation sur 4 répétitions calculé en %, pour les échantillons négatifs ou positifs est équivalent ou plus faible pour le nouveau kit ;
- pour les 30 échantillons contaminés artificiellement après 2 et 3 jours de pré-incubation à 30°C, le nombre de résultats faux-négatifs était équivalent sur 240 analyses (3 négatifs pour le kit 1 contre 2 négatifs pour le kit 2) ;
- les 6 échantillons contaminés naturellement ont bien été détectés par les deux kits.

Pour la performance de la méthode Promicol® pour la stérilité des produits UHT ou longue conservation :

- la méthode Promicol® est très simple à mettre en œuvre ; l'ajout des réactifs, la lecture optique et l'interprétation des résultats sont automatiques.
- Promicol® est une méthode rapide qui nécessite 2 jours de pré-incubation à 30°C et 20 min d'analyses, contre 15 jours de pré-incubation suivis de 3 jours d'incubation en boîtes de PCA pour la méthode de référence.
- la performance de la méthode Promicol® est équivalente ou plus sensible que la méthode officielle sur PCA, comme observé dans cette étude pour les échantillons de crème naturellement contaminés. La méthode officielle nécessite quelquefois (par exemple pour la crème et les desserts) une dilution décimale et les résultats sur PCA sont parfois difficiles à interpréter, en particulier pour des cultures envahissantes.
- Promicol® peut être utilisé pour tout type de produits UHT et longue conservation, alors que le test à la résazurine, qui est couramment utilisé dans l'industrie laitière ne peut pas être utilisé pour les laits aromatisés colorés et certains types de laits supplémentés.
- Même les échantillons épais/visqueux peuvent être analysés avec la méthode Promicol® : l'usage de cônes à pointe large et une agitation rigoureuse avant pipetage sont recommandés pour assurer un prélèvement homogène.