

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 1996



106 023983 7

THESE N° 306

1/1

**RECHERCHE DE *LISTERIA*
DANS LE LAIT DE CHEVRE**

THESE

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le 5 Février 1996

par

- Stéphanie ROSIER

née le 28 Juillet 1971 à Limoges (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur C. BOSGIRAUD..... PRESIDENT
Monsieur G. HABRIOUX, Professeur à l'Université de Limoges..... JUGE
Monsieur R. ARNAUD, Docteur vétérinaire à la DSV..... JUGE
Madame A. MARIE-DARAGON, Docteur en Pharmacie..... JUGE

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM Axel
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE - PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE -CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGÉ Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MÆSCH Christian	HYGIENE
OUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse.

A MES PARENTS

A PIERRE EMMANUEL

A MES FRERES

A MA FAMILLE

A MES AMIS.

A MADAME LE PROFESSEUR C.BOSGIRAUD

Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Parasitologie

(Faculté de Pharmacie de Limoges)

Vous nous avez inspiré ce travail et avez mis à notre disposition tous les moyens nécessaires à sa réalisation.

Nous vous exprimons nos plus sincères remerciements pour vos conseils et pour le temps que vous avez consacré à ce travail.

Soyez assurée de notre profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. HABRIOUX

Professeur des Universités de Biochimie Fondamentale

(Faculté de Pharmacie de Limoges).

Nous avons été votre élève, et c'est un très grand honneur que vous nous avez fait en acceptant de juger ce travail.

Très respectueusement, nous tenons à vous en exprimer notre gratitude.

A MONSIEUR R. ARNAUD

Docteur Vétérinaire à la DSV

Vous nous avez fait le très grand honneur de participer à ce jury.

Nous vous exprimons nos sincères remerciements.

A MADEMOISELLE A.MARIE-DARAGON

Docteur en Pharmacie et Assistante des Hôpitaux

Vous avez très aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Soyez assurée de nos sentiments reconnaissants.

A MADAME R. MOUZET

Technicienne au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Parasitologie de la
Faculté de Pharmacie de Limoges.

Pour votre accueil chaleureux et votre précieuse aide.

Nous vous exprimons nos sincères remerciements.

AU LABORATOIRE DEPARTEMENTAL D'ANALYSES ET DE
RECHERCHES DE LA HAUTE VIENNE

Nous vous remercions de nous avoir fourni les supports
nécessaires à la réalisation de ce travail.

Nous vous prions de trouver ici, l'expression de toute notre
reconnaissance.

A MES PARENTS

Je vous remercie de m'avoir soutenue tout au long de l'élaboration de cette thèse.

Recevez ce travail en témoignage de ma profonde affection.

A PIERRE EMMANUEL

Pour l'écoute, le soutien et la patience dont tu as su faire preuve, je t'exprime mes sincères remerciements.

En recevant ce travail, soit assuré de tout l'amour que je te porte.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE RECHERCHE DES LISTERIA DANS LE LAIT

I-PRINCIPE DE L'ENRICHISSEMENT SELECTIF

I-1-TECHNIQUE D'ENRICHISSEMENT AU FROID DE GRAY

I-2-INHIBITEURS CHIMIQUES

II-LES METHODES

II-1-METHODE FDA : PRECONISEE PAR LA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION

II-2-NORME FIL

II-3-AUTRES PROTOCOLES UTILISES PAR CERTAINS LABORATOIRES DE CONTRÔLE

II-3-1-Dans le lait

II-3-2-Dans les fromages

III-IDENTIFICATION

III-1-CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES COMMUNS AU GENRE LISTERIA

III-2-DIFFERENCIATION ENTRE LES ESPECES DE LISTERIA

III-3-TYPAGE

III-3-1-Sérotypage

III-3-2-Lysotypage

IV-METHODES RAPIDES DE DETECTION DES LISTERIA

IV-1-LISTERTEST

IV-2-LISTERSCREEN

IV-3-LISTERIA RAPID TEST

IV-4-METHODE MALTHUS

IV-5-LISTERIA DETECTION KIT

IV-6-GENE-TRAK ET GENPROBE

DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION PERSONNELLE

I-MATERIEL ET METHODES

I-1-ECHANTILLONS DE LAITS

I-2-MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS

I-2-1-Bouillon d'enrichissement primaire

I-2-2-Bouillon d'enrichissement secondaire

I-2-3-Supplément Fraser

I-2-4-Gélose Palcam

I-2-5-Gélose trypticase soja

I-2-6-Coloration de Gram

I-2-7-Recherche de la catalase

I-2-8-Eau peptonée

I-2-9-Gélose nitrate

I-2-10-Gélose au sang de mouton

I-2-11-CAMP-test

I-2-12-Galerie Api-Listeria

I-3-PROTOCOLE SUIVI SELON LA NORME AFNOR V08-055

II-RESULTATS

II-1-ISOLEMENT DES LISTERIA

II-2-IDENTIFICATION DU GENRE

II-3-DIFFERENCIATION DES ESPECES DE LISTERIA

II-4-RESULTATS DES LAITS DE VACHES

II-5-RESULTATS DES LAITS DE CHEVRES

II-5-1-Première série de 57 laits de chèvres C1 à C57

II-5-2-Deuxième série de 42 laits de chèvres C58 à C99

III-DISCUSSION

CONCLUSION

ANNEXE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Les *Listeria* et plus particulièrement *Listeria monocytogenes* qui sont responsables de la listériose humaine et animale, suscitent un intérêt nouveau depuis l'observation de flambées épidémiques, en particulier sur le continent Nord-Américain et en Europe.

L'origine alimentaire de la listériose humaine est désormais bien établie.

Le lait fut suspecté dès 1953 par Potel comme un mode possible de transmission de la listériose à l'homme, mais ce n'est qu'à partir de 1983 avec l'épidémie de Boston que l'attention a été attirée sur cet aliment.

Dans ce travail, notre intérêt porte sur le lait et en particulier le lait cru de chèvre.

Dans une première partie, nous présentons une liste non exhaustive des différentes techniques de recherche et d'identification des *Listeria* dans le lait et produits laitiers, couramment utilisées par les laboratoires. Il s'agit des méthodes classiques de détection des *Listeria* et depuis peu, de nouvelles techniques de détection rapides.

Puis dans notre expérimentation personnelle, nous recherchons des *Listeria* à partir d'échantillons de laits crus de chèvres, selon le protocole préconisé par l'association française de normalisation (AFNOR), qui actuellement est appliqué par la majorité des laboratoires pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires et agricoles.

PREMIERE PARTIE :
LES DIFFERENTES TECHNIQUES
DE RECHERCHE DES LISTERIA
DANS LE LAIT

Il existe différentes méthodes pour la recherche des *Listeria* dans les aliments, en particulier dans le lait et les produits laitiers.

Dans la plupart des cas le nombre de *Listeria* contenu dans l'échantillon est faible, ce qui nécessite des méthodes d'enrichissement sélectif souvent assez longues (8).

Lorsque les cellules bactériennes ont subi des altérations sublétales, une étape de pré-enrichissement en milieu peu ou pas sélectif est souvent bénéfique : milieu UVLM I sans agent sélectif pendant 24 heures à 30° C, bouillon Columbia 6 heures à 20° C (8).

I-PRINCIPE DE L'ENRICHISSEMENT SELECTIF

L'enrichissement est basé sur le principe d'incubation de l'aliment à analyser en milieu liquide en présence ou non d'une substance inhibant les autres micro-organismes. Ceci permet d'obtenir un enrichissement spécifique en *Listeria* (8).

I-1-TECHNIQUE D'ENRICHISSEMENT AU FROID DE GRAY (8)

Les *Listeria* ont la propriété de se multiplier à +4° C : ce sont des bactéries psychrotrophes. La méthode consiste à placer les échantillons à analyser à une température de +4° C pendant plusieurs semaines à un mois ou plus.

Les échantillons sont mis au froid tels quels (lait) ou broyés dans un bouillon nutritif ou dans de l'eau distillée stérile.

I-2-INHIBITEURS CHIMIQUES

Les *Listeria* étant résistantes à de nombreux inhibiteurs physico-chimiques, de nombreux milieux d'enrichissement et milieux d'isolement sélectifs ont été mis au point depuis ces dernières années (17).

Le tableau 1 suivant regroupe les principaux inhibiteurs chimiques contenus dans ces milieux.

Tableau 1 :

Exemples d'inhibiteurs utilisés dans les milieux sélectifs pour *Listeria* d'après Ryser et Marth, 1991 (8).

MOLÉCULE	Concentration par litre	MICROORGANISMES INHIBÉS
Acriflavine	10 mg	Gram +, y compris <i>Lactobacillus bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i>
Bacitracine	5 000 IU	Gram +
Céfotétan	4 - 8 mg	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ceftazidime	50 mg	Large spectre
Colistine	20 mg	Gram -
Cycloheximide	50 mg	Champignons
Fosfomycine	64 - 512 mg	Large spectre, y compris <i>Staphylococcus aureus</i>
Furacine	10 mg	<i>E. coli</i> , <i>Micrococcus</i>
Laxamoxef	4 mg	<i>Staphylococcus aureus</i>
Chlorure de lithium	0,5 mg	Gram - sauf <i>Pseudomonas</i>
Moxalactame	20 mg	Large spectre
Acide nalidixique	40 mg	Gram - sauf <i>Pseudomonas</i> et <i>Proteus</i>
Acide oxolinique	15 - 20 mg	Large spectre
Phényléthanol	2,5 ml	Gram - et <i>Proteus</i>
Polymyxine B	16 000 IU	Gram -, y compris <i>Pseudomonas</i> Quelques Gram +
Tellurite de K	0,5 g	Gram -
Thiocyanate de K	3,75 g	La plupart des Gram -, <i>Bacillus</i> , corynéformes
Propolis	15 mg	Gram + y compris <i>Staphylococcus</i> et <i>Streptococcus</i>
Rivanol	25 mg	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pseudomonas</i>
Thallium acétate	0,2 g	Gram -
Trypaflavine	40 mg	Cocci Gram +

Parmi les bouillons d'enrichissement (Tableau 2) les plus utilisés on retiendra par exemple :

- Enrichment Broth préconisé par la FDA (EB) (17),
- *Listeria* Enrichment Broth (LEB) décrit par Donnelly et Baigent (17),
- bouillon Fraser.

De même, les géloses sélectives pour l'isolement contiennent des agents sélectifs généralement identiques à ceux utilisés dans les bouillons d'enrichissement, mais dans des proportions différentes (17).

Les plus employées sont (17, 8) :

- la gélose Oxford qui depuis 1990 a remplacé le milieu Mac Bride Modifié (MMA),
- la gélose Palcam,
- la gélose Lee et Mac Lain (LPM).

Tableau 2 :

Composition de milieux sélectifs utilisés pour l'isolement de *Listeria* (17).

Désignation	Additifs
Bouillon EB	acriflavine, acide nalidixique, cycloheximide
Bouillon LEB	acriflavine, acide nalidixique, esculine
Bouillon Dominguez	acide nalidixique, polymyxine
Bouillon Yousef	acriflavine, acide nalidixique, cycloheximide, citrate trisodique
Gélose MMA	Chlorure de lithium, cycloheximide, glycine anhydre
Gélose LPM	chlorure de lithium, moxalactam, glycine anhydre
Gélose AC	acriflavine, ceftazidine
« Modified Vogel-Johnson agar »	acide nalidixique, moxalactam, tellurite de potassium
Gélose PALCAM	acide nalidixique, polymyxine, acriflavine, chlorure de lithium, moxalactam, esculine, citrate ferrique ammoniacal
Gélose Oxford	chlorure de lithium, citrate ferrique ammoniacal, colistine, cefotétan, cycloheximide, esculine, fosfomycine

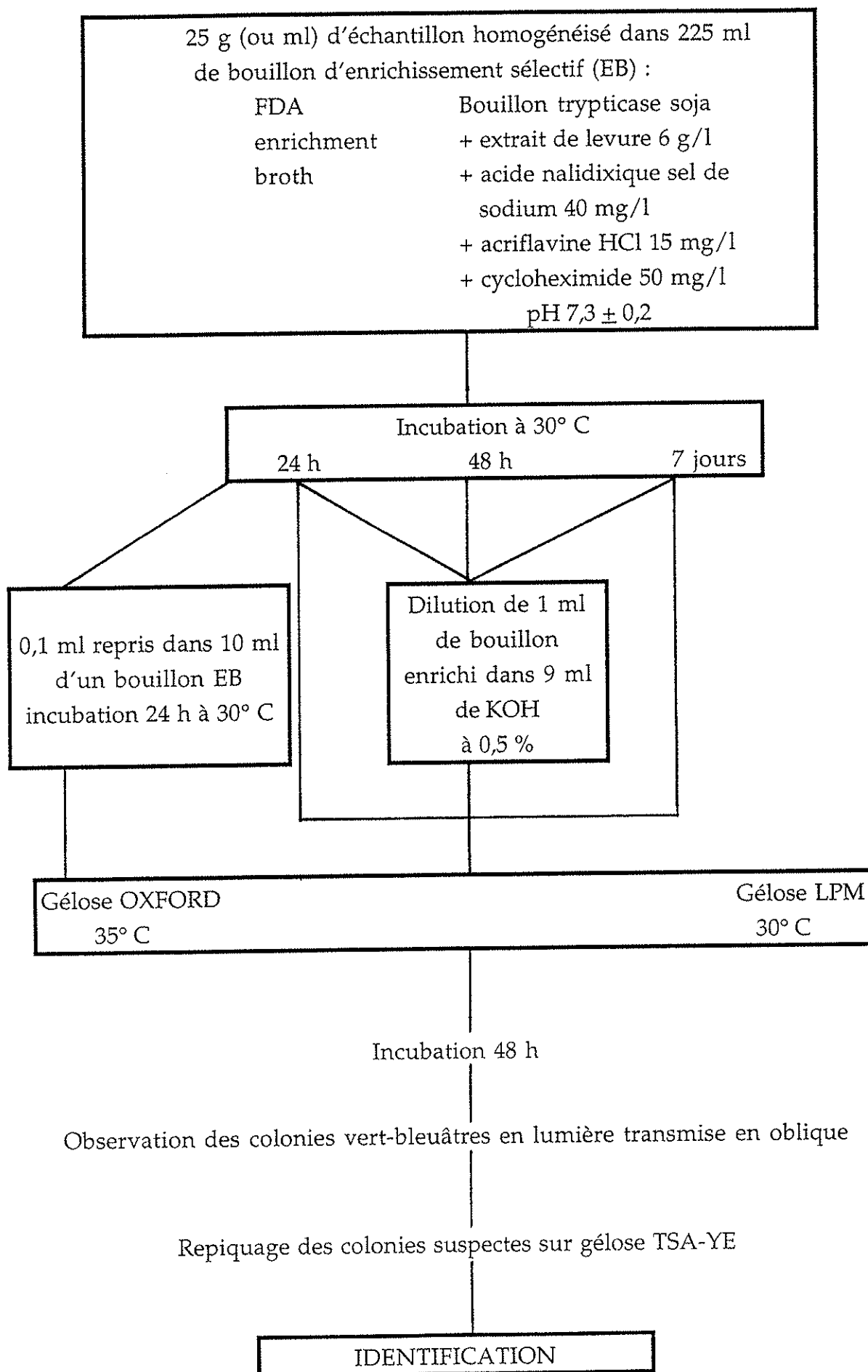
II-LES METHODES

La liste des méthodes qui suit n'est pas exhaustive ; seules les méthodes les plus utilisées et les plus appropriées à la recherche des *Listeria* dans le lait et produits laitiers figurent ci-dessous.

