

Détection rapide de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus* et *Campylobacter* spp. dans le lait cru et les sédiments de filtration du lait

Molecular-based identification of pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp. and *Streptococcus agalactiae*) in raw milk and milk filter residuals

LEONE P. (1), CREMONESI P. (1), STELLA A. (1)

(1) CNR, Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, via Einstein, 26900 LODI, Italia

INTRODUCTION

La tendance des consommateurs italiens vers un style de vie plus sain, la recherche d'aliments naturels et la valeur de la tradition oriente de plus en plus vers la consommation du lait cru et des produits dérivés. Ce lait, qui n'est pas pasteurisé, a une charge bactérienne totale qui ne peut pas dépasser des limites établies par la loi (Reg. CE n. 853/ 2004), ceci n'étant pas une garantie d'absence totale des bactéries pathogènes. Les sources de contamination du lait à la ferme sont multiples : les bactéries présentes sur les trayons, souillés par la litière contaminée par les déjections, peuvent passer dans le lait pendant la traite, ainsi que celles provenant de la poussière, la paille, les poils et les insectes. Le lait, qui peut être contaminé aussi par les pathogènes en cas de mammite, doit être filtré durant la traite, ou immédiatement après, à l'aide d'un filtre à usage unique. Celui-ci retient tous ces résidus et une partie des bactéries, sans pourtant influencer ni le nombre de cellules somatiques, ni la qualité marchande du lait. Le risque de maladies associées à la consommation du lait cru a été dernièrement évalué et les contrôles sanitaires sont de plus en plus fréquents, tout au long de la filière (Cremonesi *et al.*, 2009).

1. MATERIEL ET METHODES

Pour vérifier si l'analyse des sédiments de la filtration du lait peut constituer un outil pour la détection rapide des pathogènes présents dans le lait et dans l'élevage, nous avons analysé du lait cru et des sédiments de filtres à lait par des techniques de diagnostic moléculaire.

1.1. ECHANTILLON D'ETUDE

63 filtres à lait et 68 échantillons de lait de tank ont été collectés et analysés pour détecter les principales bactéries pathogènes responsables de mammites ou d'intoxications alimentaires, tels que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp. et *Streptococcus agalactiae*.

1.2. ANALYSE

L'extraction de l'ADN a été faite par le système analytique automatisée Maxwell 16® System Promega, directement à partir des échantillons de lait, et après enrichissement dans un milieu de culture à l'eau peptonée à partir des sédiments des filtres. Tous les ADN obtenus ont été analysés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) avec des amorces oligonucléotidiques spécifiques du génome de chacune des quatre bactéries, déterminées par le programme Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), au sein du laboratoire CNR IBBA (Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria). Les gènes cibles utilisés furent le gène 23S rRNA de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, et *Campylobacter jejuni*, et le gène 16S rRNA de *Streptococcus agalactiae*. Les témoins positifs furent les PCR des mêmes gènes de l'ADN génomique de souches de référence ATCC de chaque bactérie recherchée (LGC, Promochem, Tableau 1). Une analyse par Wilcoxon Rank Sum Test a été réalisée pour évaluer l'efficacité de chaque groupe d'échantillons (résidus de filtration *versus* lait du tank) dans le dépistage des quatre pathogènes. La présence ou l'absence d'au moins une bactérie a été attribuée à chaque groupe d'échantillons analysé, en corrigeant d'éventuels effets des principaux facteurs du milieu.

La capacité d'identification de chaque système de prélèvement des échantillons a été évaluée par une analyse de régression logistique. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS 8.2.

Tableau 1. Souches ATCC de référence employées

| Bactérie | Espèce | ATCC |
|-----------------------|---------------------------------|----------|
| <i>Bacillus</i> | <i>Bacillus cereus</i> | 14579 |
| <i>Campylobacter</i> | <i>Campylobacter coli</i> | 1061 |
| | <i>Campylobacter lari</i> | BAA 1060 |
| | <i>Campylobacter jejuni</i> | 33560 |
| <i>Staphylococcus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | 19095 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 700699 |
| <i>Streptococcus</i> | <i>Streptococcus agalactiae</i> | BAA 611 |

2. RESULTATS

Les quatre bactéries ont été détectées dans les résidus de filtration et aussi dans le lait, bien que dans ce cas avec un taux significativement inférieur (Tableau 2).

L'aptitude de l'analyse du lait et du sédiment à détecter les bactéries est significativement différente ($P < 0,0001$) et la probabilité de détecter par analyse moléculaire au moins une des bactéries a été 176 fois supérieure dans les échantillons du sédiment que dans le lait (Odd Ratio, obtenus par régression logistique).

Tableau 2. Dépistage des bactéries : % d'échantillons positifs (P) parmi le total des analyses (A)

| Bactérie | Filtres | | Lait du tank | |
|----------------------|---------|----|--------------|---|
| | A | P | A | P |
| <i>S. aureus</i> | 63 | 54 | 68 | 0 |
| <i>B. cereus</i> | 63 | 81 | 68 | 4 |
| <i>C. jejuni</i> | 63 | 86 | 68 | 3 |
| <i>S. agalactiae</i> | 56 | 9 | 59 | 9 |

CONCLUSION

L'analyse par PCR permet de détecter les pathogènes dans le sédiment de la filtration d'une façon significativement supérieure aux échantillons issus du lait de tank. Ce résultat est très intéressant car normalement ces bactéries sont diluées dans l'ensemble de la microflore du lait et elles ne peuvent être identifiées que lorsqu'elles atteignent une teneur de niveau élevé, auquel elles sont déjà dangereuses pour la santé humaine. Cette analyse permet aux éleveurs d'avoir un regard global sur l'état de santé de l'élevage et de réduire le nombre d'analyses du lait par culture bactériologique standard (Reg. CE n. 2073/2005), technique qui est plus coûteuse et moins rapide que les méthodes moléculaires.

Cremonesi P, Pisoni G, Severgnini M, Consolandi C, Moroni P, Raschetti M, Castiglioni B. 2009. J Dairy Sci. Jul ; 92(7), 3027-39.