

## EVALUATION DE LA METHODE SOLERIS POUR TESTER LA STERILITE DES LAITS UHT

Le test de la résazurine est actuellement utilisé en routine pour le contrôle de la stérilité des laits UHT dans de nombreux laboratoires industriels. Après une pré-incubation du lait de 2 à 5 jours à 30 °C, ce test met en évidence l'activité des réductases bactériennes. La méthode officielle (directive européenne 92/46) est un dénombrement de la flore totale après une pré-incubation des laits UHT 15 jours à 30 °C, et ne peut donc pas être utilisée en routine. La méthode Soleris, qui permet une mise en évidence de la croissance microbienne après une pré-incubation du lait UHT de 2 à 3 jours à 30°C, pourrait permettre une libération plus rapide des lots négatifs. Dans cette étude nous avons donc évalué en parallèle la méthode Soleris, le test de la résazurine et la méthode officielle.

La société Neogen, fondée aux USA en 1982, s'est développée internationalement, le siège européen étant basé en Ecosse. Neogen développe, fabrique et distribue différentes gammes de produits dédiés au diagnostic en hygiène alimentaire et en santé animale. La division hygiène des aliments concerne les milieux de culture, les tests d'analyses rapides de détection de bactéries pathogènes, de germes d'altération, de mycotoxines, d'allergènes, de modifications génétiques, de résidus de médicaments, de maladies des végétaux et de contrôle d'hygiène par ATP-métrie. Neogen propose ainsi des solutions à travers toute la chaîne de production, de la graine à planter jusqu'au produit fini.

Soleris est une méthode de détection rapide et de dénombrement d'une grande variété de microorganismes sur un large spectre d'échantillons, dont les aliments, les boissons et les cosmétiques.

Son principe est le suivant : un flacon de milieu spécifique à chaque microorganisme ou produit est inoculé, puis placé dans un incubateur couplé à un système automatique de lecture. Des capteurs optiques permettent de mesurer en permanence la croissance microbienne. La courbe de croissance ainsi obtenue peut être visualisée et éditée. Un maximum de 512 échantillons peut être testé simultanément, en utilisant quatre incubateurs connectés à un ordinateur.

Pour l'analyse des produits laitiers UHT, le milieu « NF UHT Medium » contenant du bouillon trypticase soja est utilisé. Ce milieu est inoculé avec le lait UHT pré-incubé à 30 °C, puis placé dans l'incubateur réglé à 30 °C. La base du flacon contient un indicateur coloré passant du vert au jaune sous l'effet de la production de CO<sub>2</sub> dégagé lors de la croissance des microorganismes. Le dégagement de CO<sub>2</sub> est mesuré régulièrement et interprété par un logiciel qui permet de suivre en direct la croissance du microorganisme sur une courbe. Un résultat positif est obtenu dès que le seuil de détection (DT) est atteint. L'objectif de cette méthode est d'être capable de détecter une contamination d'une cellule dans une bouteille de lait.



### PROCEDURE

Cette évaluation menée par le laboratoire de Microbiologie d'Actalia Cecalait à Poligny, d'octobre 2014 à avril 2015, s'est déroulée en 2 étapes :

- détermination de la limite de détection de la méthode
- étude d'inclusivité

Les essais ont été réalisés sur du lait UHT demi-écrémé dans des bouteilles de 1 litre. La pré-incubation du lait a été réalisée dans un bain d'eau réglé à 30 +/- 1 °C.

## 1. Méthodes

- **Méthode Soleris** : après une pré-incubation du lait pendant 2 et 3 jours à 30 °C, 5 ml sont prélevés stérilement et inoculés dans un flacon « NF UHT médium ». Le flacon est placé dans l'incubateur Soleris réglé à 30 +/- 1 °C pendant un maximum de 48 h.
- **Test à la résazurine**: après 5 jours de pré-incubation du lait à 30 °C, 2,5 ml de lait sont ajoutés à 0,5 ml de résazurine à 0,005 %. La lecture est réalisée après 4 h 30 à 30 °C. En cas de résultat positif, la coloration bleu ou bleu-mauve passe à une coloration rose à blanc.
- **Méthode officielle** : 0,1 ml de lait pré-incubé 15 jours à 30 °C est inoculé dans 2 boîtes de PCA incubées 3 jours à 30 +/-1 °C. Un résultat inférieur à 10 UFC pour 0,1 ml (< 100 UFC/ml) est considéré comme négatif. Dans le cadre de cette étude, les analyses ont été réalisées également après 3 et 5 jours de pré-incubation du lait.

## 2. Détermination de la limite de détection (LOD)

5 souches fréquemment rencontrées dans le lait UHT et présentant une croissance plus ou moins rapide ont été testées.

Le protocole de l'ISO/ FDIS 16140 de 2014 a été suivi pour cette étude:

- 5 échantillons négatifs
- 20 échantillons avec une contamination de l'ordre de 0,5 UFC/litre
- 10 échantillons avec une contamination d'environ 5 UFC/litre

Quand cela était possible, la limite de détection (LOD<sub>50%</sub>) a été calculée: c'est le plus petit nombre de microorganismes cultivables qu'il est possible de détecter dans l'échantillon avec une probabilité de 50 %.

## 3. Inclusivité

Le protocole de l'ISO/ FDIS 16140 de 2014 a été suivi pour cette étude :

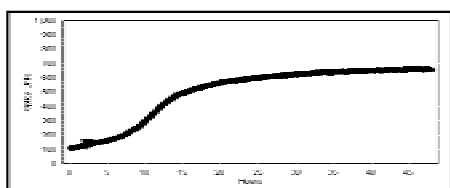
Un panel de 32 souches représentatives des flores contaminant le lait UHT (dont 5 souches testées en LOD), la plupart isolées de lait UHT ou de lait cru, ont été inoculées dans du lait à un taux approximatif de 10 UFC/ml, permettant normalement leur détection.

La méthode officielle n'a été mise en œuvre que dans le cas où les résultats pour les autres méthodes étaient négatifs ou lors de vérifications complémentaires.

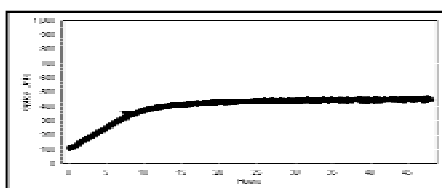
## RESULTATS

### Détermination de la limite de détection

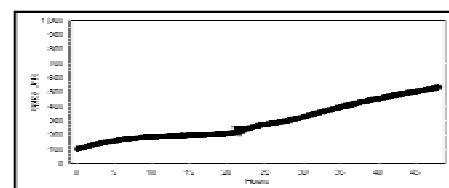
SOUCHE		<i>Candida parapsilosis</i>			<i>Pseudomonas</i>			<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>		
UFC / litre J0		0	0,27	2,7	0	0,39	3,9	0	0,79	7,9
Nombre de bouteilles (1L)		5	20	5	5	20	5	5	20	5
Nombre de résultats positifs	SOLERIS J+2	0	3	4	0	8	5	0	11	5
	J+3	0	3	4	0	8	5	0	11	5
	RESA J+5	0	3	4	0	8	5	0	11	5
	PCA J+15	0	3	4	0	8	5	0	11	5
<b>SOLERIS LOD<sub>50%</sub></b>		<b>1,2</b> [0,5 – 2,6]			<b>0,5</b> [0,2 – 1,0]			<b>0,7</b> [0,3 – 1,3]		



*C. parapsilosis* : J+2 DT=7,7–17,2 h



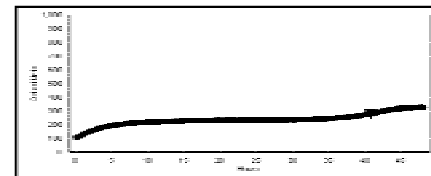
*Pseudomonas* : J+2 DT = 7,8 h



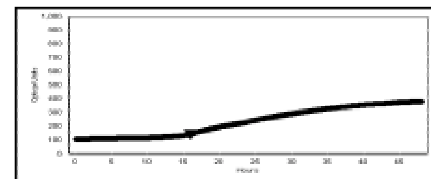
*C. cellulans*: J+2 DT =18,7 à 29,7 h

Pour ces 3 souches, le seuil de détection de la méthode Soleris est d'environ 1 UFC/L de lait UHT avec des valeurs de LOD<sub>50%</sub> allant de 0,7 à 1,2 UFC/L, dès 2 jours de pré-incubation du lait. Ces résultats sont en parfaite concordance avec le test de la résazurine et la méthode officielle.