II-1-METHODE FDA : PRECONISEE PAR LA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION

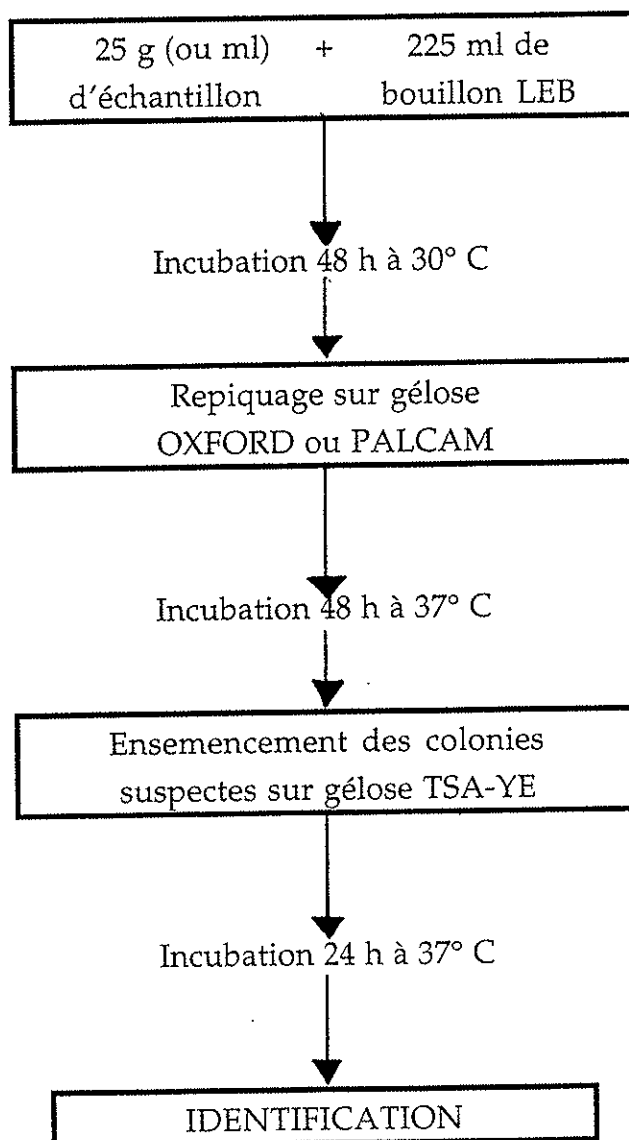
La technique FDA est une méthode officielle qui a été développée à la suite de l'épidémie de 1983 dans le Massachussets (17).

Cette méthode peut être utilisée pour la recherche des *Listeria* dans les produits laitiers (3).



II-2-NORME FIL (Fédération Internationale de Laiterie) (8)

Norme FIL 143-1993 F ISO/CD 10560.

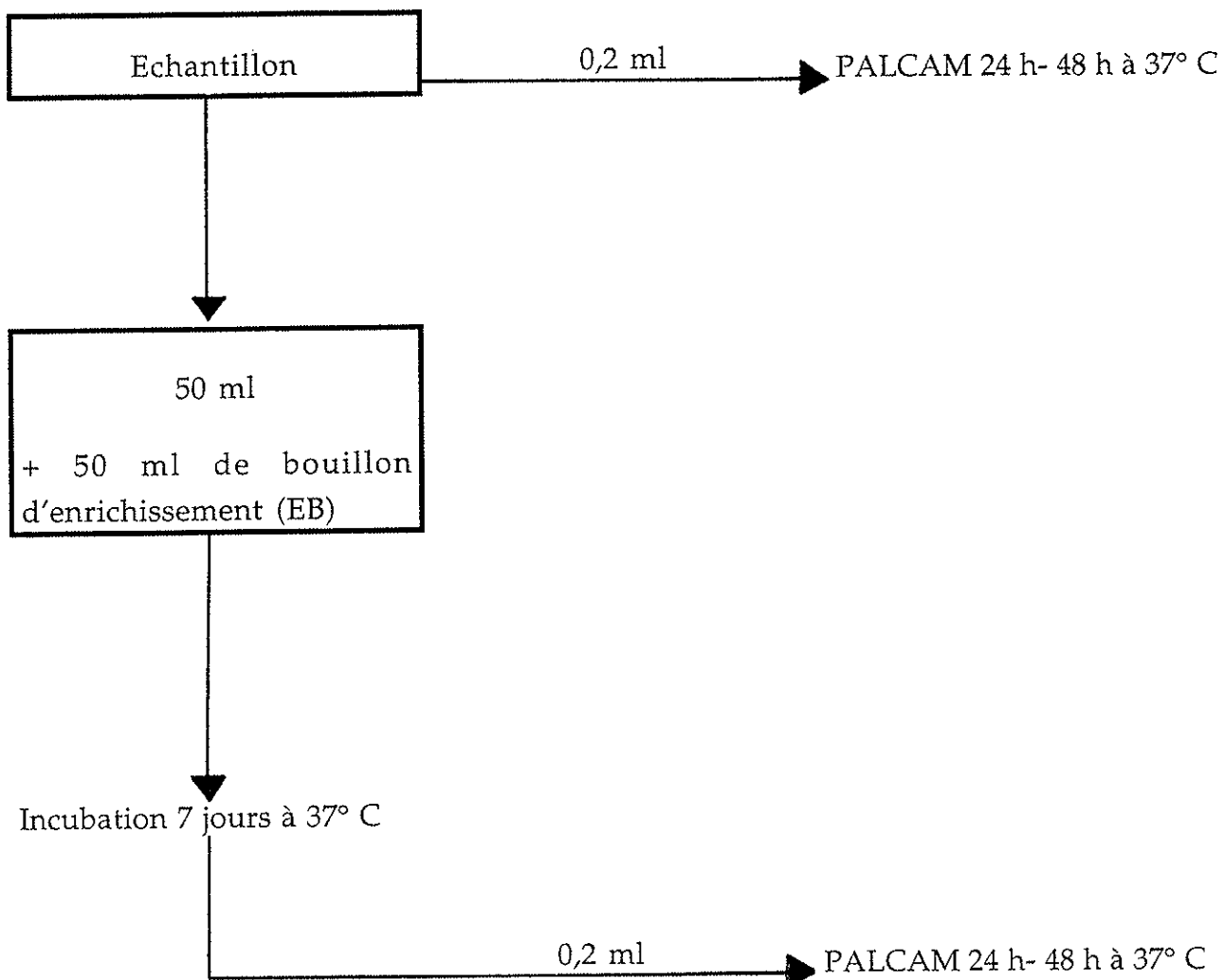


On peut choisir entre la gélose Oxford, Oxford modifié (Mox) ou Palcam qui ont des performances proches. Cependant, à partir des géloses Oxford et Mox on observe parfois un mélange de *Listeria* avec d'autres micro-organismes, et le choix des colonies est quelquefois délicat (3).

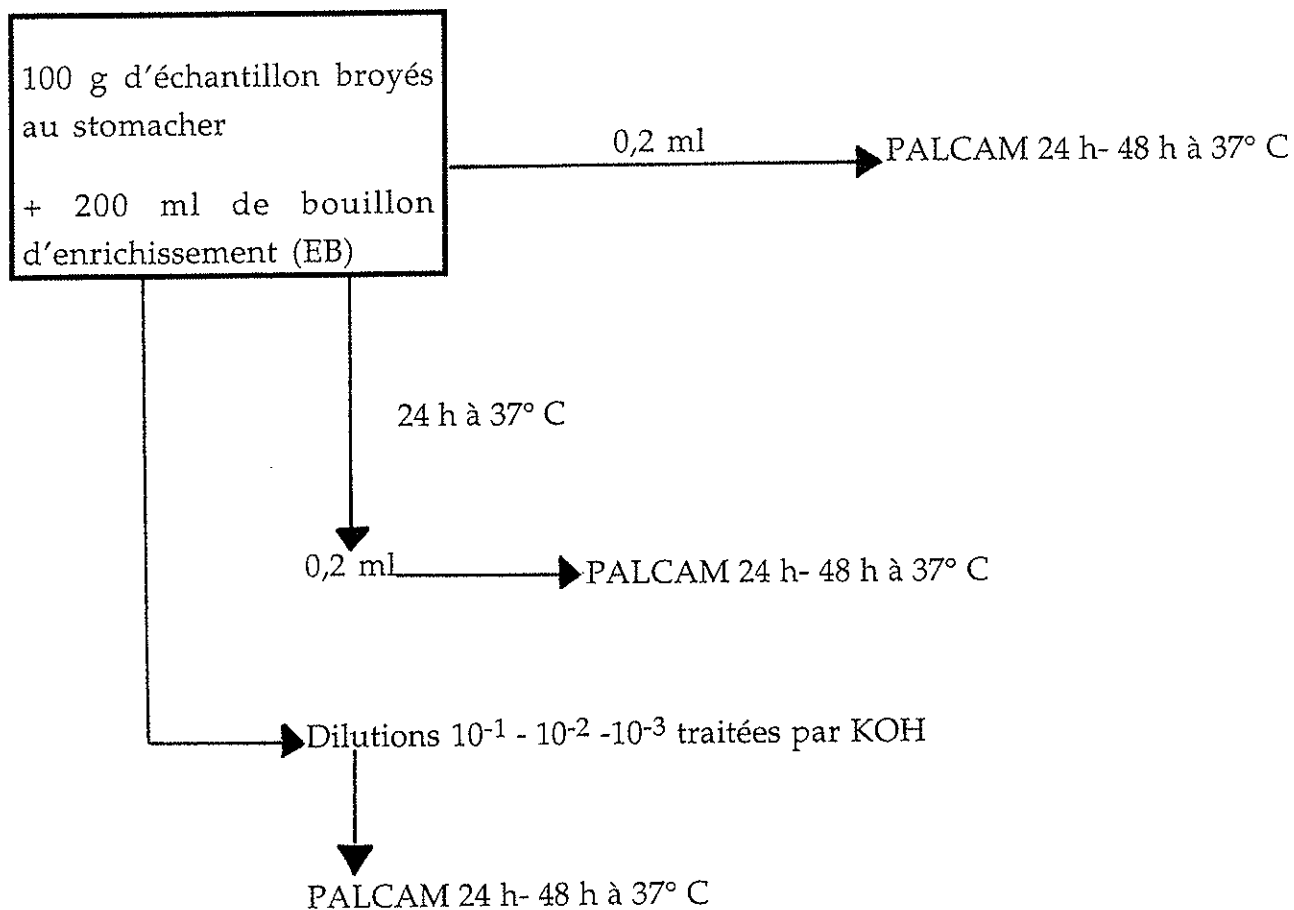
II-3-AUTRES PROTOCOLES UTILISES PAR CERTAINS LABORATOIRES DE CONTRÔLE

Par rapport à la norme AFNOR que nous avons utilisée et qui sera développée dans la deuxième partie expérimentale de ce travail, il existe d'autres protocoles publiés et employés par certains laboratoires.

II-3-1-Dans le lait (8)



II-3-2-Dans les fromages (8, 4)



Dans le but d'un dénombrement, on ensemence 0,2 ml de 3 dilutions successives 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³ de ce bouillon d'enrichissement à raison de 1 ml dans 9 ml d'une solution stérile de KOH à 0,5 % dans l'eau déminéralisée stérile (3).

III-IDENTIFICATION

Le genre *Listeria* est constitué de sept espèces : *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* et *L. murrayi* ; ces deux dernières espèces ont été classées dans le Bergey's manual (18) comme appartenant au genre *Murraya* avec deux souches : *Murraya grayi* subsp *grayi* et *Murraya grayi* subsp *murrayi*.

L'identification des *Listeria* nécessite dans un premier temps la mise en évidence d'un certain nombre de caractères morphologiques et biochimiques qui définissent le genre, et dans un deuxième temps, la différenciation des espèces de *Listeria* à l'aide de critères d'identification rapides et significatifs.

Il existe d'autres techniques permettant des caractérisations plus fines des souches de *Listeria* :

- le sérotypage basé sur l'identification de l'antigène pariétal et de l'antigène flagellaire des *Listeria*.
- le lysotypage qui utilise des bactériophages pour une caractérisation des souches encore plus précise.

III-1-CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES COMMUNS AU GENRE LISTERIA

L'ensemble des caractères permettant l'identification du genre *Listeria* est largement décrit dans le "Bergey's manual of systematic bacteriology" (18) et figurent dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractères morphologiques et biochimiques du genre *Listeria* (14, 15).

Bacille Gram +	Esculine hydrolysée
Asporulé	VP + (Voges Proskauer)
Non capsulé	RM+ (Rouge de Méthyl)
Mobile à 20-25° C et immobile à 37° C	Uréase -
Aéro-anaérobie	Indole et H ₂ S non produits
Catalase +, oxydase -	Gélatinase - (non protéolytique).
Fermente le glucose sans gaz	

III-2-DIFFERENCIATION ENTRE LES ESPECES DE LISTERIA

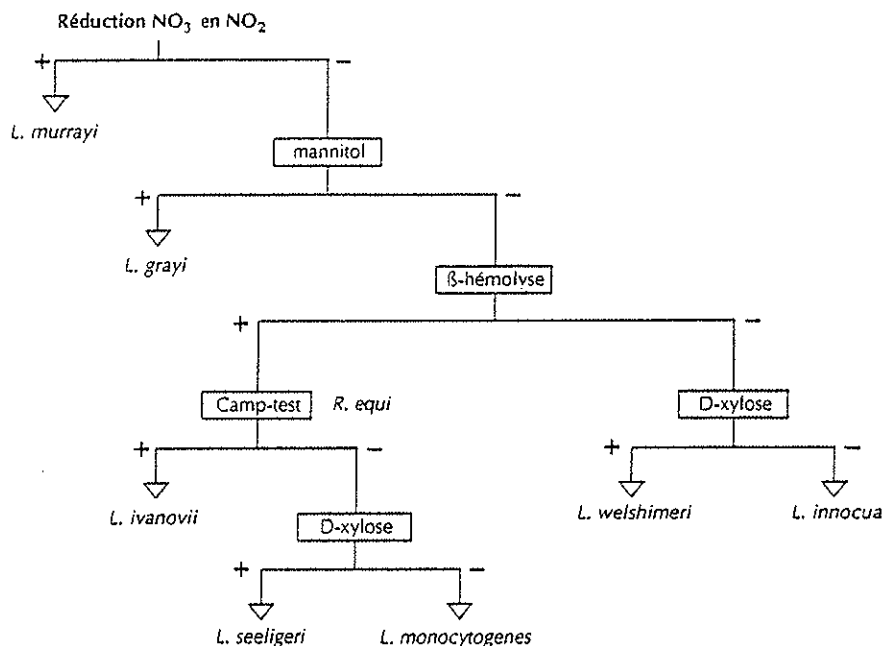
La différenciation des espèces est basée sur la recherche de 4 caractères (tableaux 4 et 5) :

- hémolyse spontanée sur gélose au sang de mouton,
- CAMP-test avec *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*,
- production d'acide à partir du D-xylose, L-rhamnose, α -méthyl-D-mannoside, D-mannitol,
- réduction des nitrates.

Tableau 4 : Différenciation des *Listeria* (13).

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>	<i>L. dermatificans</i>
Hémolyse β sur gélose au sang	+	++	-	-	(+)	-	-	-
Réduction des nitrates en nitrites	-	-	-	-	-	-	+	+
CAMP test avec <i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	(+)	-	-	-
CAMP test avec <i>Rhodococcus equi</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
Production d'acides à partir de :								
D-mannitol	-	-	-	-	-	+	+	-
L-rhamnose	+	-	V	V	-	-	V	-
D-xylose	-	+	-	+	+	-	-	+
α -méthylD-mannoside	+	-	+	+	V	NT	NT	NT

V = réaction variable NT = non testé () = réaction faible.

Tableau 5 : Différenciation biochimique des *Listeria* (8).

Seule *L. murrayi* réduit les nitrates en nitrites, ce qui la différencie des autres espèces de *Listeria*.

L. murrayi et *L. grayi* fermentent le mannitol.

Seules *L. seeligeri*, *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* possèdent une activité bêta-hémolytique spontanée sur gélose au sang de mouton et sont différenciées par le CAMP-test et par la production ou non d'acide à partir du D-xylose, L-rhamnose, α-méthyl-D-mannoside.

L. welshimeri se différencie de *L. innocua* par sa production d'acide à partir du D-xylose.

Le système plus classique de caractérisation des *Listeria* par les tests biochimiques et qui est plus couramment utilisé, est le système Api-*Listeria*. L'identification est réalisée en 24 heures, sans nécessité de tests complémentaires (8).

III-3-TYPAGE

Lors d'investigations épidémiologiques, une caractérisation très fine des souches isolées dans l'aliment suspect et chez le patient est nécessaire.

Pour cela des méthodes de typage sont utilisées pour caractériser *Listeria*.

III-3-1-Sérotypage

L'étude des antigènes somatiques (antigène O) et des antigènes flagellaires (antigènes H) réalisée en 1939 par Paterson puis plus tard par Seeliger et Höhne, a permis d'aboutir à la classification actuelle des *Listeria* (9, 10).

On distingue 15 antigènes somatiques (I à XV) et 5 antigènes flagellaires (A à E) (9).

La combinaison de ces différents facteurs dans une même bactérie permet de reconnaître 16 sérovars : 1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3a, 3b, 3c, 4 a, 4 ab, 4 b, 4 c, 4 d, 4 e, 7,5, 6 a, 6 b (Tableau 6).

Le typage sérologique de *Listeria* peut s'effectuer à l'aide d'anticorps commercialisés par le laboratoire DIFCO.

Malheureusement, seules les souches du séroroupe 1 et 4 peuvent être distinguées (8).

En France, seul le Centre de Référence des *Listeria* (Institut Pasteur) effectue des sérotypages approfondis (7, 8).

Tableau 6 : Sérovars du genre *Listeria* (9).

ESPÈCES	SÉROVARS	ANTIGÈNES SOMATIQUES (O)	ANTIGÈNES FLAGEL.
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2a	I II (III)	A B
	1/2b	I II (III)	A B C
	1/2c	I II (III)	B D
	3a	II (III) IV	A B
	3b	II (III) IV (XII XIII)	A B C
	3c	II (III) IV (XII XIII)	B D
	4a	(III) (V) VIII IX	A B C
	4ab	(III) V VI VIII IX X	A B C
	4b	(III) V VI	A B C
	4c	(III) V VII	A B C
	4d	(III) (V) VI VIII	A B C
	4e	(III) V VI (VIII) IX	A B C
7	(III) XII XIII	A B C	
<i>Listeria ivanovii</i>	5	(III) (V) VI (VIII) X	A B C
<i>Listeria innocua</i>	6a	(III) V (VI)(VII) (IX) XV	A B C
	6b	(III) (V) (VI)(VII) IX X XI	A B C
	4ab	(III) V VI VII IX X	A B C
<i>Listeria welshimeri</i>	1/2b	I II (III)	A B C
	4c	(III) V VII	
	6a	(III) V (VI) (VII) (IX) XV	
	6b	(III) (VII) IX X XI	
<i>Listeria seeligeri</i>	1/2a	I II (III)	A B
	1/2b	I II (III)	A B C
	1/2c	I II (III)	B D
	4b	(III) V VI	A B C
	4c	(III) V VII	A B C
	4d	(III) (V) VI VIII	A B C
6b	(III) (V) (VI)(VII) IX X XI	A B C	
<i>M. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>		(III) XII XIV	E
<i>M. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>		(III) XII XIV	E

III-3-2-Lysotypage

La lysotypie permet de caractériser les souches de façon plus précise.

La sensibilité de *L. monocytogenes* a différents phages permet de distinguer de nombreux lysotypes à l'intérieur même des sérotypes (8).

On dénombre actuellement 25 lysotypes parmi les souches des sérovars 1/2 a, 1/2 b et 1/2 c et 119 pour celles des sérovars 4 (14).

L'utilisation de cette méthode a permis de tirer des conclusions quant à l'origine de certains foyers épidémiques (9, 16).

Cependant, cette méthode a des limites car de nombreuses souches sont résistantes aux phages (10, 17).

Seuls deux laboratoires pratiquent ce test en France (8) :

- le laboratoire du Docteur ROCOURT à l'Institut Pasteur de Paris,
- le laboratoire de Microbiologie et d'Hygiène Hospitalière du Professeur AUDURIER à l'Hôpital TROUSSEAU - CHR de Tours.

IV-METHODES RAPIDES DE DETECTION DES LISTERIA

Les méthodes nouvelles de détection des *Listeria* directement à partir des produits alimentaires présentent deux avantages : la rapidité et le dénombrement des bactéries dans certains cas (6).

IV-1-LISTERTEST (6, 19, 20)

Le ListerTest (AES Laboratoire) est une technique basée sur la séparation immunomagnétique, permettant l'isolement et la numération des *Listeria* en 24 heures.

Les bactéries sont capturées par des billes magnétiques microscopiques, sur lesquelles sont fixés des anticorps anti-*Listeria* spécifiques.

Il n'est pas nécessaire de réaliser une étape de pré-enrichissement. En fait, les bactéries vont pouvoir se développer sur les billes, ce qui constitue l'étape d'enrichissement, d'où un gain de temps appréciable.

Par l'action d'un champ magnétique, sous forme d'un aimant, les billes vont se séparer des autres micro-organismes présents dans l'échantillon et ainsi se concentrer ; puis elles vont être lavées et étalées sur un milieu gélosé non sélectif, suivi d'une incubation de 18 à 20 heures à 37 ° C (Figure 1).

Lorsque les colonies bactériennes se sont développées, une membrane de nitrocellulose est déposée sur la boîte de Pétri de façon à obtenir une empreinte des colonies à analyser.

Une solution d'anticorps monoclonaux spécifiques va réagir avec les bactéries fixées à la membrane. Puis une seconde série d'anticorps marqués par une enzyme, la phosphatase alcaline, va se lier aux premiers.

En ajoutant un substrat, il va apparaître des "spots" colorés sur la membrane permettant de localiser et dénombrer les colonies de *Listeria* sur la boîte de Pétri (Figure 2).

Figure 1 : Principe de l'immunocapture du ListerTest (20).

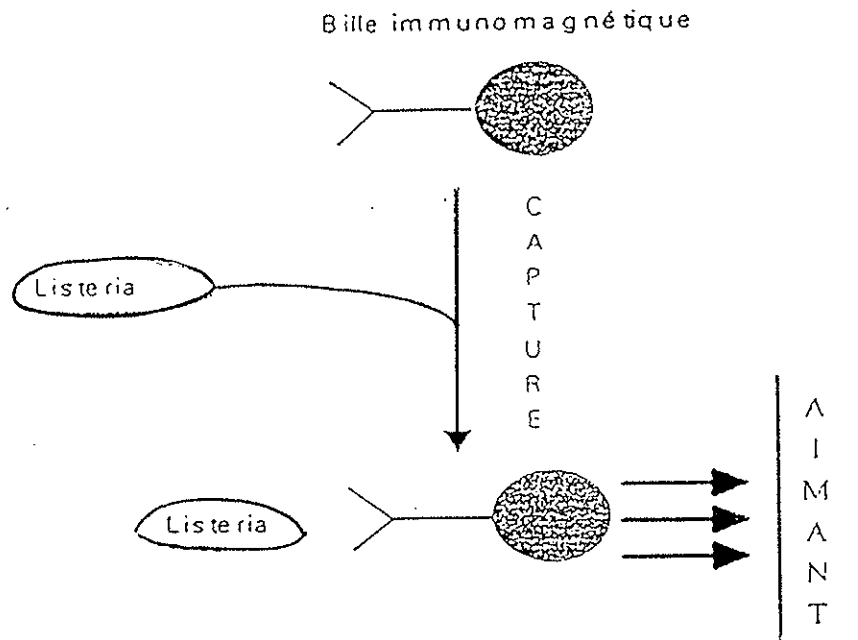
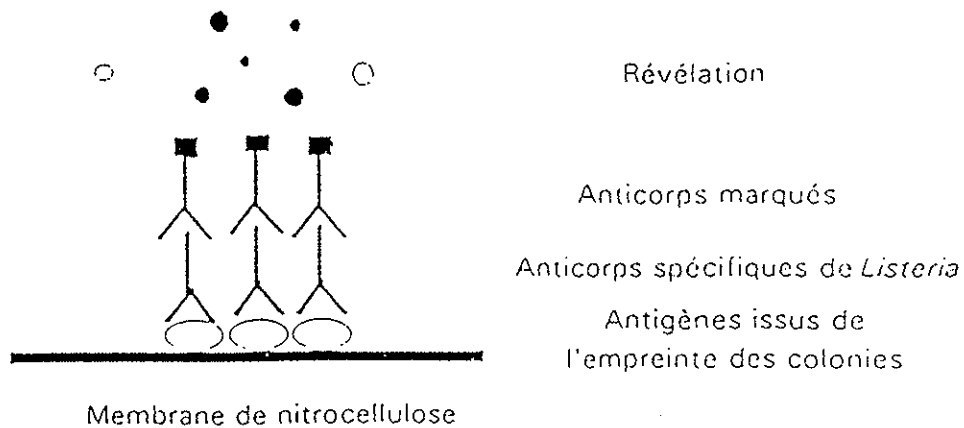


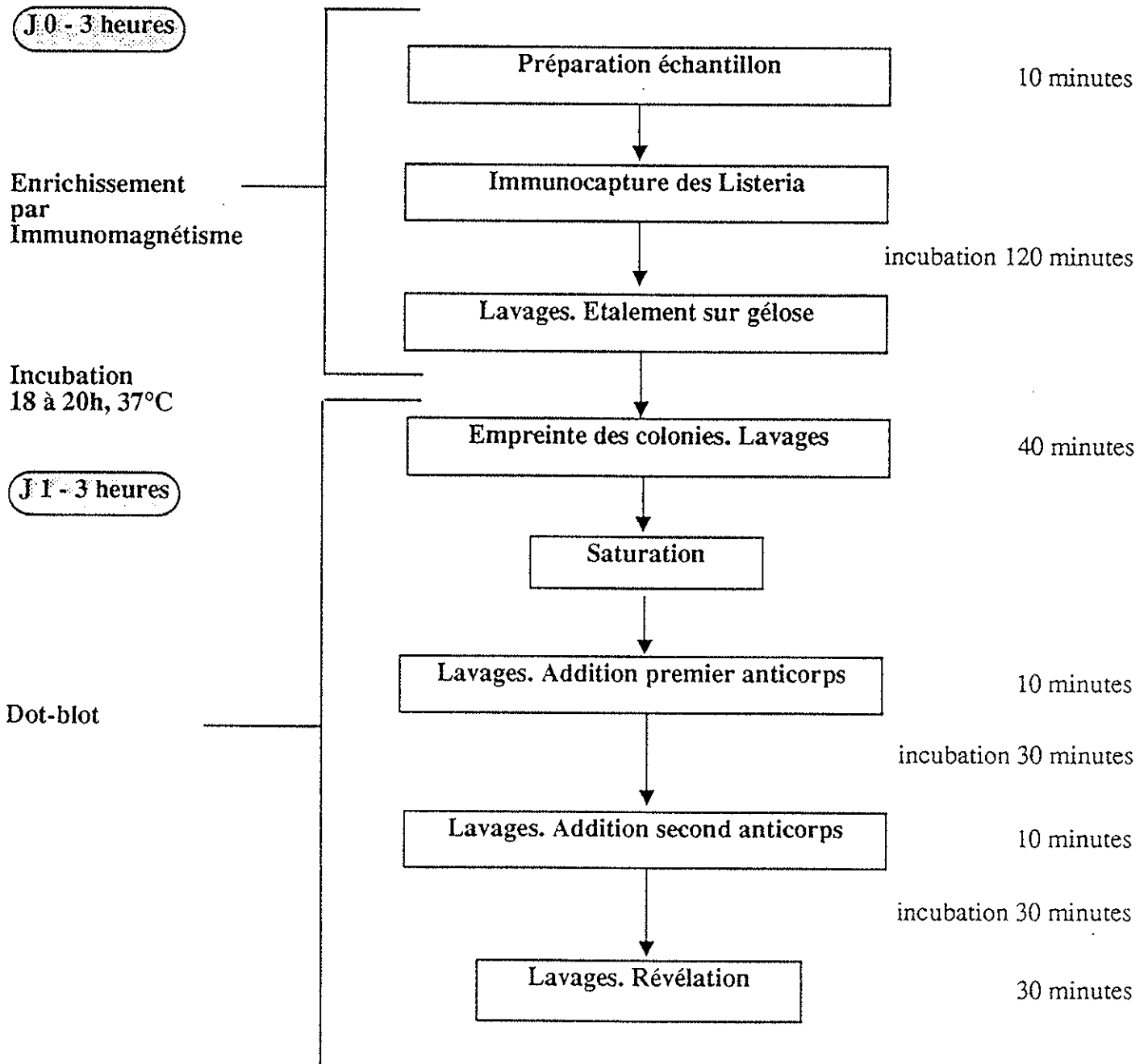
Figure 2 : Principe de l'immunoempreinte (20).



Le ListerTest est quantitatif et permet d'exprimer le résultat par nombre de bactéries : nombre de CFU/g.

PROTOCOLE DU LISTERTEST

DIFFERENTES ETAPES DU TEST

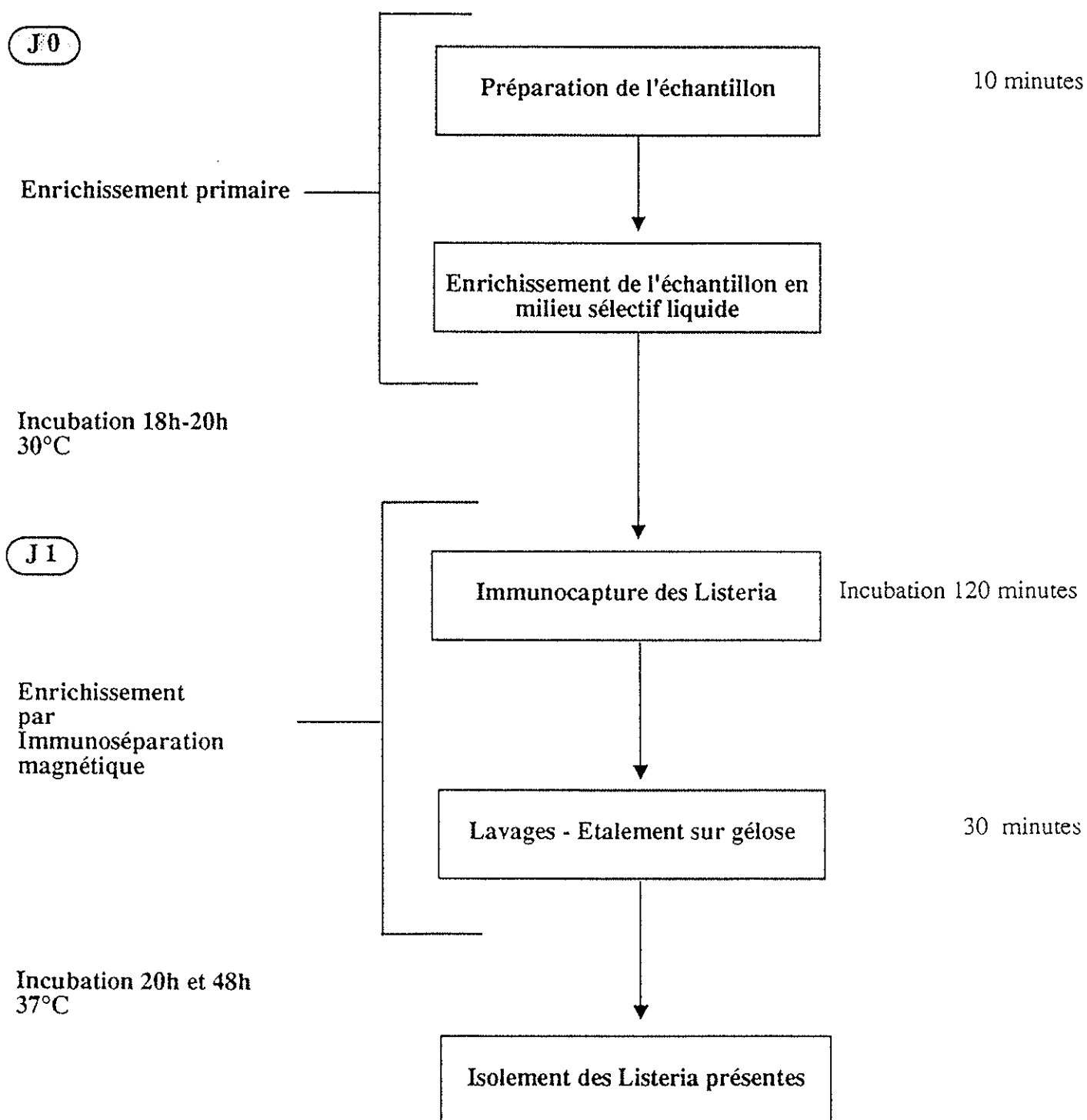


IV-2-LISTERSCREEN (20)

Le ListerScreen (AES laboratoire) est une méthode qualitative nécessitant un enrichissement préalable de l'échantillon dans un bouillon Fraser-demi pendant 18 à 20 heures à 30 °C.

Les bactéries sont également capturées par un procédé immunomagnétiques grâce à des billes qui seront étalées sur un milieu gélose sélectif : gélose Palcam ou éventuellement gélose Oxford.

L'isolement des *Listeria* est obtenu en 72 heures.

PROTOCOLE DU LISTERSCREEN**DIFFERENTES ETAPES DU TEST**

IV-3-LISTERIA RAPID TEST (OXOID)

Cette technique est basée sur l'immunochromatographie et donne des résultats en 43 heures.

Elle débute par deux étapes d'enrichissement en bouillon Fraser-demi puis dans un bouillon d'enrichissement tamponné pour *Listeria*.

A partir de l'échantillon enrichi est extrait un antigène flagellaire de *Listeria*.

Dans chaque test unitaire est incluse une bandelette sur laquelle est fixée une ligne d'anticorps spécifiques dirigés contre un antigène flagellaire de *Listeria*.

D'autres anticorps spécifiques, liés à des particules de latex colorées, se déplacent sur la bandelette en présence de l'échantillon.

