



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

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

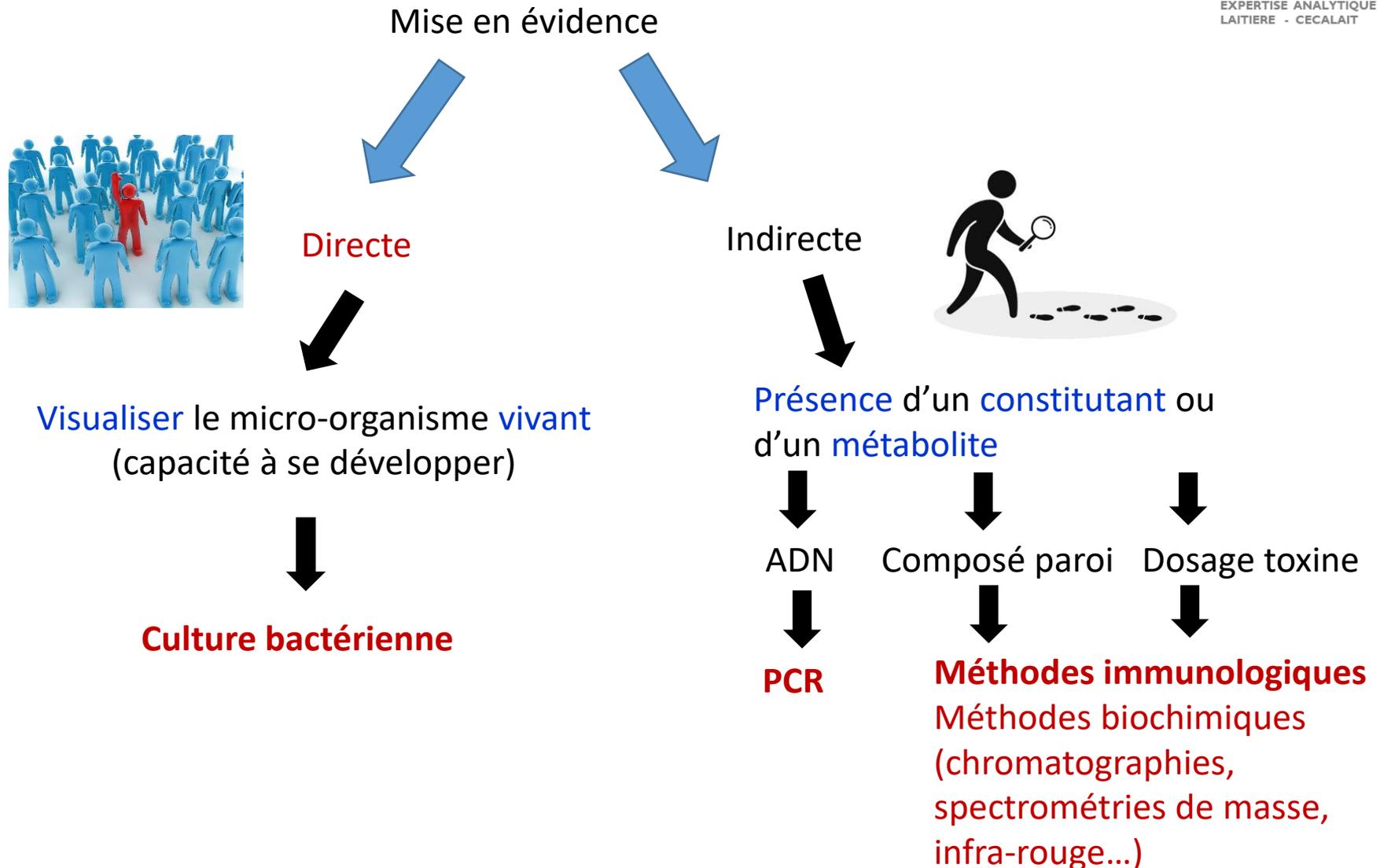


Directe

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



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**



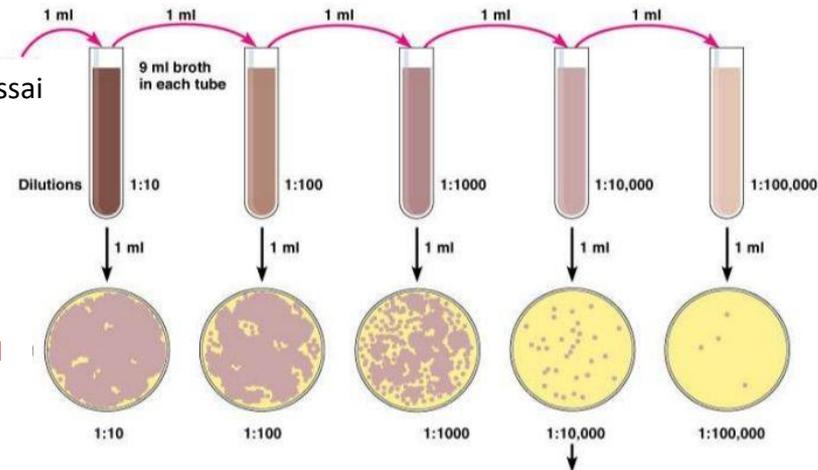
- Passer du vivant non visible (bactéries de quelques micromètres) à un élément visible à l'œil nu
- Repérer le micro-organisme au milieu des autres dans le lait
- Parfois, présent en très faible quantité → nécessite un enrichissement



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 $32 \times 10,000 = 320,000$ 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
 - Aérobic/anaérobic
 - ✓ 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 ± 1 h /37°C ± 2°C)
- Enrichissement secondaire en bouillon Fraser: (24 h ± 2 h /37°C ± 2°C)

Antibiotiques
Chlorure de
lithium, esculine,
citrate de fer

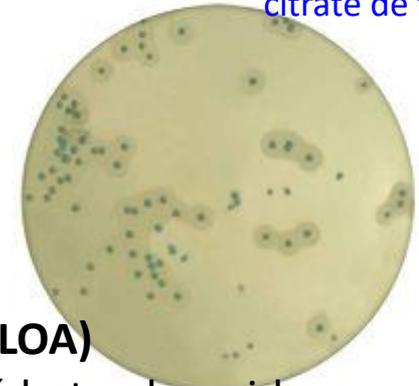
- Isolement sur gélose sélective

- 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)**



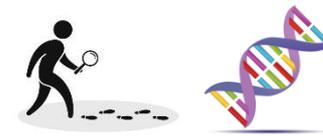
- Test complémentaire sur colonies
- Observation macroscopique : petit bacille gram +
- Test catalase : + pour *Listeria*
- Identification de l'espèce pour *L. spp* → Galerie API® *Listeria*



→ selon potentialité métabolique, distinction des différentes espèces

Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

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

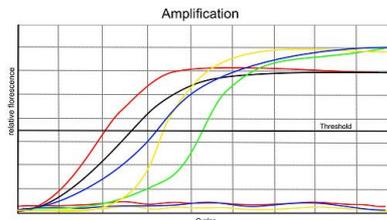
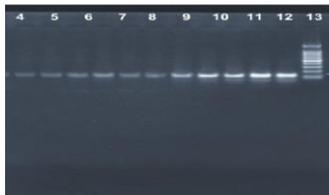
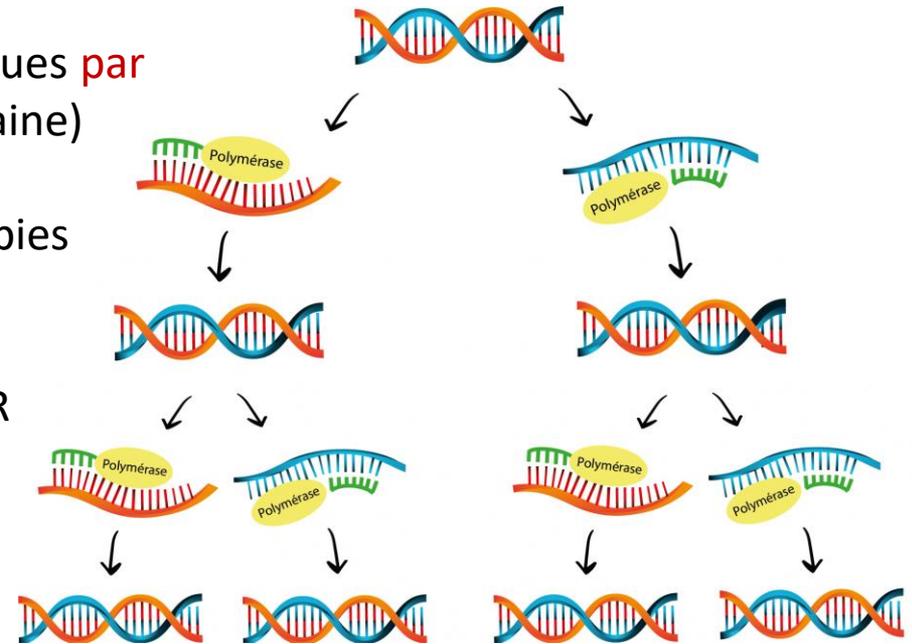


ADN : Il existe des **séquences génétiques conservées** chez les micro-organismes au niveau du genre (*Listeria*) ou de l'espèce (*Listeria monocytogenes*)
→ Possibilité de les utiliser comme marqueurs de présence de ces bactéries

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

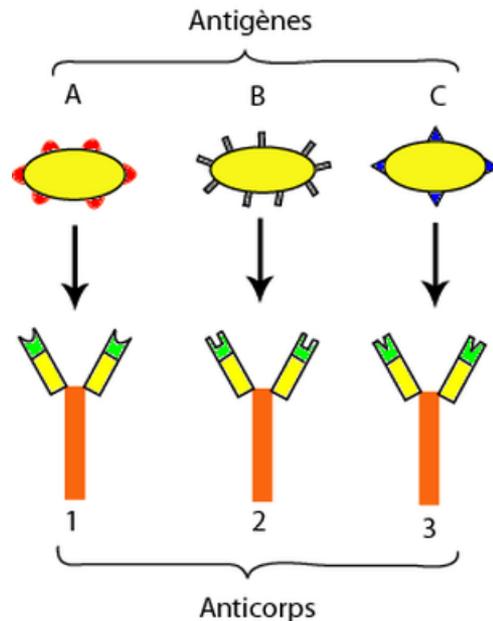
→ En cas de réaction positive,
- vérification de la présence d'une bactérie vivante (isolement sur milieu de culture semi-spécifique)

Techniques d'analyse des germes pathogènes du lait

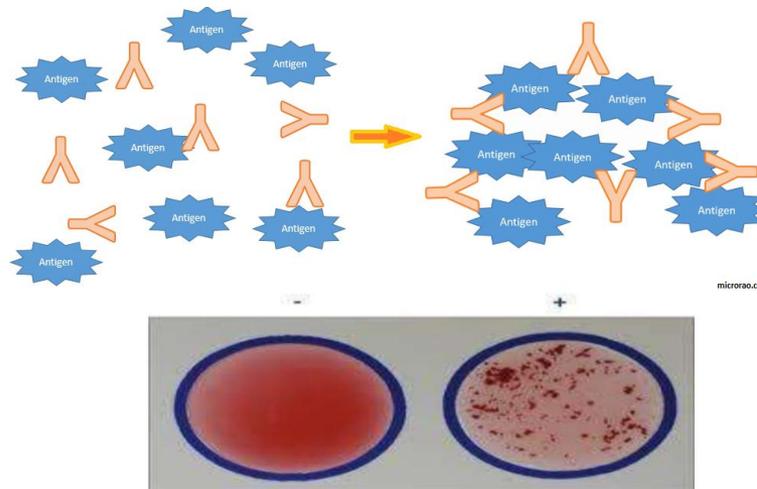
Mise en évidence **indirecte** par un **constituant** : **paroi, toxine**



- 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

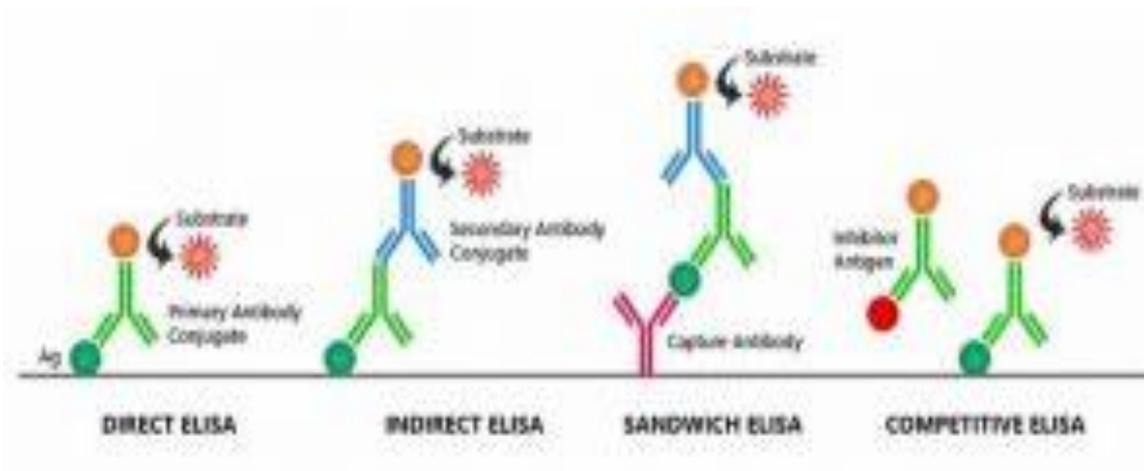
Mise en évidence **indirecte** par **un constituant** : **paroi, toxine**



→ **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 - souvent mentaires

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