



# Techniques d'analyse en rapport avec les germes pathogènes du lait : principes, avantages et limites des méthodes

Valérie MICHEL

Département Microbiologie Laitière  
Unité Expertise Analytique Laitière - Cecalait  
74800 La Roche sur Foron

[v.michel@actalia.eu](mailto:v.michel@actalia.eu)

# Germes pathogènes du lait pour l'homme

Présence potentielle dans le lait cru de micro-organismes indésirables

## Bactéries

*Listeria monocytogenes*  
*Salmonella* spp.  
*Staphylococcus aureus*  
*E. coli* STEC  
*Bacillus cereus*  
*Mycobacterium bovis*,  
*Brucella abortus*  
*Brucella melitensis*  
*Yersinia enterocolitica*  
.....

## Virus

Virus encéphalite  
à tiques (TBEV)  
.....

## Parasites

Cryptosporidium  
Toxoplasma gondi  
....

➔ Comment les mettre en évidence ?

# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

Mise en évidence

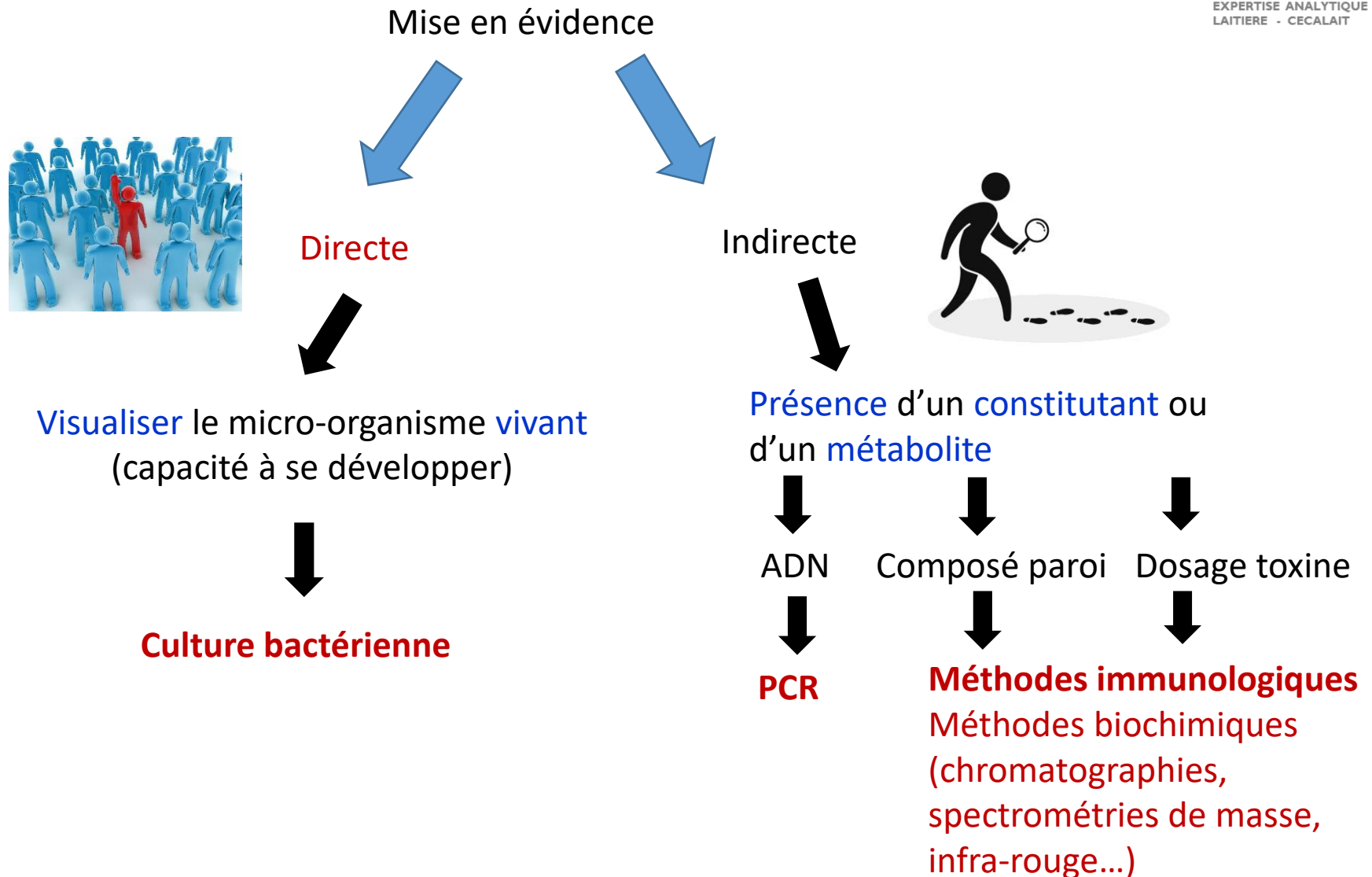


Directe

Visualiser le micro-organisme vivant  
(capacité à se développer)

**Culture bactérienne**

# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait



# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

Mise en évidence **directe** par **culture bactérienne**



- Passer du vivant non visible (bactéries de quelques micromètres) à un élément visible à l'œil nu
- Repérer le micro-organisme au milieu des autres dans le lait
- Parfois, présent en très faible quantité → nécessite un enrichissement



Echantillon

Prise d'essai

Enrichissement



Isolement sur milieu de culture  
et incubation



Identification complémentaire

# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

Mise en évidence **directe** par **culture bactérienne**



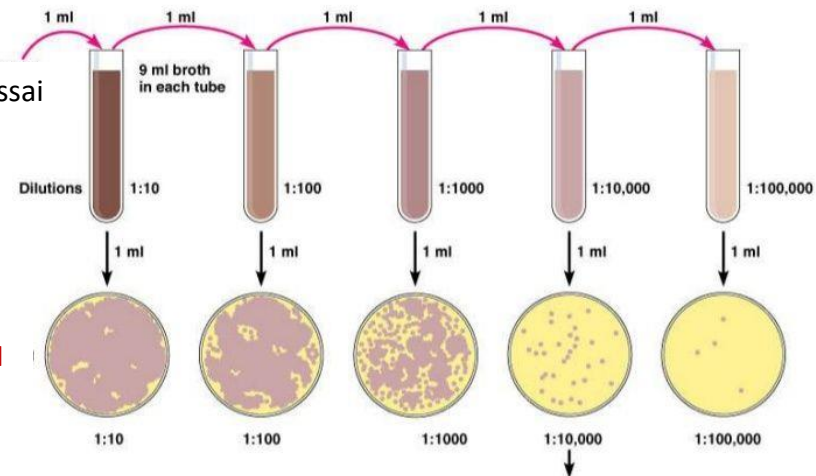
- Passer du vivant non visible (bactéries de quelques micromètres) à un élément visible à l'œil nu
- Repérer le micro-organisme au milieu des autres dans le lait
- Parfois, présent en très faible quantité → nécessite un enrichissement



Echantillon

Prise d'essai

## Dilution en série



Etalement sur milieu  
Comptage après  
incubation

Calculation: Number of colonies on plate  $\times$  reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml  
(For example, if 32 colonies are on a plate of  $1/10,000$  dilution, then the count is  $32 \times 10,000 = 320,000$ /ml in sample.)

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

Mise en évidence **directe** par **culture bactérienne**



- Repérer le micro-organisme au milieu des autres dans le lait (croissance ou enrichissement)
  - ✓ → Avoir des **milieux de culture spécifiques**
    - Composition (sucres, protéines, acides aminés, pH...)
    - Présence d'inhibiteurs : antibiotiques, teneur en sel...
  - ✓ Favoriser son **développement dans des conditions qui le favorisent**
    - Température
    - Aérobie/anaérobie
  - ✓ Si besoin, **le différencier des autres** après son développement
    - Substrat dans le milieu qui va révéler une activité enzymatique particulière → couleur, halo de précipitation
    - Test biochimique complémentaire

.... bien souvent les milieux de culture ne sont pas spécifiques à 100 %



# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

Mise en évidence **directe** par **culture bactérienne**



Exemple : recherche de *Listeria monocytogenes*

Méthode(s) de référence : **NF EN ISO 11290-1 (juillet 2017)**



## - Partie 1 : méthode de recherche

- Enrichissement primaire en bouillon Fraser-demi (25 h  $\pm$  1 h /37°C  $\pm$  2°C)
- Enrichissement secondaire en bouillon Fraser: (24 h  $\pm$  2 h /37°C  $\pm$  2°C)

Antibiotiques  
Chlorure de  
lithium, esculine,  
citrate de fer

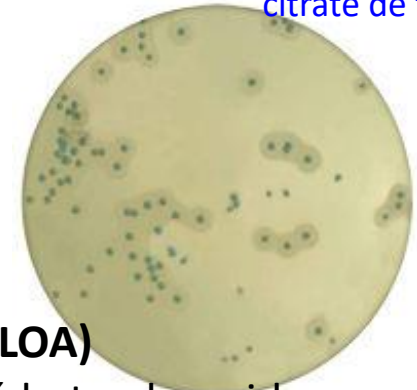
- Isolement sur gélose sélective

- Test complémentaires :
  - observation microscopique,
  - test de CAMP
  - test catalase

### **Ex de gélose sélective (ALOA)**

Mise en évidence activité beta-glucosidase  
(colonie bleue)

Et d'une phospholipase C (halo franc avec  
phosphatidylinositol)





# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

Mise en évidence **directe** par **culture bactérienne**



Exemple : recherche de *Listeria monocytogenes*

Méthode(s) de référence : **NF EN ISO 11290-1 (juillet 2017)**



- Test complémentaire sur colonies
- Observation macroscopique : petit bacille gram +
- Test catalase : + pour *Listeria*
- Identification de l'espèce pour *L. spp* → Galerie API® *Listeria*



→ selon potentialité métabolique, distinction des différentes espèces

# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

Mise en évidence **indirecte** par **un constituant**

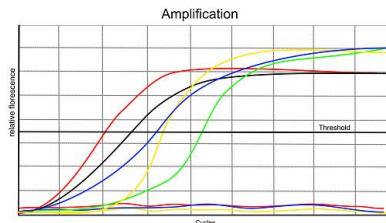
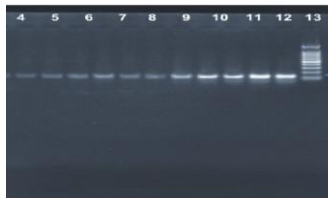
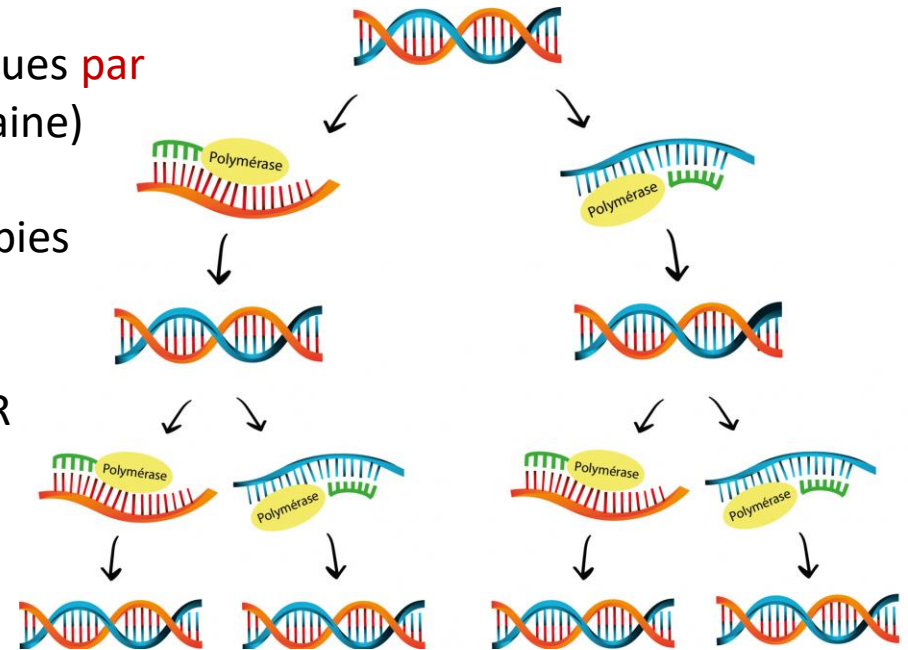


**ADN** : Il existe des **séquences génétiques conservées** chez les micro-organismes au niveau du genre (*Listeria*) ou de l'espèce (*Listeria monocytogenes*)  
→ Possibilité de les utiliser comme marqueurs de présence de ces bactéries

**Amplification** de ces séquences spécifiques par **PCR** (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

→ Obtention d'un grand nombre de copies de la zone recherchée (32 à 35 cycles)

→ **Révélation** par migration sur gel (PCR Point Final) ou via sondes fluorescentes (PCR temps réel)



# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

Mise en évidence **indirecte** par **un constituant** : ADN



- Extraire l'ADN (l'avoir en quantité suffisante pour la réaction)
- Ne pas avoir d'inhibiteurs de l'enzyme réalisant la PCR (matière grasse, sel...)
- Amorces spécifiques (quelquefois seulement au niveau du genre (ex *Salmonella spp*))
- Réalisation des mélanges PCR en zone contrôlée (risque de contamination croisée)
- ADN se conserve longtemps après la mort bactérienne

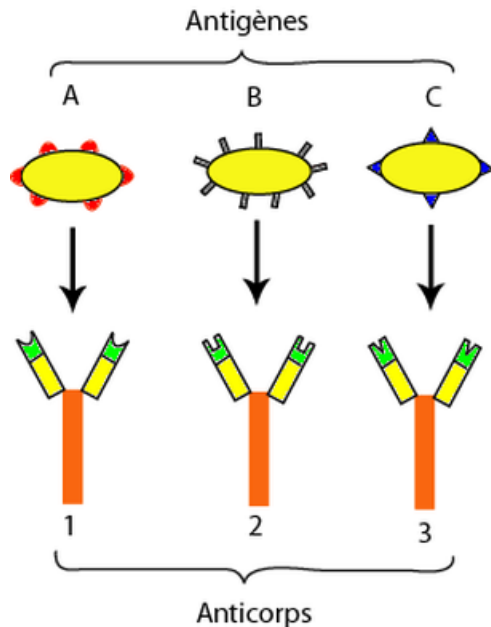
→ En cas de réaction positive,  
- vérification de la présence d'une bactérie vivante (isolement sur milieu de culture semi-spécifique )

# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

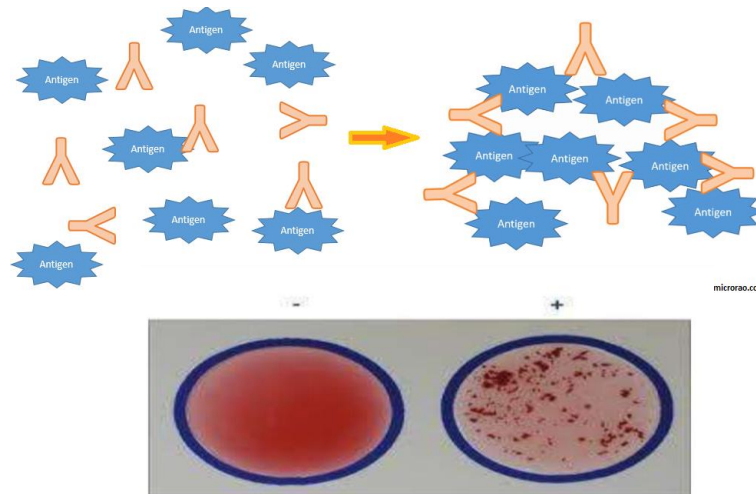
Mise en évidence **indirecte** par un **constituant** : **paroi, toxine**



- Membranes bactériennes : contiennent des enchainements de sucres / lipides spécifiques aux sous-espèces ou sous-types (Ag O des bactéries à Gram négatif) → antigènes pour lesquels il est possible de faire produire des anticorps spécifiques  
→ **Technique immunologique**



- Détection par agglutination : présence de l'antigène



➔ Utilisé pour déterminer les antigènes de *Salmonella* (identification du serovar)

# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

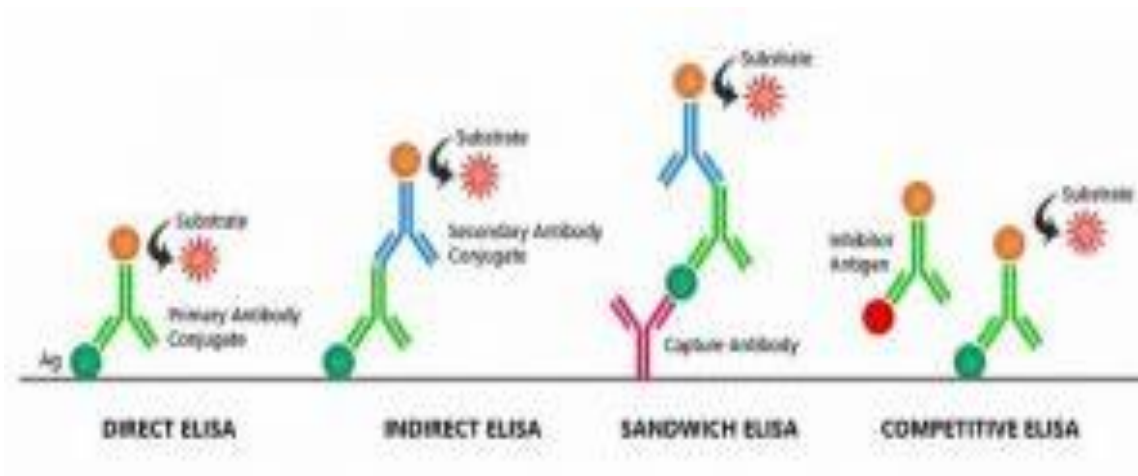
Mise en évidence **indirecte** par **un constituant** : **paroi, toxine**



→ **Technique immunologique**

- ELISA : Enzyme Linked Immuno Assay

L'anticorps reconnaît l'antigène. L'anticorps est révélé via un substrat faisant appel à une réaction enzymatique (production couleur ou fluorescence)



➡ Technique ELISA pour doser les entérotoxines de staphylocoques

# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

Mise en évidence **indirecte** par **un constituant : paroi, toxine**



## → **Technique immunologique**



- Spécificité de l'anticorps (réaction croisée)
- Fixation de l'antigène sur l'anticorps (durée, température, absence de molécules qui peuvent s'absorber de manière aspécifique ou limiter les réactions enzymatiques...)

→ Vérifier que la bactérie est vivante

# Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

## Avantages et limites des méthodes



**Directe**



Indirectes



### **Culture bactérienne**

### **PCR**

### **Méthodes immunologiques**

Germes faiblement présents → enrichissement de 18H à 48h

Délai croissance des bactéries (j)

quelques heures

Sensibilité +

++

++

Spécificité variable

++

+

Tests complé -  
mentaires souvent

obligatoire (isolement sur milieu de culture)



Information sur les performances des méthodes (normes ou dossier de validation méthodes alternatives)



# Merci de votre attention

Valérie MICHEL

Département Microbiologie Laitière  
Unité Expertise Analytique Laitière / Cecalait  
74800 La Roche sur Foron

[v.michel@actalia.eu](mailto:v.michel@actalia.eu)