SOUCHE		<i>Mycobacterium vaccae</i>					Spores de <i>Bacillus sporothermodurans</i>		
UFC / litre J0		0	1,1	9,2	92	920	0	1,3	13
Nombre de bouteilles (1L)		5	20	5	3	3	5	20	5
Nombre de résultats positifs	SOLERIS J+2	0	0	0	0	3	0	0	0
	J+3	0	0	0	0	3	0	0	0
	RESA J+5	0	0	0	0	0	0	0	0
	PCA J+15	0	9	5	3	3	0	0	0
<b>SOLERIS LOD<sub>50%</sub></b>		<b>280 [80 – 990]</b>					-		
<b>J+2</b>		<b>27 [7 – 98]</b>					-		
<b>J+3</b>							-		



*M. vaccae* : J+2 DT= 40,0 – 44,9 h



*B. sporothermodurans* : 4 10<sup>5</sup> UFC/ flacon. DT = 16 h

- Pour *Mycobacterium vaccae*, LOD<sub>50%</sub> de la méthode Soleris est approximativement de 300 UFC/litre après une pré-incubation du lait UHT pendant 2 jours et 30 UFC/litre pour une pré-incubation de 3 jours (détectable en PCA également). La résazurine donne des résultats négatifs après 5 jours d'incubation du lait, même à des taux élevés d'environ 1 000 UFC/litre. A des taux très faibles, dès 5 jours d'incubation dans le lait, les colonies sont détectables sur PCA (quelques dizaines de colonies pour 0,1 ml).
- *B. sporothermodurans* n'est détecté par aucune méthode à des taux faibles. La même souche testée en méthode NPP (3 bouteilles/ dilution), avec et sans thermisation, à des taux allant de 1 à 5 000 UFC/litre, donne des résultats négatifs en méthode Soleris et au test de la résazurine, alors que les taux les plus élevés sont détectables en PCA. Une inoculation massive (4 10<sup>5</sup> UFC/flacon) donne un résultats positif par la méthode SOLERIS, montrant que cette bactérie peut être détectée par cette méthode. Ces résultats montrent que *B. sporothermodurans* survit, mais se développe faiblement dans le lait.

### Inclusivité

	SOUCHES	TAUX/L	SOLERIS		RESA	PCA		
			J+2	J+3	J+5	J+3	J+5	J+14
<b>BACILLES GRAM - OXYDASE +</b>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	23	+	+	+			
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	40	+	+	+			
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	4,6/34	-/+	+/+	+/+	/+	/+	/+
	<i>Pseudomonas</i>	7,8	+	+	+	+	+	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	7,4	+	+	+			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	+	+	+			
<b>BACILLES GRAM - OXYDASE -</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	5,6	+	+	+			
	<i>Escherichia coli</i>	11	+	+	+			
	<i>Acinetobacter rudis</i> : CIP 110305T	4,1/11	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
<b>COQUES</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	9,6	+	+	+			
	<i>Staphylococcus capitis</i>	32	-	-	-	-	-	-
	<i>Streptococcus faecalis</i>	15	+	+	+			
	<i>Lactococcus lactis</i>	6,1	+	+	+			
<b>BACILLES GRAM + NON SPORULES</b>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	6,1	+	+	+			
	<b><i>Cellulosimicrobium cellulans</i> : CIP 81.28</b>	16	+	+	+	+	+	+
	<i>Microbacterium lacticum</i> : CIP 101097	16/15	-/-	-/-	+/+	+/+	+	+
	<i>Microbacterium liquefaciens</i> : CIP 102402T	10/7	+/+	+/+	+/+	+/+	+	+
	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	10-100	-	-	-	-	+	+
	<b><i>Mycobacterium vaccae</i> : CIP 105934T</b>	9,2	-	-	-	-	+	+
<b>BACILLES GRAM + SPORULES</b>	<i>Paenibacillus lactis</i> : CIP 108827T	5,5/78	-/-	-/-	-/+	+/-	+/+	+/+
	<i>Bacillus cereus</i>	4,6	+	+	+			
	<i>Bacillus licheniformis</i>	5,5/4,9	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+
	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	6,5	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	11	-	-	-	-	-	-
	<b><i>Bacillus sporothermodurans</i> (spores)</b>	26	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i> (spores) : ATCC 6633	10	+	+	+	+	+	+
	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (spores) : C953	10	-	-	-	-	-	-
	<i>Clostridium perfringens</i> (spores)	10	-	-	-	-	-	-
<b>LEVURES</b>	Levure	8,0/ 0,2	-/-	+/+	+/+	/+	/+	/+
	<i>Candida parapsilosis</i>	5,5	+	+	+	+	+	+
<b>MOISSISSURES</b>	<i>Geotrichum</i>	15	-	+	-	+	+	+
	<i>Penicillium candidum</i>	20	-	-	-	-	-	-