Si l'antigène flagellaire de *Listeria* est présent dans l'échantillon, celui-ci va être pris en "sandwich" entre la ligne d'anticorps immobiles et les anticorps mobiles qui se seront déplacés jusqu'à l'antigène, d'où l'apparition d'une ligne bleue sur le test.

Une seconde ligne d'anticorps non spécifiques est immobilisée plus haut sur la bandelette et lie l'excès de latex marqué, que l'antigène soit présent ou pas ; ceci permet de contrôler que le test a bien fonctionné.

IV-4-METHODE MALTHUS (5)

C'est une méthode de détection des *Listeria*, et plus particulièrement *L. monocytogenes* et *L. innocua*, par conductance-métrie directe.

25 g d'échantillon de produit non carné

+

225 mg de LEB (FDA)

incubation 24 à 48 heures à 30° C

ensemencement des cellules avec 0,1 ml de pré-enrichissement

incubation en analyseur Malthus 48 heures à 35° C

Examen à 24 et 48 heures

Repiquage des cellules positives sur LSA et BA

incubation 48 heures à 35° C

Examen des boîtes à 24 et 48 heures.

Cette technique est applicable à une large gamme de produits alimentaires carnés ou non et produits de l'environnement.

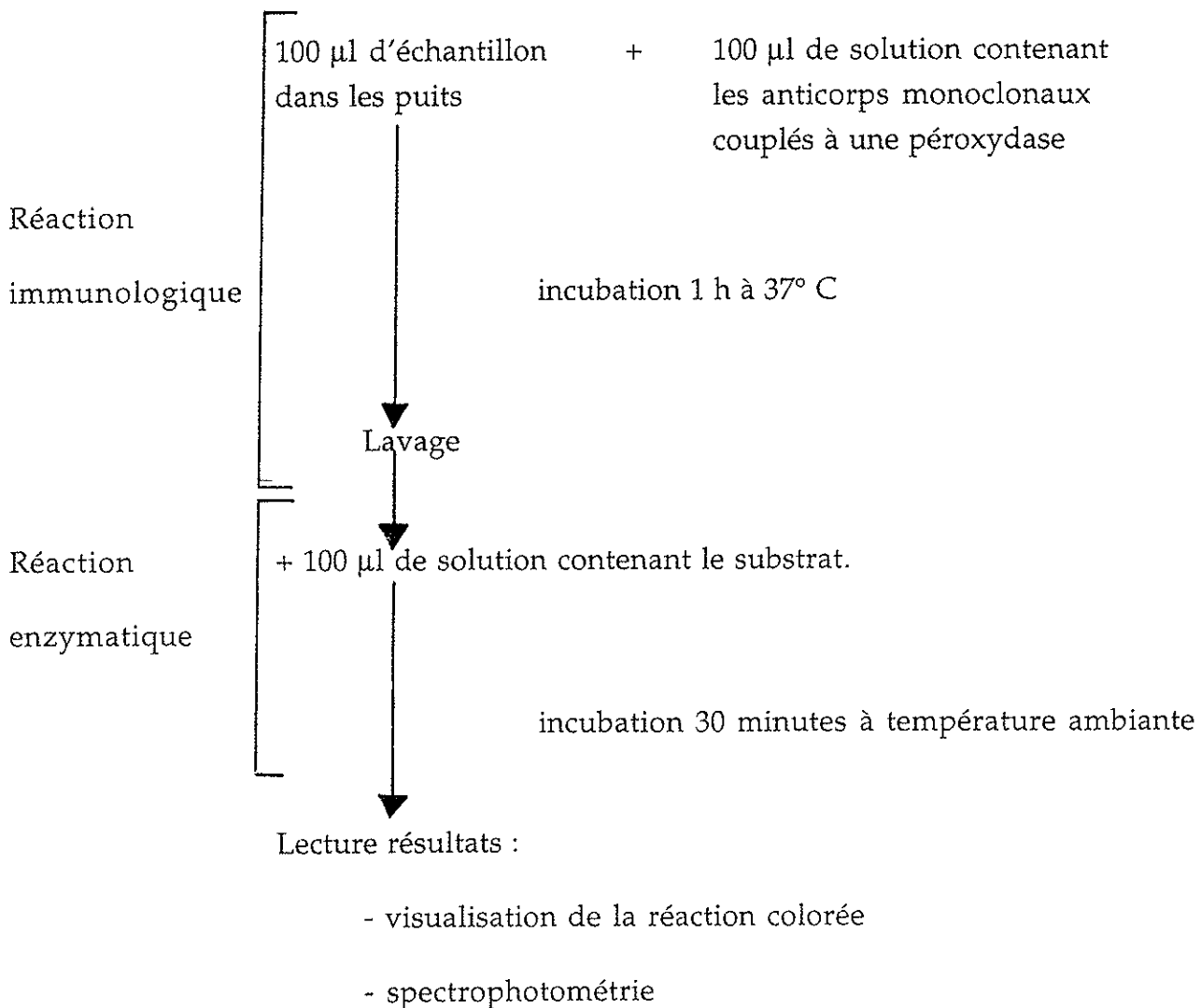
IV-5-LISTERIA DETECTION KIT (TRANSIA)

Ce kit de détection est basé sur une méthode immunoenzymatique donnant des résultats en 48 heures.

Il s'agit d'une technique sandwich, utilisant deux anticorps monoclonaux, qui permet de détecter semi-quantitativement la présence de *Listeria* sur différentes matrices.

Ensuite il est possible de réaliser une identification (8).

Ce kit de détection se présente en microplaque contenant 12 puits où sont fixés des anticorps monoclonaux.



IV-6-GENE-TRAK ET GENPROBE (20)

Ce sont deux méthodes rapides de recherche et de dénombrement par sonde froide, dont le principe est une technique d'hybridation moléculaire qui détecte les séquences spécifiques portées sur l'ARNr bactérien.

Ces deux tests commercialisés sous la forme d'un kit, nécessitent un enrichissement de 24 à 48 heures en milieu liquide et un étalement sur milieu gélosé de 24 à 48 heures avant leur utilisation.

*** Gene-Trak :**

L'ARNr cible est reconnu par deux sondes spécifiques, une sonde de capture et une sonde de détection qui utilise une activité enzymatique pour mettre en évidence l'hybridation ARN/ADN.

La réaction finale est colorée et est détectée à l'aide d'un spectrophotomètre.

*** Gene-probe :**

L'ARN est reconnu par une sonde marquée à l'ester d'acridinium ; la réaction d'hybridation a lieu en solution ; la sonde en excès est éliminée.

La détection finale se fait à l'aide d'un luminomètre.

**DEUXIEME PARTIE :
EXPERIMENTATION PERSONNELLE**

Le but de notre étude est la recherche de *Listeria* dans le lait de vache et de chèvre, en provenance du laboratoire Départemental d'analyses et de recherches de la Haute-Vienne.

Notre méthode de recherche est basée sur l'application de la norme AFNOR V08-O55 publiée en décembre 1993 et ci-jointe en annexe.

La norme AFNOR décrit une méthode de routine pour la recherche des *Listeria* dans tous les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

Nous avons ajouté une variante au protocole de la norme AFNOR en innovant une étape supplémentaire de pré-enrichissement au froid des échantillons de laits. En effet les *Listeria* étant des bactéries psychrotrophes, nous avons voulu vérifier si un pré-enrichissement au froid augmentait les chances d'isoler les bactéries.

I-MATERIEL ET METHODES

I-1-ECHANTILLONS DE LAITS

Deux séries d'analyses ont été réalisées :

- une première série sur 57 laits de chèvres (C1 à C57) et sur 14 laits de vaches (V1 à V14). Les analyses ont débuté tôt ou peu de temps après la réception des échantillons, c'est à dire dans les 1 à 8 jours.

- une deuxième série de 42 laits de chèvres est soumise à un protocole différent :

- * la recherche des *Listeria* est effectuée dès la réception des échantillons ;
- * puis une deuxième recherche est effectuée sur ces mêmes laits après un séjour de 30 jours à + 4° C ;
- * enfin, une troisième recherche a été réalisée sur cette même série de lait, après un séjour de 60 jours à + 4° C.

Chaque échantillon de lait correspond à un pool de laits en provenance d'un élevage.

I-2-MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS

I-2-1-Bouillon d'enrichissement primaire

Bouillon Fraser-demi (AES Laboratoire).

Le bouillon Fraser-demi est un bouillon d'enrichissement sélectif, destiné à l'isolement des *Listeria* à partir de prélèvements contenant une flore mixte. Composition : cf Norme AFNOR en annexe.

Les agents sélectifs retrouvés dans ce milieu sont l'acide nalidixique, l'aciflavine et le chlorure de lithium.

Ce bouillon est préparé en mélangeant 55 g de poudre déshydratée avec 1 l d'eau distillée.

Après répartition du bouillon dans des flacons à raison de 225 ml/flacon, ceux-ci sont stérilisés à 121° C pendant 15 minutes à l'autoclave.

Après addition du supplément Fraser, l'ensemencement du bouillon Fraser-demi est effectué en réalisant une dilution au 1/10ème, soit 25 ml de lait ajoutés à 225 ml de bouillon stérile.

I-2-2-Bouillon d'enrichissement secondaire

Bouillon Fraser (AES Laboratoire).

Le bouillon Fraser est de même composition que le Fraser-demi mais est deux fois plus concentré en acide nalidixique et acriflavine.

Il est préparé en versant 55 g de poudre dans un 1 l d'eau distillée.

Le bouillon est réparti en tubes de 10 ml et stérilisé à 121° C pendant 15 minutes à l'autoclave.

Après avoir ajouté le supplément Fraser, l'ensemencement est réalisé par addition de 0,1 ml de l'enrichissement primaire à 10 ml de bouillon Fraser.

I-2-3-Supplément Fraser (AES Laboratoire)

Il est destiné à compléter les bouillons Fraser-demi et Fraser en citrate ferrique ammoniacal, au moment de leur utilisation.

2,25 ml de supplément sont ajoutés aseptiquement à 225 ml de bouillon Fraser-demi et 0,1 ml à 10 ml de bouillon Fraser.

I-2-4-Gélose Palcam (AES Laboratoire)

La gélose Palcam est un milieu sélectif pour l'isolement des *Listeria*.

Sa haute sélectivité est due à la présence de chlorure de lithium, de ceftazidime, de polymixine B et d'acriflavine.

Composition : cf norme AFNOR en annexe.

Ce milieu est constitué d'une gélose de base et d'un supplément Palcam (AES).

La gélose de base est préparée par dissolution des composants de base déshydratés dans l'eau, soit 70,9 g dans 1 litre d'eau, suivit d'une stérilisation à 121° C pendant 15 minutes à l'autoclave.

Après refroidissement, le supplément Palcam est ajouté, sachant qu'un flacon permet de supplémenter 500 ml de milieu.

Les géloses coulées en boîtes de Pétri, sontensemencées en stries par 0,1 ml de bouillon d'enrichissement.

I-2-5-Gélose trypticase soja (AES Laboratoire)

Composition :	. Pastone	15 g/l
	. Peptone papainique	5 g/l
	. NaCl	5 g/l
	. Agar	15 g/l
	pH = 7,3 à 25° C.	

La gélose est préparée par dissolution des composants de bases déshydratés (40 g) dans l'eau (1 litre) en portant à ébullition, suivit d'une stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes à l'autoclave.

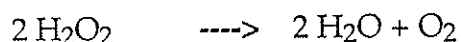
Après avoir été coulées en boîtes de Pétri, les géloses sontensemencées en stries.

I-2-6-Coloration de Gram

Elle consiste dans un premier temps, à réaliser un frottis à partir d'une colonie de bactéries isolée sur gélose trypticase soja. Dans un deuxième temps, le frottis est coloré par l'utilisation successive de cristal violet, de lugol, d'alcool et de safranine. La coloration de Gram est examinée au microscope optique (objectif x 100).

I-2-7-Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme bactérienne capable de décomposer l'eau oxygénée avec libération d'oxygène, d'où l'apparition immédiate de bulles de gaz.



La technique consiste à émulsionner une colonie bactérienne dans une goutte d'eau oxygénée à 20 volumes sur une lame.

I-2-8-Eau peptonée

Composition :	Pastone	15 g
	NaCl	5 g
	Eau distillée qsp	1000 ml
	pH :	7,2

Après ensemencement d'une colonie de bactéries dans deux tubes d'eau peptonée, l'un est incubé à 20° C et l'autre à 37° C pendant 24 heures ; on réalise un état frais que l'on examine au microscope (objectif x 40) afin d'observer la mobilité à 20° C et 37° C.

I-2-9-Gélose nitrate (AES Laboratoire)

Elle est composée d'une gélose nutritive additionnée de 1 ‰ de nitrate de potassium.

Composition :	Gélose nutritive	28 g
	Nitrate de potassium	1 g
	Eau distillée	1000 ml.

La gélose est préparée en tubes à usage unique et stérilisée à 120° C pendant 20 minutes à l'autoclave. Puis les géloses sont inclinées extemporanément ou conservées à + 4° C.

Cette gélose permet la recherche d'une nitrate réductase. Elle est ensemencée en stries à partir d'une colonie isolée.

Après 24 heures d'incubation à 37° C, on révèle la réaction par trois gouttes d'acide sulfanilique et trois gouttes d'alpha-naphtylamine.

Une réaction positive se caractérise par une coloration rouge-brun traduisant la réduction des nitrates en nitrites.

En cas de réaction négative, on ajoute de la poudre de zinc réducteur des nitrates. Si une coloration rouge apparaît, cela signifie que les bactéries sont nitrates -.

I-2-10-Gélose au sang de mouton

Elle est composée d'une base pour gélose au sang (AES laboratoire) à laquelle est ajouté 5 % de sang défibriné stérile de mouton (Bio Mérieux).

Composition :

* Base pour gélose au sang :

Protéose peptone	15 g/l
Digestion de foie	2,5 g/l
Extrait de levure	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	12 g/l

pH final = 7,4 à 25° C

Stérilisation 20 minutes à 120° C.

La gélose au sang est coulée en boîtes de Pétri et ensemencée en stries à partir d'une colonie bactérienne.

Après incubation 24 à 48 heures à 37° C, on observe le caractère hémolytique des bactéries.

I-2-11-CAMP-test

Ce test permet d'observer et de différencier le caractère hémolytique de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, et *L. seeligeri* (10).

Le CAMP-test utilise deux souches de bactéries, *Staphylococcus aureus* CIP⁽¹⁾ 2710 et *Rhodococcus equi* CIP 5869, qui vont exalter l'hémolyse des *Listeria* (12).

L'épreuve se réalise sur une boîte de gélose trypticase soja enrichie de 5 % de sang de mouton (11).

On ensemence une culture de *Staphylococcus* et une culture de *Rhodococcus* en deux stries parallèles et diamétralement opposées (11).

Les souches de *Listeria* sont ensemencées selon des stries perpendiculaires aux deux premières, en s'arrêtant à 0,5 cm (11).

Au bout de 24 heures d'incubation à 37° C, la gélose est examinée.

I-2-12-Galerie Api-Listeria (Bio Mérieux) (2, 8)

Il s'agit d'une galerie miniaturisée permettant l'identification des *Listeria* en 24 heures.

La galerie Api-Listeria comporte 10 microtubes, dans lesquels des substrats sous forme déshydratés vont permettre de réaliser des tests enzymatiques ou des fermentations de sucres.

Après avoir déposé dans chaque microtube une petite quantité de suspension bactérienne, il est nécessaire de laisser incuber 18 à 24 heures à 35° C ou 37° C pour que les différentes réactions se développent.

Celles-ci se traduisent par des changements de coloration spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Cette galerie utilise les tests suivants :

(1) Collection de bactéries de l'Institut Pasteur.

* test DIM.

Il permet de différencier *L. innocua* de *L. monocytogenes*.

Ce test est basé sur l'hydrolyse d'un substrat naphtylamide par une arylamidase.

La β -naphtylamine libérée est révélée par l'addition d'un sel de diazonium (réactif Zym B) pour former un composé azoïque coloré en orange.

* Test ESC : Esculine

Il permet d'étudier la capacité d'un germe à hydrolyser l'esculine sous l'action de la β -glucosidase. Ce test confirme l'appartenance des bactéries au genre *Listeria*.

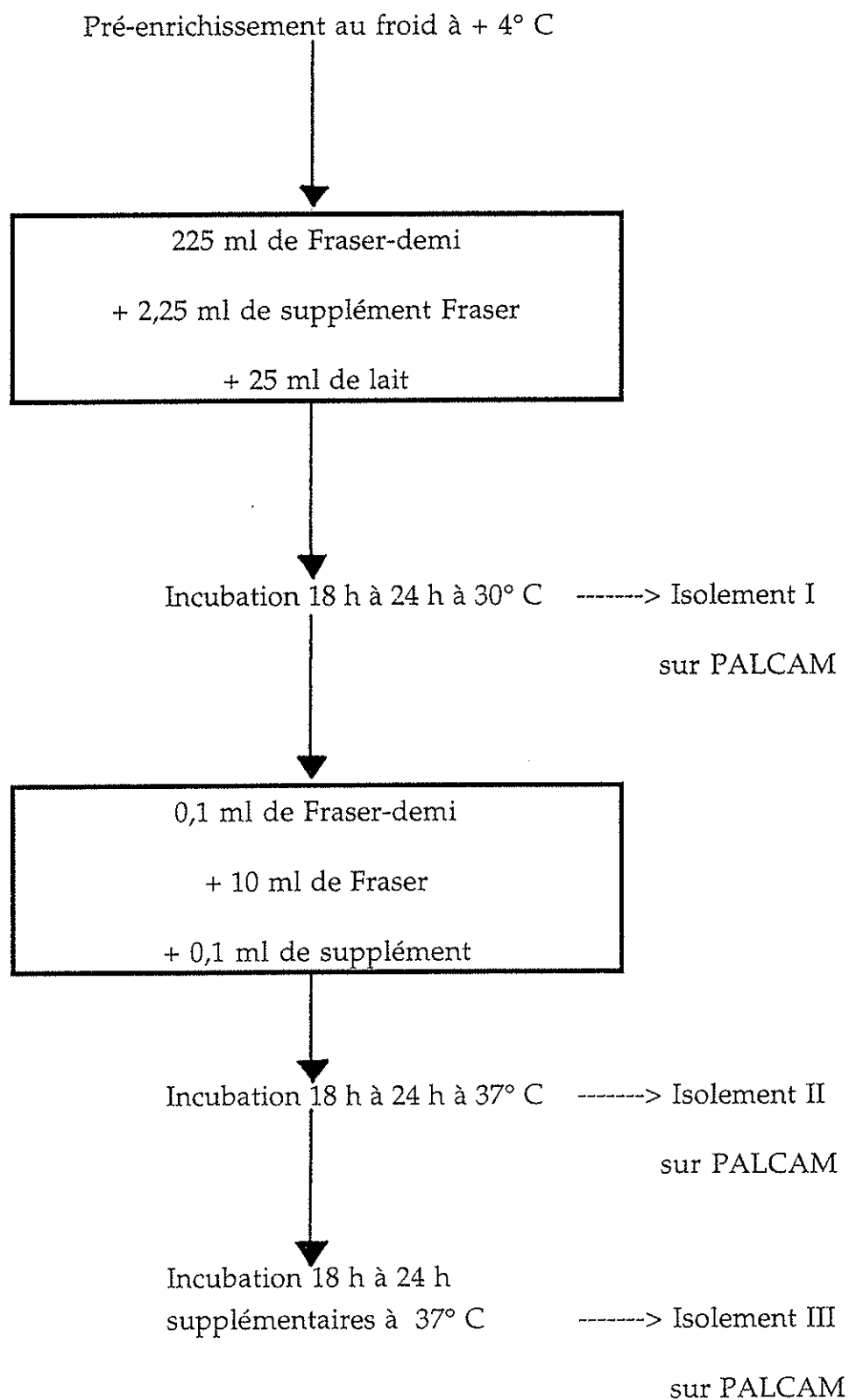
* α MAN : α -mannosidase

Ce test met en évidence une osidase. L' α -mannosidase hydrolyse un substrat osidique, le mannoside couplé à un radical nitrophénol, pour libérer du p-nitrophénol, spontanément coloré en jaune, sans addition de réactif.

- * DARL : D-arabitol
- XYL : D-xylose
- RHA : Rhamnose
- MDG : α -méthyl-D-glucoside
- RIB : Ribose
- G1P : Glucose-1-phosphate
- TAG : D-tagatose.

Ces sept sucres servent de substrats pour réaliser une fermentation en anaérobiose.

Il va se former des produits acides qui vont faire virer l'indicateur de pH : le rouge de phénol. Le test DARL permet de confirmer l'appartenance des bactéries étudiées au genre *Listeria*.

I-3-PROTOCOLE SUIVI SELON LA NORME AFNOR V08-055

La recherche de *Listeria* selon la méthode AFNOR V08-055 comporte les étapes suivantes (6) :

- Pré-enrichissement au froid à + 4° C :

La deuxième série de laits correspondant aux 42 laits de chèvres est conservée au réfrigérateur à + 4° C pendant deux mois. Ces laits seront soumis à trois enrichissements : un à J0, un deuxième à J30 et un troisième à J60.

- Enrichissement primaire en milieu sélectif liquide :

25 ml de lait sontensemencés stérilement dans 225 ml de bouillon Fraser-demi additionné de supplément Fraser, soit une dilution au 1/10ème. Après homogénéisation, le bouillon ainsiensemencé est incubé pendant 18 h à 24 h à 30° C.

- Isolement de l'enrichissement primaire sur un milieu sélectif :

0,1 ml du milieu précédent estensemencé en stries sur la gélose Palcam.

- Enrichissement secondaire en milieu sélectif liquide :

0,1 ml de la culture obtenue sur Fraser-demi estensemencé dans 10 ml de bouillon d'enrichissement Fraser additionné de 0,1 ml de supplément, puis incubé à 37° C pendant 18 h à 48 h.

- Après 18 h et 48 h d'incubation de l'enrichissement secondaire, 0,1 ml est repiqué sur gélose Palcam.

- Après isolement, les colonies suspectes sont repiquées en stries sur une gélose non sélective, type trypticase soja, puis incubées 24 h à 37° C, afin de procéder à l'identification des bactéries à l'aide de tests morphologiques et biochimiques.

II-RESULTATS

II-1-ISOLEMENT DES LISTERIA

- Bouillons Fraser-demi et Fraser :

Après incubation, de nombreux milieux ont présenté un noircissement.

Ceci nous amène à supposer la présence de bactéries hydrolysant l'esculine, notamment *Listeria*.

L'hydrolyse de l'esculine par les bactéries, produit de l'esculétine qui, en présence de citrate ferrique ammoniacal (contenu dans le complément Fraser) provoque un noircissement du milieu.

- Gélose Palcam :

L'examen des milieux d'isolement après 18 h et 48 h d'incubation à 37° C, permet de détecter la présence de colonies suspectes caractéristiques de *Listeria*.

Sur gélose Palcam, les colonies de *Listeria* apparaissent sous forme de colonies gris-verdâtres, luisantes, de 1 mm de diamètre environ, entourées d'un halo brun-noir.

Après 48 h, les colonies atteignent deux millimètres de diamètre et sont incrustées dans la gélose avec une dépression centrale.

- Gélose trypticase soja :

Les colonies de *Listeria* apparaissent bleutées en transillumination oblique.

II-2-IDENTIFICATION DU GENRE

L'aspect caractéristique des colonies de *Listeria* sur gélose Palcam, de même que leur aspect bleuté sur gélose trypticase soja, permet déjà d'orienter vers les genre *Listeria*.

Nous avons par la suite recherché et confirmé par différents tests, l'appartenance des bactéries au genre *Listeria*.

- Coloration de Gram :

Les colonies suspectes et d'aspect caractéristique sur gélose Palcam et gélose trypticase soja sont étalées en frottis, fixées à l'alcool puis soumises à la coloration de Gram.

Les *Listeria* apparaissent sous la forme de petits bâtonnets Gram +, pouvant être isolés, disposés en V, en amas, en palissades et parfois en chaînettes.

- Réaction à la catalase :

Les *Listeria* sont catalase +.

- Examen de la mobilité :

Les *Listeria* sont mobiles à 20° C et immobiles à 37° C.

II-3-DIFFERENCIATION DES ESPECES DE LISTERIA

- Recherche d'une nitrate réductase sur gélose nitrate :

Après incubation des géloses nitrate, la recherche de la nitrate réductase est négative.

- Résultats de l'hémolyse et du CAMP-test :

* hémolyse :

Une hémolyse totale autour des colonies révèle le caractère hémolytique des bactéries. Seules *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. seeligeri* sont bêta-hémolytiques.

* CAMP-test (Tableau 7) :

Tableau 7 : Epreuve de CAMP, réactions des espèces de *Listeria* (3).

ESPECES	Réaction hémolytique	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-

- *L. ivanovii* se caractérise par la présence d'une large zone d'hémolyse en "pelle" près de la strie de *Rhodococcus equi* (photo 1).

- *L. monocytogenes* montre une hémolyse accentuée du côté de *Staphylococcus aureus* (Photo 2).

Photo 1 : Epreuve de CAMP : *L. ivanovii*.

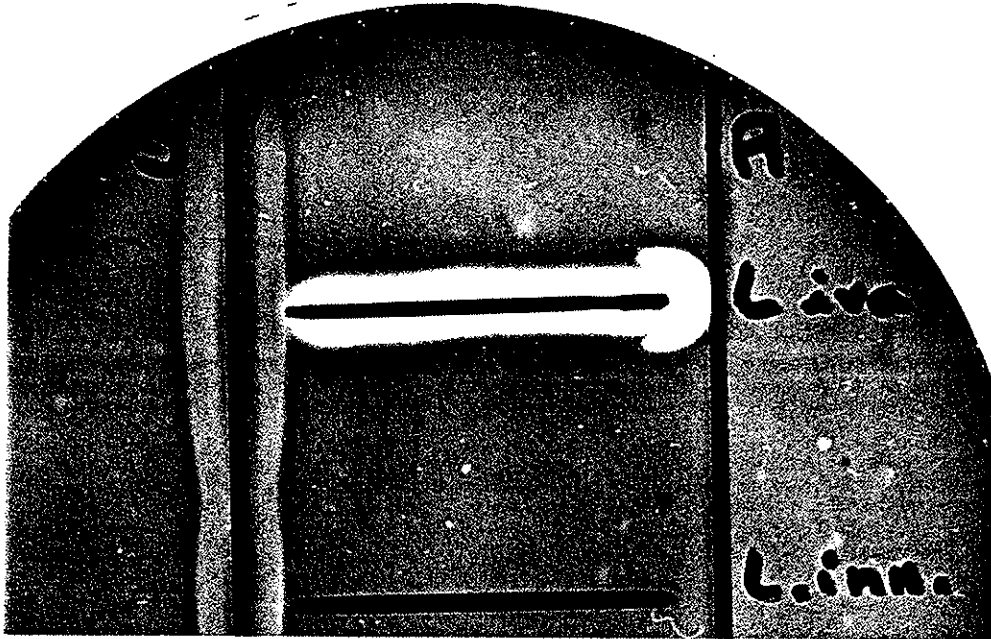
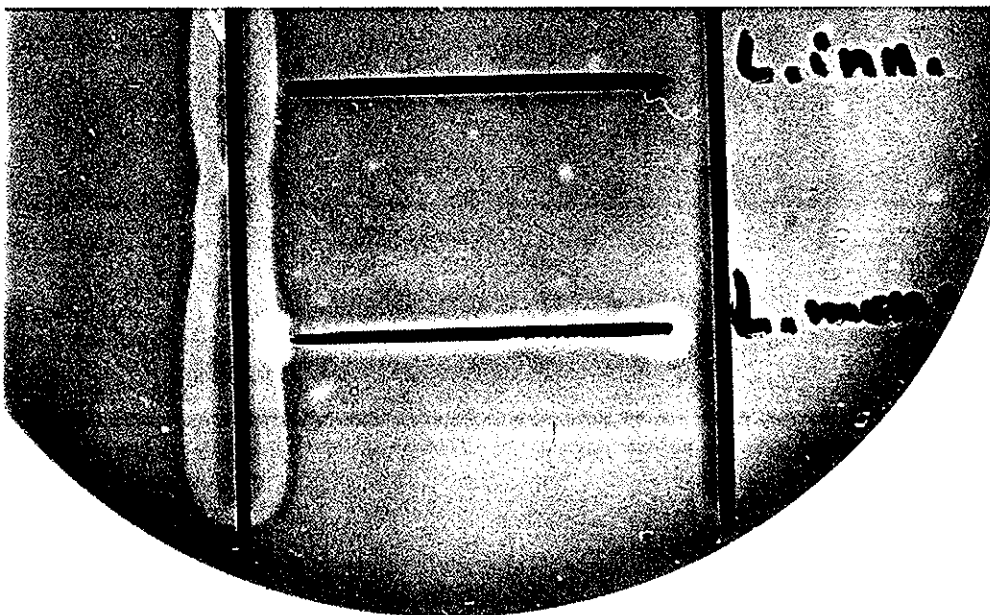


Photo 2 : Epreuve de CAMP : *L. monocytogenes*.



- Api-Listeria

L'utilisation de la galerie Api-Listeria ne doit être faite qu'après avoir vérifié l'appartenance de la souche à étudier au genre *Listeria*.

Après une incubation de 18-24 h à 35-37° C, la lecture des réactions est réalisée visuellement avec le tableau de lecture et l'identification obtenue grâce à la liste des profils de la notice technique (tableau 8).

Tableau 8 : Schéma d'identification des *Listeria* d'après le fabricant (8).

CARACTÉRISTIQUES	<i>L. mono cytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii subsp iv. lond.</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
DIM	-	+	+	V V	V	+
ESC	+	+	+	+ +	+	+
α-MAN	+	+	-	- •	+	V
DARL	+	+	+	+ +	+	+
OXYL	-	-	+	+ +	+	-
RHA	+	V	-	- -	V	•
MDG	+	+	+	+ +	+	V
RIB	-	-	-	+ -	-	+
GIP	-	-	-	+ V	•	-
TAG	-	-	-	- -	+	-

DIM Arylamidase (Différentiation des *L. innocua* / *L. monocytogenes*)

ESC Esculine hydrolyse

α-MAN Alpha mannosidase

DARL D-arabitol acidification

OXYL D-xylose acidification

RHA Rhamnose acidification

MDG Alpha-méthyl-D- glucoside acidification

RIB Ribose acidification

GIP Glucose -I-phosphate acidification

TAG D-Tagatose acidification

+ réaction positive
- réaction négative
V variable

II-4-RESULTATS DES LAITS DE VACHES

La recherche a été effectuée sur deux lots d'échantillons de laits de vaches :

- un premier lot de laits de vaches de V1 à V10 reçu le 28 septembre 1994,
- un deuxième lot de V11 à V14 reçu le 8 décembre 1994.

Ces laits n'ont pas subi d'étape de pré-enrichissement au froid.

Les résultats obtenus aux différentes étapes de l'isolement sur gélose sélective Palcam sont les suivants :

- à partir de l'enrichissement primaire (bouillon Fraser-demi), des colonies caractéristiques ont été isolées sur Palcam pour les laits de vaches V1, V3 et V4 ;
- de même, l'isolement de l'enrichissement secondaire (bouillon Fraser) a fourni des résultats identiques.

	V1	V3	V4
Coloration de Gram	Gram +	Gram +	Gram +
Catalase	+	+	+
Mobilité	20°C	+	+
	37°C	-	-
Hémolyse	-	-	-
CAMP-Test	-	-	-
Nitrate réductase	-	-	-
Api-Listeria	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>

Les résultats de l'hémolyse négative a été confirmée par le CAMP-test, et ceux de la galerie Api-Listeria a permis d'identifier *L. innocua* dans les trois lait ; cette espèce n'est pas pathogène.

Donc 3 laits de vaches sur 14 contiennent *L. innocua*, soit un taux de 21,4 %.

II-5-RESULTATS DES LAITS DE CHEVRES

II-5-1-Première série de 57 laits de chèvres C1 à C57

Un premier lot de 2 laits de chèvres C1 à C2 a été reçu le 5/12/94, un deuxième lot de C3 à C11 le 8/12/94, un troisième lot de C12 à C20 le 5/01/95, un quatrième lot de C21 à C29 le 13/01/95, et un cinquième lot de C30 à C57 le 18/01/95.

Ces laits n'ont pas subi de pré-enrichissement au froid.

Seuls les laits C31, C35 et C47 ont donné des colonies caractéristiques des *Listeria* sur gélose Palcam.

L'identification a montré les résultats suivants :

	C31	C35	C47
Coloration de Gram	Gram +	Gram +	Gram +
Catalase	+	+	+
Mobilité	20°C	+	+
	37°C	-	-
Hémolyse	+	-	+
CAMP-Test	+	-	+
Nitrate réductase	-	-	-
Api-Listeria	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>

Trois espèces de *Listeria* ont été révélées par la galerie Api : *L. innocua* pour le lait C35, *L. monocytogenes* pour le lait C31 et *L. ivanovii* pour le lait C47, la dernière espèce étant pathogène pour les ovins et les caprins.

Au total, 3 laits de chèvres sur 57 ont révélé la présence de *Listeria*, soit un taux de 5,26 % de laits positifs.

L. monocytogenes, *L. innocua* et *L. ivanovii* ont été retrouvées avec chacune une fréquence de 1,75 %.

II-5-2-Deuxième série de 42 laits de chèvres C58 à C99

Ces laits ont été reçus le 20/03/95.

Sur cette série, trois recherches de *Listeria* ont été effectuées :

- à J0 sans pré-enrichissement au froid,
- à J30 au bout de 30 jours de séjour au réfrigérateur à + 4°C,
- à J60 au bout de 60 jours au froid.

* à J0 :

8 laits ont présenté des colonies caractéristiques des *Listeria* sur gélose Palcam, dont 6 laits (C58, C68, C77, C85, C94 et C95) dès l'isolement I et 2 laits (C70 et C76) à partir de l'isolement II sur Palcam.

La galerie Api a permis d'identifier les espèces suivantes :

- *L. monocytogenes* pour les laits C68 et C77,
- *L. ivanovii* pour les laits C58 à C85,
- *L. innocua* pour les laits C70, C76, C94 et C95.

Le CAMP-test a permis de confirmer les espèces de *Listeria*.

	C58	C68	C70	C76	C77	C85	C94	C95
Coloration de gram	Gram +	Gram +	Gram +	Gram +	Gram +	Gram +	Gram +	Gram +
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Mobilité 20°C	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Hémolyse	+	+	-	-	-	+	-	-
CAMP-test	+	+	-	-	-	+	-	-
Nitrate réductase	-	-	-	-	-	-	-	-
Api-Listeria	<i>Listanovii</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>

Au total 19 % des laits de chèvres ont présenté des *Listeria* avec une fréquence de 4,76 % pour *L. monocytogenes*, 4,76 % pour *L. ivanovii*, et 9,52 % pour *L. innocua*.

* à J30 :

Nous avons testé les 34 laits de chèvres n'ayant pas donné de résultat à J0.

Des colonies caractéristiques de *Listeria* n'ont été retrouvées que dans un seul lait : C74.

L'identification a montré les résultats suivants :

	Coloration de Gram	Catalase	Mobilité		Hémolyse	CAMP-test	Nitrate réductase	Api-Listeria
			20°C	37°C				
C74	Gram+	+	+	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>

Au total 2,3 % supplémentaires des laits de chèvres ont présenté *L. monocytogenes* à J30.

* à J60 :

La recherche a de nouveau été effectuée sur les 33 laits de chèvres négatifs.

Seul le lait C88 a donné des colonies caractéristiques sur gélose Palcam.

L'identification a montré les résultats suivants :

	Coloration de Gram	Catalase	Mobilité		Hémolyse	CAMP-test	Nitrate réductase	Api-Listeria
			20°C	37°C				
C88	Gram+	+	+	-	+	+	-	<i>L. ivanovii</i>

Au total 2,3 % supplémentaires des laits de chèvres ont présenté *L. ivanovii* à J60.

L'ensemble des résultats positifs obtenus à partir de la deuxième série de 42 laits de chèvres figurent ci-dessous :

Temps de séjour à 4°C	J0	J30	J60
Laits positifs			
C58	+		
C68	+		
C70	+		
C76	+		
C77	+		
C85	+		
C94	+		
C95	+		
C74		+	
C88			+

Au total, sur les 99 laits de chèvres testés, 13 % présentent des *Listeria* dont :

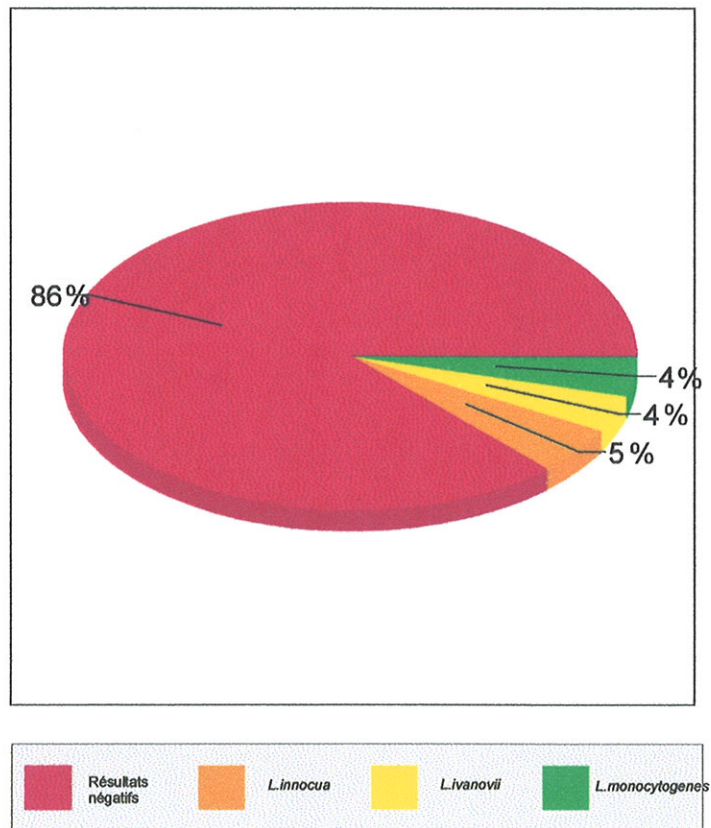
4 % de *L. monocytogenes*,

4 % de *L. ivanovii* et

5 % de *L. innocua*.

Soit 8 % des laits contiennent des espèces pathogènes et 5 % des non pathogènes (figure 3).

Figure 3 : Résultats obtenus à partir de 99 échantillons de laits de chèvres.



III-DISCUSSION

La norme AFNOR est décrite comme une méthode de référence pour des analyses de routine permettant de rechercher *L. monocytogenes*, espèce pathogène pour l'homme et les animaux.

Par cette méthode nous avons également isolé deux autres espèces de *Listeria* : *L. innocua* qui n'est pas pathogène et *L. ivanovii* qui est pathogène pour les ovins et les caprins.

Le fait d'isoler des *Listeria* non pathogènes comme *L. innocua* confirme que des espèces pathogènes sont également présentes dans le lait cru. Nos travaux montrent que la proportion d'isolement entre les trois espèces est quasiment identique : 4 % pour *L. monocytogenes*, 4 % pour *L. ivanovii* et 5 % pour *L. innocua*.

Cependant notre étude démontre que la proportion de *Listeria* pathogènes isolées (8 %) est supérieure à celle de *Listeria* non pathogènes (5 %).

Dans les laits de vaches, seul *L. innocua* a été identifiée. Notre recherche a été effectuée sur un petit nombre d'échantillons de laits de vaches, ce qui rend ces résultats peu significatifs. Néanmoins, d'autres travaux sur la recherche épidémiologique de ces bactéries dans les laits de vaches, rapportent la présence de *L. monocytogenes* dans des proportions variables selon les auteurs (1, 10).

Sur l'ensemble des laits de chèvres n'ayant pas subi de pré-enrichissement au froid, c'est-à-dire en appliquant la norme AFNOR à la lettre, nous avons isolé : *L. monocytogenes* (3 %), *L. ivanovii* (3 %) et *L. innocua* (5 %).

Dans notre étude nous avons exploité le caractère psychrotrophe des *Listeria* et démontré qu'après un enrichissement au froid d'un mois, puis de deux mois, il était encore possible d'isoler des *Listeria*. En effet, après un séjour prolongé à basse température, les *Listeria* se sont multipliées et deux espèces pathogènes ont été retrouvées : *L. monocytogenes* après 30 jours et *L. ivanovii* après 60 jours.

Ces deux laits contenaient donc une faible quantité de bactéries ; ainsi se pose le problème d'une possible contamination à partir d'un lait cru qui peut être à la base de la préparation d'un fromage de chèvre et consommé après un délai d'affinage plus ou moins long.

Nous avons recherché s'il y avait une corrélation entre l'isolement des *Listeria* et la date des prélèvements des laits.

Le plus grand nombre de laits contenant *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* ont été analysés aux environs du 20 mars, c'est-à-dire après la mise bas.

A notre connaissance aucune étude épidémiologique n'a été publiée sur la recherche des *Listeria* dans les laits crus de chèvres. Nous démontrons que 13 % des 99 laits testés contiennent des *Listeria*. Si le lait cru de chèvre n'est pas un aliment consommé tel quel par l'homme comme l'est celui de vache, la grande majorité des fromages de chèvres sont à base de lait cru et représentent un risque potentiel de contamination.

CONCLUSION

La contamination du lait cru de chèvre par *L. monocytogenes* dans les élevages, représente un facteur de risque pour le consommateur.

Une meilleure connaissance épidémiologique du portage sain des chèvres dans les exploitations d'éleveurs, permettra d'éviter la dissémination de la bactérie dans l'environnement.

La lutte contre la contamination du lait et des aliments en général passe inévitablement par la maîtrise de la listériose animale. Dans ce travail, nous exposons la preuve que le lait cru de chèvre contient des *Listeria* et notamment *L. monocytogenes*.

Si l'incidence de la listériose est faible malgré le caractère ubiquitaire des *Listeria*, elle demeure dangereuse pour les groupes à risques tels que les femmes enceintes, les nouveaux nés et les personnes âgées, comme l'ont montré les deux dernières épidémies de 1992 et 1993 en France.

Dans le domaine agro-alimentaire, la qualité des aliments est primordiale. Actuellement la tendance à consommer des produits labellisés de bonne qualité l'emporte. Il est certain qu'un fromage au lait cru a un goût plus attrayant qu'un fromage fabriqué à partir de lait pasteurisé. Nos résultats attirent l'attention sur la maîtrise de la qualité des produits bruts et nous sensibilisent sur la bonne hygiène dans les élevages producteurs.

ANNEXE

normalisation française

V 08-055

Décembre 1993

Indice de classement : V 08-055

Microbiologie alimentaire

Recherche de *Listeria monocytogenes*

Méthode de routine

E: Food microbiology — Detection of *Listeria monocytogenes* —
Routine method

D: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln —
Routineverfahren zum Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Norme expérimentale publiée par l'AFNOR en décembre 1993.

Les observations relatives à la présente norme expérimentale doivent être adressées à l'AFNOR avant le 1^{er} janvier 1996.

correspondance À la date de publication du présent document, il n'existe pas de travaux européens ou internationaux sur le sujet.

analyse Le présent document spécifie une méthode de routine, simplifiée par rapport au projet de méthode de référence (projet issu de l'ISO/TC 34/SC 9 «Produits agricoles et alimentaires — Microbiologie»), pour la recherche de *Listeria monocytogenes*.

descripteurs Thésaurus International Technique : analyse microbiologique, produit alimentaire, alimentation humaine, recherche, microorganisme, milieu de culture.

modifications

corrections

Membres de la commission de normalisation

Président : M CATTEAU

Secrétariat : M LOMBARD — AFNOR

M	ARROUY	CELIA SA
M	BAL FONTAINE	IDEVAL
V	BAYLAC	MINISTÈRE DE LA DÉFENSE — SERVICE CENTRAL D'ÉTUDE ET DE RÉALISATION DU COMMISSARIAT À L'ARMÉE DE TERRE (SCERCAT)
M	BEERENS	UER DE PHARMACIE
MME	BERNARD	UNION NATIONALE DES COOPÉRATIVES AGRICOLES D'APPROVISIONNEMENT — UNION DES COOPÉRATIVES AGRICOLES D'ALIMENTATION DU BÉTAIL (UNCAA/UCAAB)
M	BEUGNIES	LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL ANALYSE — DROME
MME	BOHNERT	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE — CENTRE NATIONAL D'ÉTUDES VÉTÉRINAIRES ET ALIMENTAIRES — LABORATOIRE CENTRAL DE RECHERCHES AVICOLE ET PORCINE (CNEVALCRAP)
M	BILLAUX	SOCIÉTÉ SCIENTIFIQUE D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE INSTITUT SCIENTIFIQUE D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE (SSHA/ISHA)
M	BOMBE	CENTRE TECHNIQUE DE LA CONSERVATION DES PRODUITS AGRICOLES (CTCPA)
M	BONBLED	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE — DIRECTION GÉNÉRALE DE L'ALIMENTATION (DGAL)
V	BOUDET	BIOKAR DIAGNOSTICS
MME	BOUHET	BESNIER BRIDEL
M	CARLIER	ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE
MME	CARRABIN	LABORATOIRE DE BROMATOLOGIE DE FRANCE
M	CATTEAU	INSTITUT PASTEUR DE LILLE
M	CHAMPSAUR	LABORATOIRE DE LA VILLE DE NICE
MME	CHAUBEAU DUFFOUR	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE — CENTRE NATIONAL DE FORMATION DES TECHNICIENS DES SERVICES VÉTÉRINAIRES (CNFTSV)
M	CHEVET	FOULD SPRINGER SA
M	CLAISSE	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
MME	COIGNARD	ASEPT
M	COLIN	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE CENTRE NATIONAL D'ÉTUDES VÉTÉRINAIRES ET ALIMENTAIRES LABORATOIRE CENTRAL DE RECHERCHES AVICOLE ET PORCINE (CNEVALCRAP)
M	COLONNA CECCALDI	UNIR
MME	COMÉ	LABORATOIRE VÉTÉRINAIRE DÉPARTEMENTAL
MME	COPIN	LABORATOIRES 3M SANTÉ
M	CREYSSEL	CFCGA
M	DÉBRALLY	FRANCE GLACES FONDUS SA
M	DENEUVE	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE CENTRE NATIONAL DE FORMATION DES TECHNICIENS DES SERVICES VÉTÉRINAIRES (CNFTSV)
M	DUFFOUR	LABORATOIRE COBAC
M	DUPONT	IFREMER
MME	ÉTIENNE	ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DU PAYSAGE (ENSP)
M	FISS	RIA

MME FORT	MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE — DIRECTION GÉNÉRALE DE LA CONSOMMATION, DE LA CONCURRENCE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES (DGCCRF/TALENCE)
MME GICQUEL	
M GLEDEL	
M GOHIER	SOPAD NESTLE SA
MME GOMY	AFNOR CERTIFICATION
MME HUMMEL	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE — CENTRE NATIONAL D'ÉTUDES VÉTÉRINAIRES ET ALIMENTAIRES — LABORATOIRE CENTRAL D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE (CNEVALCHA)
M JALENQUES	INTERSCIENCES
MILLE JARDY	MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE — DIRECTION GÉNÉRALE DE LA CONSOMMATION, DE LA CONCURRENCE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES (DGCCRF — RENNES)
M JOUVE	ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE
MILLE LAHELLEC	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE — CENTRE NATIONAL D'ÉTUDES VÉTÉRINAIRES ET ALIMENTAIRES — LABORATOIRE CENTRAL D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE (CNEVALCHA)
M LESTOILLE	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE — DIRECTION GÉNÉRALE DE L'ALIMENTATION (OGAL)
MME MALO	LYOVIENNE
MME MONTEARD	GÉNÉRALE TRAITEUR
M NADAUD	LABORATOIRE DU JARDIN DE JAYAN
MME NIEL	MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE — DIRECTION GÉNÉRALE DE LA CONSOMMATION, DE LA CONCURRENCE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES (DGCCRF/MASSY)
MME NORMAND PLESSIER	ELF SANOFI
M OCHIN	SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR
MILLE OZANNE	SPAB
M PERROLET	INSTITUT PASTEUR DE LYON
MME PETRANXSIENE	
M PHILIPPOT	PERSTORP ANALYTICAL
MME POUMEYROL	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE — CENTRE NATIONAL D'ÉTUDES VÉTÉRINAIRES ET ALIMENTAIRES — LABORATOIRE CENTRAL D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE (CNEVALCHA)
M RAMBACH	CHROMAGAR
MILLE RICHARD	MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE — DIRECTION GÉNÉRALE DE LA CONSOMMATION, DE LA CONCURRENCE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES (DGCCRF/MONTPELLIER)
M ROTEREAU	CNIEL
MME THOMAS	AFNOR
M THOUVENOT	ESMISAB
MME VANELLE	LABORATOIRE SERVICES VÉTÉRINAIRES
M VERHILLE	BIOMERIEUX SA

Précautions

Afin de sauvegarder la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de recherche des *Listeria* ne soient réalisés que dans des laboratoires équipés à cet effet et sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit pris pour se débarrasser des éléments incubés.

1 Domaine d'application

La présente norme décrit une méthode de routine pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans tous les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale (y compris ceux pour lesquels il existe une norme spécifique).

La présente norme représente une simplification du projet de méthode de référence (voir annexe O, [1]) essentiellement par l'élimination de l'étape d'isolement consecutive à l'incubation de 48 h du bouillon Fraser-demi, et par l'isolement sur une seule gélose au choix.

2 Références normatives

Ce document comporte par référence datée ou non datée des dispositions d'autres publications. Ces références normatives sont citées aux endroits appropriés dans le texte et les publications sont énumérées ci-après. Pour les références datées, les amendements ou révisions ultérieurs de l'une quelconque de ces publications ne s'appliquent à cette norme que s'ils y ont été incorporés par amendement ou révision. Pour les références non datées, la dernière édition de la publication à laquelle il est fait référence s'applique.

NF V 08-002 Microbiologie alimentaire — Directives générales pour les examens microbiologiques.

NF V 08-010 Microbiologie alimentaire — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente norme, les définitions suivantes s'appliquent :

3.1 *Listeria monocytogenes* Espèce considérée comme pathogène du genre *Listeria*, microorganisme formant des colonies typiques sur un milieu solide sélectif et présentant les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques décrites ci-après lorsque les essais sont effectués conformément à la présente norme.

3.2 recherche de *Listeria monocytogenes* Détermination de la présence ou de l'absence de ce microorganisme dans un poids ou un volume déterminé, en effectuant les essais suivant la présente norme.

4 Principe

La recherche de *Listeria monocytogenes* nécessite les quatre phases suivantes (voir également le schéma en annexe A).

NOTE : Pour les produits suspectés d'induire un stress des *Listeria monocytogenes*, il est recommandé de pratiquer une phase préalable de revivification.

4.1 Enrichissement primaire en milieu sélectif liquide

Ensemencement du bouillon d'enrichissement pour *Listeria* (formule Fraser-demi) avec la prise d'essai, puis incubation à 30 °C pendant 18 h à 24 h.

4.2 Isolement de l'enrichissement primaire sur un des deux milieux sélectifs au choix

À partir de la culture obtenue en 4.1, ensemencement de l'une des deux géloses suivantes : Oxford, PALCAM.

4.3 Enrichissement secondaire en milieu sélectif liquide

Réalisation d'une subculture par inoculation de 0,1 ml de la culture obtenue en 4.1 dans 10 ml de bouillon d'enrichissement pour *Listeria* (formule Fraser), puis incubation à 37 °C pendant 18 h à 24 h suivie d'une nouvelle incubation de 18 h à 24 h.

4.4 Isolement de l'enrichissement secondaire

À partir de la culture obtenue en 4.3, et à la fin de chacune des deux périodes d'incubation, ensemencement de l'une des deux géloses suivantes : Oxford, PALCAM.

4.5 Examen des milieux d'isolement (4.2 et 4.4) après 18 h à 24 h et, si nécessaire, 48 h d'incubation à 37 °C afin de détecter la présence de colonies caractéristiques, présumées être des *Listeria*.

4.6 Identification

Repiquage sur une gélose non sélective, par exemple la gélose «tryptone soja aga extrait de levure» (TSAYE), puis identification à l'aide de tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

NOTE : Les colonies de *Listeria monocytogenes* peuvent également être identifiées par toute autre méthode donnant des résultats équivalents.

5 Milieux de culture et réactifs

5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir NF V 08-002.

5.2 Milieux de culture et réactifs

NOTE : En raison du nombre important de milieux de culture et de réactifs, il a été jugé préférable, pour la clarté du texte, de donner leur composition et leur préparation dans l'annexe B.

5.2.1 Bouillons d'enrichissement sélectifs

5.2.1.1 *Bouillon d'enrichissement pour Listeria, formule Fraser-denti* (d'après la référence [2], citée en annexe D)

Voir article B.1.

5.2.1.2 *Bouillon d'enrichissement pour Listeria, formule Fraser* (d'après la référence [3], citée en annexe D)

Voir article B.2.

5.2.2 Milieux d'isolement

5.2.2.1 *Milieu sélectif gélosé pour Listeria, formule Oxford* (d'après la référence [4], citée en annexe D)

5.2.2.1.1 *Base*

Voir paragraphe B.3.1.

5.2.2.1.2 *Suppléments*

Voir paragraphe B.3.2.

5.2.2.1.3 *Milieu complet*

Voir paragraphe B.3.3.

5.2.2.2 *Milieu sélectif gélose pour Listeria, formule PALCAM* (d'après les références [5] et [6] citées en annexe D)

5.2.2.2.1 *Base*

Voir paragraphe B.4.1.

5.2.2.2.2 *Suppléments*

Voir paragraphe B.4.2.

5.2.2.2.3 *Milieu complet*

Voir paragraphe B.4.3.

5.2.3 Milieux d'identification

5.2.3.1 *Gélose tryptone soja aga extrait de levure (TSAYE)*

Voir article B.5.

5.2.3.2 *Gélose au sang*

Les géloses au sang prêtes à l'emploi peuvent être utilisées ; ou utiliser la gélose décrite ci-dessous.

5.2.3.2.1 *Base*

Voir paragraphe B.6.1

5.2.3.2.2 *Suspension d'hématies ou sang de mouton ou de cheval défibriné*

Les réactifs prêts à l'emploi peuvent être utilisés, ou suivre la préparation décrite en 8.6.2.

5.2.3.2.3 *Milieu complet*

Voir paragraphe 8.6.3.

5.2.3.3 *Géloses mobilité*

5.2.3.3.1 *Milieu SIM*

Voir article 8.7.

5.2.3.3.2 *Milieu mobilité*

Voir article 8.8.

5.2.3.4 *Milieus pour la fermentation des hydrates de carbone*

5.2.3.4.1 *Milieu de base*

Voir paragraphe 8.9.1.

5.2.3.4.2 *Solution d'hydrate de carbone*

Voir paragraphe 8.9.2.

5.2.3.4.3 *Milieu complet*

Voir paragraphe 8.9.3.

5.2.3.5 *Gélose et matériel pour test de CAMP (test de Christie, Atkins, Munch-Paterson)*

Voir article 8.10.

5.2.3.6 *Tampon PBS*

Voir article 8.11.

6 Appareillage et verrerie

NOTE : Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et en particulier ce qui suit :

6.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

Voir NF V 08-002.

6.2 Étuves

Une étuve réglable à 25 °C ± 1 °C.

Une étuve réglable à 30 °C ± 1 °C.

Une étuve réglable à 37 °C ± 1 °C.

- 6.3 Boîtes de Petri, stériles, en verre ou en matière plastique, de 90 mm à 100 mm de diamètre.
- 6.4 Bains d'eau, ou dispositifs similaires réglables à $47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, $30\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, et $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.
- 6.5 Tubes à essai et flacons ou fioles de capacité appropriée.
- 6.6 Pipettes graduées à écoulement total, de capacités nominales de 1 ml, 2 ml et 10 ml, graduées respectivement en 0,1 ml, 0,1 ml et 0,5 ml.
- 6.7 Anse bouclée, d'un diamètre d'environ 3 mm, ou fil droit, en platine iridié ou en nickel chrome, ou baguette de verre, ou anse bouclée à usage unique.
- 6.8 pH-mètre, précis à $\pm 0,1$ unité pH à 25 °C .
- 6.9 Dispositif pour le test d'illumination d'Henry.

7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage. L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente norme.

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme du produit concerné. S'il n'existe pas de norme spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la norme spécifique traitant du produit concerné. S'il n'existe pas de norme spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension-mère et dilutions

Pour la préparation de la prise d'essai, voir la norme NF V 08 010 et la norme spécifique traitant du produit concerné. La suspension-mère est réalisée dans le bouillon d'enrichissement (5.2.1.1 Fraser-demi).

9.2 Enrichissement

9.2.1 Enrichissement primaire

Peser ou mesurer aseptiquement x g ou x ml de l'échantillon et ajouter $9x$ du bouillon d'enrichissement (5.2.1.1 Fraser-demi).

Incuber à 30 °C à l'aide de l'étuve (6.2) ou du bain d'eau (6.4) pendant 18 h à 24 h.

9.2.2 Enrichissement secondaire

Transférer 0,1 ml de la culture obtenue en 9.2.1 dans le tube contenant 10 ml de bouillon d'enrichissement (5.2.1.2 Fraser).

Incuber à 37 °C à l'aide de l'étuve (6.2) ou du bain d'eau (6.4) pendant 18 h à 24 h et incuber à nouveau pendant 18 h à 24 h à 37 °C .

9.3 Isolation de *Listeria monocytogenes*

A partir de l'enrichissement primaire

Ensemencer avec une anse (6.7) à partir de la culture obtenue en 9.2.1, la surface d'une gélose Oxford (5.2.2.1) ou PALCAM (5.2.2.2).

A partir de l'enrichissement secondaire

Procéder comme ci-dessus à partir du bouillon obtenu en 9.2.2 et renouveler l'opération à partir du même bouillon incubé 24 h à 48 h.

9.4 Identification

9.4.1 Identification présomptive de *Listeria monocytogenes*

Examiner chacune des trois boîtes d'isolement (9.3) après 18 h à 24 h et, si nécessaire, 48 h d'incubation à 37 °C.

— sur gélose sélective pour *Listeria*, formule Oxford (5.2.2.1), les *Listeria* forment en 24 h des colonies grises ou gris verdâtre luisantes, d'environ 1 mm de diamètre, entourées d'un halo brun-noir ; après 48 h d'incubation, les colonies typiques ont un diamètre d'environ 2 mm, sont incrustées dans la gélose et présentent une dépression centrale ;

— sur gélose sélective pour *Listeria*, formule PALCAM (5.2.2.2), les colonies ont le même aspect mais sont de couleur verdâtre.

Sélectionner cinq colonies typiques sur chaque boîte. S'il y en a moins de cinq, les retenir toutes.

9.4.2 Identification du genre et de l'espèce

La technique classique consiste à purifier la colonie puis à l'identifier à l'aide de tests morphologiques, physiologiques et biochimiques (galerie de tubes ou galerie miniaturisée).

L'identification de la colonie peut également être réalisée par toute autre méthode donnant des résultats équivalents.

9.4.2.1 Isolement des colonies sélectionnées sur TSAYE

Rapiquer les colonies obtenues en 9.4.1 sur des boîtes de gélose TSAYE (5.2.3.1).

Incuber à 30 °C ou à 37 °C pendant au moins 24 h.

Les colonies de *Listeria* mesurent environ 1 mm de diamètre, sont translucides, non pigmentées. Soumises à un éclairage de Henry (6.9), elles apparaissent bleuâtres avec une surface granuleuse.

9.4.2.2 Tests de confirmation du genre *Listeria*

Sélectionner les souches catalase + (voir 9.4.2.2.1), et si nécessaire, Gram + (voir 9.4.2.2.2) et mobiles (voir 9.4.2.2.3).

9.4.2.2.1 Réaction de la catalase

Émulsionner une colonie dans une goutte d'une solution à 20 volumes de peroxyde d'hydrogène. Une réaction positive se traduit par la formation de bulles d'oxygène.

9.4.2.2.2 Coloration de Gram (si nécessaire)

Se reporter au projet de Comité ISO/CD 7218 ([7], en annexe D).

9.4.2.2.3 Examen de la mobilité (si nécessaire)

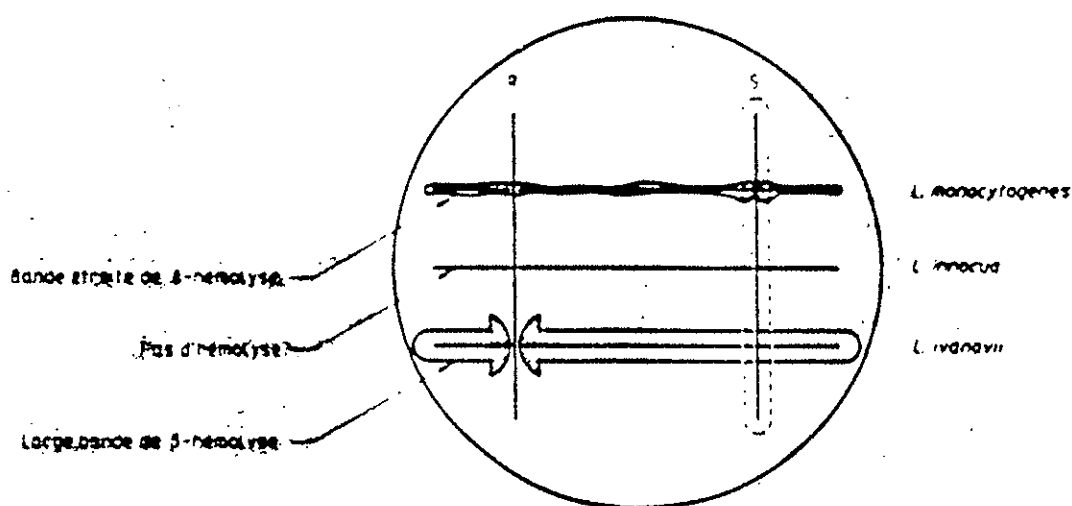
L'examen de la mobilité est réalisé soit à l'état frais (9.4.2.2.3.1), soit en milieu gélosé (9.4.2.2.3.2).

9.4.2.2.3.1 Préparation à l'état frais à partir des colonies obtenues en 9.4.2.1. L'examiner au microscope ; les *Listeria* présentent une mobilité en pirouette caractéristique à 25 °C/30 °C.

9.4.2.2.3.2 Sur une gélose mobile (soit milieu SIM (5.2.3.3.1), soit milieu mobilité (5.2.3.3.2)), inoculée par piqûre centrale et incubée à 25 °C, les *Listeria* poussent autour de la piqûre et présentent le plus souvent une poussée typique dite en ombrelle.

9.4.2.3 Tests de confirmation de l'espèce *Listeria monocytogenes*

9.4.2.3.1 Test de CAMP (voir figure 1).



NOTE 1 : Ensemencer de fines boîtes de gélose au sang comme illustre sur le diagramme. Les lignes verticales représentent les stries de *Staphylococcus aureus* (S) et de *Rhodococcus equi* (R). Les lignes horizontales représentent les stries des cultures d'essai. Les parties hachurées indiquent les zones d'hémolyse développée.

NOTE 2 : La partie en pointillés délimite la zone d'influence de la culture de *Staphylococcus aureus*.

Figure 1 : Ensemencement des boîtes pour le test de CAMP

Ensemencer chacune des deux cultures de *Staphylococcus aureus* et de *Rhodococcus equi* en une strie simple sur la gélose au sang (5.2.3.2) de manière à ce que les deux stries soient parallèles et diamétralement opposées. Il est nécessaire que l'inoculum soit étroit et régulier. Pour cela, pendant l'ensemencement, maintenir le fil d'ensemencement ou l'anse (6.7) perpendiculairement à la gélose. De façon similaire, et perpendiculairement à ces cultures, ensemencer la souche d'essai, de manière à ce que la culture d'essai et les cultures *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi* ne se touchent pas, mais ne soient séparées que d'environ 1 mm à 2 mm. Plusieurs souches d'essai peuvent être déposées sur la même boîte. En même temps, ensemencer des cultures témoins de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Listeria ivanovii*. Incuber les boîtes à 37 °C pendant 18 h à 24 h.

Considérer la réaction comme positive s'il y a une augmentation de la zone de bêta-hémolyse à l'intersection de la souche d'essai avec chacune des cultures de *Staphylococcus aureus* et de *Rhodococcus equi*. La réaction positive avec *Rhodococcus equi* se traduit par la présence d'une large zone d'hémolyse (5 mm - 10 mm) en pelle. Des petites zones (d'environ 1 mm) de faible hémolyse à l'intersection de la souche d'essai avec la culture de *Rhodococcus equi* sont considérées comme des réponses négatives.

Une réaction positive avec *Staphylococcus aureus* apparaît sous forme d'une petite zone arrondie d'hémolyse accentuée ne s'étendant qu'à 2 mm environ de la souche d'essai et dans la zone légèrement hémolytique due à la croissance de la culture de *Staphylococcus aureus*. Il ne se produit pas de larges zones d'hémolyse dans la zone de proximité entre *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*.

9.4.2.3.2 Hémolysé

La réaction hémolytique peut être déterminée en inoculant en spot ou en piqûre la surface d'une gélose au sang (5.2.3.2). Après 24 h à 48 h d'incubation à 37 °C, *Listeria monocytogenes* montre des zones claires étroites et légères (bêta-hémolyse) (voir figure 1).

La réaction hémolytique peut également être déterminée en pratiquant le test à l'aide d'hématies. Emulsionner la colonie dans 150 µl de bouillon TSB+YE (gélose 5.2.3.1 sans agar) ; incubé à 37 °C pendant 2 h ; ajouter 150 µl d'hématies de mouton en solution PBS à 2 % (5.2.3.6). Incuber à 37 °C pendant 15 min à 60 min puis incubé à + 4 °C pendant 2 h environ. Examiner alors la présence ou l'absence d'une hémolyse. Si la réaction est douteuse, prolonger l'incubation à + 4 °C jusqu'à 24 h.

9.4.2.3.3 Fermentation du xylose et du rhamnose

Inoculer les deux milieux liquides (5.2.3.4) et les incubé à 37 °C pendant 48 h.

9.4.2.4 Résumé des tests d'identification

Toutes les *Listeria* sont Gram +, catalase + et mobiles. L'espèce *Listeria monocytogenes* se distingue des autres espèces par l'ensemble des réactions : CAMP (*Rhodococcus equi* -, *Staphylococcus aureus* +), hémolyse -, xylose - et rhamnose + (voir annexe C).

9.5 Confirmation définitive

Les souches qui sont considérées comme des *Listeria monocytogenes* (9.4.2.4) peuvent être envoyées à un laboratoire de référence agréé pour les *Listeria*, en vue d'une identification complète.

L'envoi sera accompagné de tous les renseignements possibles concernant la (les) souche(s).

10 Expression des résultats

Selon les résultats de l'interprétation (9.4.2.4), indiquer la présence ou l'absence de *Listeria monocytogenes* dans la prise d'essai, en spécifiant la masse en grammes ou le volume en millilitres de l'échantillon soumis à l'essai.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer

- la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué, si elle est connue ;
- la méthode utilisée ;
- le résultat d'essai obtenu, et
- si la reproductibilité a été vérifiée, le résultat final obtenu.

Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente norme, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le résultat d'essai.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

12 Assurance de la qualité

Afin de vérifier l'aptitude à rechercher les *Listeria monocytogenes* par les méthodes et avec les milieux décrits dans la présente norme, des échantillons de référence pourront être introduits dans des flacons de contrôle du milieu d'enrichissement (9.2). Procéder avec les flacons de contrôle comme pour les cultures d'essai.

Annexe A

Schéma du mode opératoire

Enrichissement 1^{re} phase

x g ou x ml dans un volume 9x du bouillon «Fraser-demi» (5.2.1.1)



Incubation à 30 °C pendant 18 h à 24 h



Isolement sur Oxford (5.2.2.1)
ou PALCAM (5.2.2.2)

2^e phase

0,1 ml du bouillon «Fraser-demi» dans 10 ml de bouillon «Fraser» (5.2.1.2)



Incubation à 37 °C pendant 18 h à 24 h



Isolement sur Oxford
ou PALCAM



Incubation à 37 °C pendant 18 h à 24 h supplémentaires



Isolement sur Oxford
ou PALCAM

Identification des colonies :

— par des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques (galerie de tubes ou galerie miniaturisée)

- isolement des colonies caractéristiques sur TSAYE ;
- confirmation du genre : catalase et si nécessaire mobilité, Gram ;
- identification de l'espèce : CAMP, hémolyse, xylose, rhamnose ;

— ou par toute autre méthode donnant des résultats équivalents.

Annexe B

B.1 Bouillon d'enrichissement pour *Listeria*, formule Fraser-demi

Composition

Tableau 8.1

Protéose peptone ou peptone équivalente	5,0 g
Tryptone	5,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Chlorure de sodium	20,0 g
Hydrogenophosphate disodique dihydrate	12,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,25 g
Esculine	1,0 g
Chlorure de lithium	3,0 g
Chlorhydrate d'acriflavine	0,012 5 g
Sel de sodium de l'acide nalidixique	0,010 g
Citrate de fer III ammoniacal	0,500 g
Eau	1 000 ml

Préparation

Mélanger tous les composants, sauf l'acide nalidixique, l'acriflavine et le citrate de fer III ammoniacal, avec l'eau, et chauffer modérément jusqu'à dissolution complète.

Ajuster le pH si nécessaire, à l'aide du pH-mètre (6.8), de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2 à 25 °C.

Répartir le milieu, par quantité nécessaire pour l'examen, dans des flacons de capacité appropriée (6.5).

Stériliser à l'autoclave (6.1) le milieu à 121 °C pendant 15 min.

Après refroidissement et juste avant l'utilisation, ajouter, pour 1 000 ml de base définie ci-dessus, les trois solutions suivantes stérilisées par filtration :

- 5 ml d'une solution aqueuse de chlorhydrate d'acriflavine à 2,5 mg/ml ;
- 5 ml d'une solution aqueuse à 2,0 mg/ml de sel de sodium de l'acide nalidixique ;
- 10 ml d'une solution aqueuse de citrate de fer III ammoniacal à 50 mg/ml.

NOTE : L'acide nalidixique peut être ajouté en même temps que les composants de la base et autoclavé (à l'aide de 6.1). Dissoudre dans une solution d'hydroxyde de sodium ($p = 0,05 \text{ mol/l}$) si la solution de sel de sodium de l'acide nalidixique est gardée à 4 °C.

B.2 Bouillon d'enrichissement pour *Listeria*, formule Fraser

Composition

Tableau B.2

Protéose peptone ou peptone équivalente	5,0 g
Tryptone ou peptone équivalente	5,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Chlorure de sodium	20,0 g
Hydrogénophosphate disodique dihydraté	12,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,35 g
Esculine	1,0 g
Chlorure de lithium	3,0 g
Chlorhydrate d'acriflavine	0,025 g
Sel de sodium de l'acide nalidixique	0,020 g
Citrate de fer III ammoniacal	0,500 g
Eau	1 000 ml

Préparation

Mélanger tous les composants, à l'exception de l'acriflavine, de l'acide nalidixique et du citrate de fer, avec l'eau, et chauffer modérément jusqu'à dissolution complète.

Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,2 à 25 °C. Répartir en tubes (6.5) par quantités de 10 ml environ.

Stériliser le milieu à 121 °C pendant 15 min.

Après refroidissement et juste avant l'utilisation, ajouter, pour 10 ml de base définie ci-dessus, les trois solutions suivantes stérilisées par filtration :

- 0,1 ml d'une solution aqueuse à 2,0 mg/ml de sel de sodium de l'acide nalidixique ;
- 0,1 ml d'une solution aqueuse de chlorhydrate d'acriflavine à 2,5 mg/ml ;
- 0,1 ml d'une solution aqueuse de citrate de fer III ammoniacal à 50 mg/ml.

NOTE : L'acide nalidixique peut être ajouté en même temps que les composants de la base et autoclavé. Dissoudre dans une solution d'hydroxyde de sodium ($p = 0,05 \text{ mol/l}$) si la solution de sel de sodium de l'acide nalidixique est gardée à 4 °C.

B.3 Milieu sélectif gélosé pour *Listeria*, formule Oxford

B.3.1 Base

Composition

Tableau B.3

Peptone	23,0 g
Amidon	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar-agar	9 g à 18 g ¹⁾
Esculine	1,0 g
Citrate de fer III ammoniacal	0,5 g
Chlorure de lithium	15,0 g
Eau	1 000 ml
1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

Préparation

Préparer la gélose de base en suivant les instructions du fabricant ou en mélangeant les composants de base déshydratés avec l'eau. Porter à ébullition jusqu'à complète dissolution des composants.

Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

B.3.2 Suppléments

Composition

Tableau B.4

Cycloheximide	0,400 g
Sulfate de colistine	0,020 g
Chlorhydrate d'acriflavine	0,005 g
Céfotetan	0,002 g
Fosfomycine	0,010 g
Éthanol	5 ml
Eau	5 ml

Préparation

Dissoudre les ingrédients déshydratés dans le mélange éthanol/eau.

Stériliser par filtration.

B.3.3 Milieu complet

Composition

Tableau 8.5

Base (B.3.1)	1 000 ml
Suppléments (B.3.2)	10 ml

Préparation

Laisser refroidir la base (B.3.1) à 47 °C et ajouter les suppléments. Répartir le milieu par quantités d'environ 15 ml dans des boîtes de Petri (6.3) stériles et laisser se solidifier.

B.4 Milieu sélectif gélosé pour *Listeria*, formule PALCAM

B.4.1 Base

Composition

Tableau B.6

Peptone	23,0 g
Amidon	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar-agar	9 g a 18 g ¹⁾
D-mannitol	10,0 g
Citrate de fer III ammoniacal	0,5 g
Esculine	0,8 g
D-glucose	0,5 g
Chlorure de lithium	15,0 g
Rouge de phénol	0,08 g
Eau	1 000 ml
<i>1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.</i>	

NOTE : En fonction de la publication et du fournisseur, un extrait de levure (3,0 g) entre dans la composition (référence [5]) ou n'y entre pas (référence [6]).

Préparation

Préparer la gélose de base en suivant les instructions du fabricant ou en mélangeant les composants de base déshydratés avec l'eau. Porter à ébullition jusqu'à complète dissolution des composants.

Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2 à 25 °C.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

B.4.2. Suppléments

Composition

Tableau B.7

Sulfate de polymyxine B	100 000 UI
Ceftazidime ou Latamoxef	0,020 g
Chlorhydrate d'acriflavine	0,005 g
Eau	10 ml

Préparation

Dissoudre les ingrédients déshydratés dans l'eau.

Steriliser par filtration.

B.4.3 Milieu complet

Composition

Tableau B.8

Base (B.4.1)	1 000 ml
Suppléments (B.4.2)	10 ml

Préparation

Laisser refroidir la base (B.4.1) à 47 °C et ajouter les suppléments (B.4.2). Répartir le milieu par des quantités d'environ 15 ml dans des boîtes de Petri stériles et laisser se solidifier.

B.5 Gélose tryptone soja aga extrait de levure (TSAYE)

Composition

Tableau B.9

Tryptone	17,0 g
Peptone de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,5 g
Glucose	2,5 g
Extrait de levure	6,0 g
Agar-agar	12 g à 18 g ¹⁾
Eau	1 000 ml
<i>1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.</i>	

Préparation

Dissoudre les composants déshydratés ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en portant à ébullition.

Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,3 à 25 °C.

Répartir en flacons et stériliser à 121 °C pendant 15 min.

B.6 Gélose au sang

B.6.1 Base

Composition

Tableau B.10

Blood agar base n° 2 :	
— Protéose peptone ou peptone équivalente	15 g
— Hydrolysat de foie	2,5 g
— Extrait de levure	5 g
— Chlorure de sodium	5 g
— Agar-agar	9 g à 18 g ¹⁾
Eau	1 000 ml
<i>1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.</i>	

NOTE : Toute base équivalente à la Blood agar base n° 2 peut être utilisée.

Préparation

Dissoudre les composants de base déshydrates dans l'eau en portant à ébullition.

Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 à 7,5 °C.

Repartir en flacons et stériliser à 121 °C pendant 15 min.

B.6.2 Suspension d'hématies

Composition

Tableau B.11

Sang	168 ml
Acide citrique	0,29 g
Citrate disodique	0,80 g
Glucose	1,80 g
Eau	8,4 ml

Préparation

Recueillir du sang d'un animal sain (mouton, bovin ou cheval) dans des conditions stériles et le mélanger à un liquide stérile stabilisant (voir ci-dessus).

Repartir ce mélange dans des tubes et centrifuger à 900 × g (g = 9,81) pendant 30 min.

Éliminer le plasma stérilement et resuspendre les hématies dans un volume équivalent au volume initial d'une solution de chlorure de sodium isotonique (0,85 %). Faire deux lavages au moins.

B.6.3. Milieu complet

Composition

Tableau B.12

Milieu de base (B.6.1)	100 ml
Suspension d'hématies (B.6.2) ou sang de mouton ou cheval défibriné	5 ml à 7 ml

Préparation.

Ajouter au milieu de base (B.6.1) fondu et refroidi à 47 °C, soit le sang de mouton ou de cheval défibriné, soit la suspension d'hématies (voir ci-dessus) ou prête à l'emploi.

Mélanger convenablement et couler en boîte de Petri stérile à raison de 12 ml à 20 ml.

B.7. Milieu SIM

Composition

Tableau B.13

Tryptone	20,0 g
Peptone	6,1 g
Sulfate d'ammonium et de fer	0,2 g
Thiosulfate de sodium	0,2 g
Agar-agar	3 g à 6 g ¹⁾
Eau	1 000 ml
<i>1) Selon de pouvoir géifiant de l'agar-agar.</i>	

Préparation

Mélanger les composants déshydratés ou le milieu complet déshydraté avec l'eau, et chauffer modérément jusqu'à dissolution complète.

Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,3 à 25 °C.

Répartir en tubes à raison de 5 ml à 6 ml par tube.

Stériliser à 121 °C pendant 15 min.

B.8 Milieu mobilité.

Composition

Tableau B.14

Peptone de caséine	20,0 g
Peptone de viande	6,1 g
Agar-agar	3 g à 6 g ¹⁾
Eau	1 000 ml
<i>1) Selon le pouvoir géifiant de l'agar-agar.</i>	

Préparation

Mélanger les composants déshydratés ou le milieu complet déshydraté avec l'eau, et chauffer modérément jusqu'à dissolution complète.

Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,3 à 25 °C.

Répartir en tubes à raison de 5 ml par tube.

Stériliser à 121 °C pendant 15 min.

B.9 Milieux pour la fermentation des hydrates de carbone

B.9.1 Milieu de base

Composition

Tableau B.15

Protéose peptone ou peptone équivalente	10,0 g
Extrait de viande	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Pourpre de bromocresol	0,02 g
Eau	1 000 ml

Préparation

Mélanger les composants déshydratés ou le milieu complet déshydraté avec l'eau, et chauffer modérément jusqu'à dissolution complète.

Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,8 à 25 °C.

Répartir en tubes, de sorte qu'après stérilisation, ils contiennent 9 ml dans le cas d'ajout de solution

Lors d'utilisation de disques imprégnés d'hydrate de carbone, le volume est de 10 ml.

Stériliser à 121 °C pendant 15 min.

B.9.2 Solution d'hydrate de carbone

Composition

Tableau B.16

Hydrate de carbone (D-xylose ou L-rhamnose)	5 g
Eau	100 ml

Préparation

Dissoudre séparément les hydrates de carbone dans l'eau et stériliser par filtration en utilisant une membrane de porosité 0,45 µm.

B.9.3 Milieu complet

Composition

Tableau B.17

Milieu de base	9 ml
Solution d'hydrate de carbone	1 ml

Préparation

Préparer des milieux afin que la concentration finale en xylose ou rhamnose soit de 0,5 %, soit par adjonction de 1 ml de solution de xylose ou rhamnose (B.9.2) à 9 ml de milieu de base (B.9.1), soit par addition d'un disque à 10 ml de milieu de base (B.9.1).

B.10 Gélose et matériel pour le test de CAMP (test de Christie, Atkins, Munch-Paterson)

Composition de la gélose

Voir article B.6 (gélose au sang).

Souches test

Une souche de *Staphylococcus aureus* fortement bêta-hémolytique ; par exemple CIP 5710 (Collection de l'Institut Pasteur de Paris).

Une souche de *Rhodococcus equi* ; par exemple CIP 5869.

Il est recommandé de détenir des souches de *Listeria* des différentes espèces (*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Listeria ivanovii*).

Entretenez les cultures par exemple sur des géloses inclinées TSAYE incubées à 37 °C pendant 24 h à 48 h et stockées à 4 °C.

Repiquer les souches régulièrement (au moins une fois par mois).

B.11 Tampons PBS

Composition:

Tableau B.18

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,98 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,71 g
NaCl	8,5 g
Eau distillée	1 000 ml

Préparation:

Dissoudre les ingrédients dans l'eau.

Stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7.2 à 25 °C.

Annexe C

Identification des espèces de *Listeria*

Tableau C.1

Espèce	Hémolyse	Test de CAMP		D-xylose	L-rhamnose	Mannitol	Réduction des nitrates
		<i>R.equi</i>	<i>S.aureus</i>				
<i>L.monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-	-
<i>L.innocua</i>	-	-	-	-	V	-	-
<i>L.ivanovii</i>	+	+	-	+	-	-	-
<i>L.welshimeri</i>	-	-	-	+	V	-	-
<i>L.seeligeri</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>L.grayi</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>L.murrayi</i>	-	-	-	-	-	+	+

Annexe D

Bibliographie

- [1] Projet de Comité CD 11290 « Recherche des *Listeria monocytogenes* » issu de l'ISO/TC 34/SC 9 (en préparation)
- [2] Holbrook R., Anderson J.M., Briggs T.A., Barrett P., Blades J.A., and Sheard P. : Faster detection of *Listeria* in food using rapid immunoassay following culture, 3rd World congress foodborne infections and intoxications, 16-19 June 1992, Berlin, 1208-1210.
- [3] Fraser J.A., and Sperber V.H. : Rapid Detection of *Listeria* spp. in Food and environmental samples by esculin hydrolysis, J. Food Protec., 1988, n° 51, 762-765.
- [4] