

EVALUATION DU SYSTEME PROMICOL POUR TESTER LA STERILITE DES LAITS UHT

Actuellement, pour le contrôle de la stérilité des laits UHT le test de la résazurine est utilisé en routine dans de nombreux laboratoires industriels. Après une pré-incubation de 2 à 3 jours à 30°C, ce test met en évidence l'activité des réductases bactériennes, mais il ne peut pas être utilisé sur un large éventail de produits. La méthode officielle (directive européenne 92/46) est un dénombrement de la flore totale après une incubation des échantillons 15 jours à 30°C, et ne peut donc pas être utilisée en routine. Le système Promicol, qui permet une mise en évidence de l'ATP microbien après incubation de 2 à 3 jours à 30°C, apparaît donc comme une alternative intéressante. Dans cette étude nous avons donc testé en parallèle le test à la résazurine et le système Promicol, tout en utilisant le dénombrement de la flore totale comme méthode de référence.



Promicol BV, société basée aux Pays-Bas, produit une large gamme de kits microbiens basés sur la mise en évidence de l'ATP (adénosine triphosphate) par bioluminescence. Des kits spécifiques aux produits finis tels que les vins, les boissons, les boissons au soja, les jus de fruits et les produits laitiers UHT sont disponibles.

Le système Promicol comprend un kit de détection ATP spécifique aux produits laitiers UHT, l'analyseur PromiLite III et le logiciel Proscreen fonctionnant sous Windows XP. Le PromiLite III, le plus important dans la famille des luminomètres de Promicol, est un appareil très compact, qui permet de tester jusqu'à 400 échantillons par heure.

La méthode est utilisée pour détecter l'ATP microbien dans les produits laitiers UHT, incluant des laits aromatisés, des laits à taux de lactose réduit, des desserts, des laits pour bébé, des crèmes. Après incubation 2 ou 3 jours à 30°C juste après leur production, les produits laitiers UHT sont analysés par la méthode Promicol pour l'évaluation de la croissance des bactéries, par extraction et détection de leur ATP. L'objectif de cette méthode est d'être capable de détecter une bactérie dans une bouteille de lait.

PROCEDURE

3 types de laits UHT ont été étudiés :

- Laits blancs
- Laits supplémentés (minéraux, vitamines)
- Laits aromatisés

Cette évaluation a été réalisée en 2 étapes :

1. Examen de laits négatifs et détermination de la RLU (unité relative de luminescence) de contrôle de chaque type de lait
2. Examen de laits artificiellement contaminés.

1. Examen des échantillons négatifs

Les essais ont été réalisés sur des bouteilles de lait envoyées à CECALAIT juste après conditionnement (afin de réduire le temps d'incubation à température ambiante).

a) **Après 3 jours d'incubation à 30 +/-2°C:** 10 échantillons de chaque type de lait ont été analysés selon 3 méthodes :

- Détection de l'ATP par le système Promicol avec 2 analyses par échantillon. La RLU de contrôle a été évaluée pour chaque type de lait par calcul de la moyenne des valeurs obtenues sur 10 échantillons.

- Test à la résazurine avec 2 analyses par échantillon.

- Dénombrement des microorganismes à 30°C (selon la norme ISO 4833) avec 2 boîtes inoculées par 0,1ml de lait.

b) **Après 15 +/- 2 jours d'incubation à 30°C:**

Le dénombrement des microorganismes à 30°C a été réalisé une seconde fois, afin de suivre la directive européenne 92/46, le critère étant < 10 UFC pour 0,1 ml correspondant à < 100 UFC/ml.

2. Examen des laits contaminés artificiellement

Un lot de chaque type de lait UHT a été contaminé avec un lait naturellement positif selon le test à la résazurine. 10 échantillons négatifs de chaque type ont ainsi été contaminés à différents niveaux en dessous et au-dessus de 1 bactérie / litre, dans le but d'obtenir des échantillons négatifs et d'évaluer la limite de détection.

Les échantillons ont ensuite été analysés :

a) Après 3 jours d'incubation à 30 +/- 2°C : selon 3 méthodes

- Détection de l'ATP par le système Promicol avec 2 analyses par échantillon. La RLU de contrôle obtenue par l'analyse des échantillons négatifs a été utilisée pour calculer les valeurs limites servant à l'interprétation des résultats :

- Si la RLU de l'échantillon est **plus faible que 2 x** la RLU de contrôle, alors l'échantillon est considéré comme stérile.

- Si la RLU de l'échantillon est **plus forte que 2 x mais plus faible que 3 x** la RLU de contrôle, alors l'échantillon est considéré comme suspect et devra être testé à nouveau après une incubation supplémentaire.

- Si la RLU de l'échantillon est **plus fort que 3 x** la RLU de contrôle, alors l'échantillon n'est pas considéré comme stérile.

- Test à la résazurine avec 2 analyses par échantillon

- Dénombrement des microorganismes à 30°C sur les dilutions -1 à -4.

b) Après 15 +/- 2 jours d'incubation à 30 +/- 2°C:

Le dénombrement des microorganismes à 30°C a été réalisé une seconde fois uniquement sur les échantillons négatifs après 3 jours d'incubation, avec 2 boîtes inoculées par 0,1 ml de lait.

RESULTATS

1. Examen des échantillons négatifs

1.1. Comparaison des méthodes pour le contrôle de la stérilité du lait

- Pour les laits blancs, nous avons obtenu des résultats négatifs avec toutes les méthodes, excepté pour le lait de chèvre qui ne peut pas être testé avec le système Promicol.

- Pour les laits supplémentés négatifs, nous avons obtenu par le test à la résazurine des résultats positifs ou douteux sur 4 échantillons. En effet, selon le niveau et le type de supplément, le potentiel redox peut être modifié.

- Les laits aromatisés étant colorés, le test à la résazurine n'a pas pu être utilisé sur ces produits.

- Pour tous les échantillons nous avons obtenu des résultats négatifs à la fois avec la méthode ATP et avec le dénombrement de la flore totale après pré-incubation des laits 3 ou 15 jours à 30°C (< 100 UFC/ml).

1.2. Méthode ATP

Pour tous les types de laits négatifs analysés, nous avons obtenu des valeurs très proches pour les moyennes et les écart-types associés à la moyenne, ainsi que pour les répétabilités.

Tableau 1: Résultats ATP en RLU sur les échantillons négatifs analysés en double après 3 jours d'incubation à 30°C

Echantillons	Laits blancs	Laits supplémentés	Laits chocolatés	Tous les échantillons
n	10	10	10	30
Moyenne (RLU de Contrôle)	27	26	30	27
SD	6,0	5,2	5,7	5,8
Limite négative	53	52	59	55
Limite positive	80	78	89	82
Sr	4,4	4,0	3,7	4,1
Sr %	17%	16%	13%	15%
r	12	11	10	11

n : nombre d'échantillons

SD : écart-type

Sr : écart-type de répétabilité

Sr% : écart-type de répétabilité en % de la valeur moyenne

r : répétabilité

2. Examen des laits contaminés

2.1. Analyses des laits positifs

La flore totale des laits positifs a été dénombrée selon la norme ISO 4833, dans le but d'obtenir une

évaluation de la contamination. Ces laits positifs au test de la résazurine étaient naturellement contaminés par des bactéries d'altération du lait UHT présentant des caractéristiques différentes.

Tableau 2: Dénombrement et caractéristiques de la contamination bactérienne des laits positifs

Lait positif	2	19	20
UCF / ml	6,8E+06	1,4E+06	4,6E+03
Colonies	moyennes	très petites	petites jaunes
Caractéristiques	Bacilles Gram - Oxydase -	Coques Gram + Catalase +	Bacilles Gram + Catalase +

2.2 Contaminations et examen des échantillons après contamination

- Comparaison entre le test ATP, le dénombrement de la flore totale et le test à la résazurine

Pour tous les échantillons (positifs ou négatifs), nous avons obtenu après pré-incubation 3 jours à 30°C des résultats concordants entre la méthode ATP et le dénombrement de la flore totale. On peut noter que tous les échantillons négatifs présentaient une flore totale < 10 UFC/ml après pré-incubation 15 jours à 30°C.

Il n'a pas été possible de tester les laits aromatisés chocolatés avec le test à la résazurine. Pour les laits blancs et les laits supplémentés, le test à la résazurine a donné des résultats concordants avec la méthode ATP et le dénombrement de la flore totale.

- Résultats ATP

Concernant la limite de détection du système Promicol, après 3 jours d'incubation à 30°C, il est possible de détecter 1 UFC dans 1 litre de lait (présent avant incubation).

Nous pouvons également observer que les valeurs des échantillons positifs n'étaient pas les mêmes selon le lait positif utilisé pour la contamination, les valeurs les plus faibles sont comprises entre 90 et 200 RLU et les plus élevées entre 1000 et 1500 RLU.

Concernant la répétabilité des échantillons positifs, Sr est compris entre 2 et 7 % (en pourcentage de la valeur moyenne).

Tableau 3: Taux de bactéries présentes dans les laits avant incubation, résultats ATP et laits positifs utilisés pour la contamination

Echantillons	Laits blancs		Laits supplémentés		Laits chocolatés	
	UFC/litre	ATP	UFC/litre	ATP	UFC/litre	ATP
1	1,0	-	0,1	-	0,08	-
2	1,6	-	0,3	+	0,16	+*
3	2	+	0,4	-	0,24	-
4	4	-	1,1	+	0,6	+
5	6	+	1,4	+	0,8	+
6	10	+	2,9	+	1,6	+
7	16	+	4,3	+	2,4	+
8	20	+	7,1	+	4,0	+
9	100	+	11	+	6,4	+
10	200	+	14	+	7,9	+
Lait positif	2		19		20	

ATP - : lait non contaminé

ATP + : lait contaminé

ATP +* : contamination accidentelle ne provenant pas du lait ajouté

Tableau 4: Résultats ATP en RLU (relative light units) sur les échantillons positifs analysés en double après 3 jours d'incubation à 30°C

	Laits blancs	Laits supplémentés	Laits chocolatés
n	6	7	6
RLU	110 à 250	1000 à 1500	90 à 200
Sr	11	30	10
Sr%	6%	2%	7%
r	31	83	26

n : nombre d'échantillons

Sr : écart-type de répétabilité

Sr% : écart-type de répétabilité en % de la valeur moyenne

r : répétabilité

CONCLUSIONS

Conclusion des résultats de l'étude

Avec le système Promicol, après une pré-incubation de 3 jours à 30°C, nous avons obtenu des résultats concordants avec le dénombrement de la flore totale (après pré-incubation de 3 et 15 jours à 30°C) pour tous les résultats positifs et négatifs.

Le système Promicol peut être utilisé pour tous les types de laits de vache UHT incluant les laits blancs, supplémentés ou aromatisés, mais il ne peut pas être utilisé pour les laits de chèvre.

Le système Promicol est capable de détecter 1 bactérie dans 1 litre de lait UHT après incubation 3 jours à 30°C. Il est possible de réduire ce temps à 2 jours, selon le type de lait ou le type de bactérie contaminant le produit. Avant d'utiliser le système Promicol en routine, les laboratoires devront tester chaque type de produits afin dévaluer leur valeur RLU de contrôle et de confirmer le temps et la température de pré-incubation.

L'écart-type de répétabilité est d'environ 14% pour les échantillons négatifs et entre 2 et 7 % pour les échantillons positifs, plus faible par exemple que l'écart-type obtenu par la méthode de dénombrement de la flore totale (environ 23 % UFC/ml)

Pendant cette étude nous avons utilisé différents lots du kit Promicol, et nous n'avons pas observé de variation significative sur les valeurs des échantillons négatifs.

Conclusion sur l'utilisation du système Promicol

Le système Promicol peut être utilisé pour tous les types de laits UHT : blancs, aromatisés ou supplémentés, contrairement au test à la résazurine qui ne peut pas être utilisé sur les laits aromatisés colorés et sur certains types de laits supplémentés.

Le système Promicol peut mesurer et classer les résultats de 96 échantillons différents en seulement 20 minutes environ (de l'inoculation à la lecture), contre 1 ou 4 heures pour le test à la résazurine et 3 jours pour le dénombrement de la flore totale.

Le système Promicol est facile d'utilisation et pour un technicien une formation d'une demi-journée suffit pour utiliser le système. Les résultats sont obtenus par une mesure optique (pas d'appréciations visuelles comme pour le test à la résazurine) et ne sont pas tributaires des bonnes conditions aseptiques du laboratoire comme ceux issus de la méthode traditionnelle de comptage sur boîtes.

Patricia ROLLIER

Le système PROMICOL est commercialisé en France par EURALAM

(Réactifs et Analyseurs pour l'Hygiène Alimentaire)
Tél : 04 72 68 71 71 euralam.info@euralam.com

Nous tenons à remercier les usines :

- CANDIA CAMPBON
- CANDIA SAINT-ETIENNE
- CANDIA CAMBRAI

pour la fourniture des échantillons.