En gras : souches testées en LOD / Discordance entre la méthode Soleris et le test résazurine / Méthode Soleris positive à J+3 et négative à J+2

Certaines souches négatives ont été testées 2 fois pour confirmer les résultats.

Sur 32 souches testées en inclusivité (dont 5 souches en LOD) à des taux d'environ 10 UFC/litre, la méthode Soleris a permis de détecter 21 souches, dont 3 souches (*Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter rudis* et *B. licheniformis*) présentant un résultat négatif lors du premier essai, et positif lors du 2<sup>ème</sup> essai.

Les résultats Soleris sont concordants avec le test de la résazurine, sauf pour:

- 1 souche de moisissure (*Geotrichum*) et 1 souche bactériennes (*B. licheniformis*) détectées en méthode Soleris et non en résazurine
- 2 souches bactériennes (*Microbacterium lacticum* et *Paenibacillus lactis*) détectées en résazurine et non en méthode Soleris.

La détection en méthode Soleris a lieu dès 2 jours d'incubation du lait à 30°C sauf pour 3 souches : une levure et une moisissure détectées en 3 jours et 1 bactérie (*Aeromonas hydrophila*) détectée en 2 jours pour un essai sur deux.

## CONCLUSIONS

### Conclusion des résultats de l'étude

L'étude de la limite de détection sur 5 souches a permis d'observer les résultats suivants :

- Pour 3 souches (*Candida*, *Pseudomonas* et *Cellulisomicrobium*) la méthode Soleris, après une pré-incubation de 2 jours à 30 °C, permet une détection d'environ 1 UFC/litre de lait UHT demi-écrémé, en parfaite concordance avec le test de la résazurine et la méthode officielle.
- La souche de *Mycobacterium vaccae* est détectée en méthode Soleris à partir d'environ 100 UFC/litre, alors que le test résazurine ne permet pas sa détection à 1 000 UFC/litre.
- La souche de *B. sporothermodurans* sous forme sporulée ou végétative n'est détectée qu'à des taux très élevés quelle que soit la méthode utilisée, sans doute à cause de la faible croissance de cette bactérie dans le lait.

L'étude d'inclusivité montre que 21 souches sur 32 sont détectées en méthode Soleris après 3 jours de pré-incubation du lait UHT à 30 °C, et 19 souches après 2 jours de pré-incubation. Quatre discordances ont été observées par rapport au test de la résazurine : 2 en faveur de la méthode Soleris et 2 en faveur du test de la résazurine.

### Conclusion sur l'utilisation de la méthode Soleris

La méthode Soleris est une méthode facile à mettre en œuvre : 5 ml de lait UHT sont inoculés dans un bouillon prêt à l'emploi. La lecture optique et l'interprétation des résultats sont réalisés de façon automatique (sans appréciation visuelle), contrairement au test de la résazurine. Les résultats obtenus sont tracés, et la courbe de croissance permet d'avoir des informations supplémentaires pour l'interprétation des résultats.

Elle permet d'obtenir des résultats équivalents au test de la résazurine après 2 ou 3 jours de pré-incubation du lait UHT, contre 5 jours pour la méthode à la résazurine.

La méthode Soleris peut être utilisée pour tous les types de laits UHT : blancs, aromatisés ou supplémentés (non testé dans le cadre de cette étude) alors que le test de la résazurine ne peut pas être utilisé sur les laits aromatisés colorés et sur certains types de laits supplémentés.

Patricia ROLLIER

**La méthode SOLERIS est commercialisée par la société NEOGEN Europe:**



**European Headquarters of Neogen Corporation**

The Dairy School, Auchincruive, Ayr, KA6 5HU, Scotland, UK

tel: +44 (0) 1292 525600

fax: +44 (0) 1292 525601

[www.neogeneurope.com](http://www.neogeneurope.com)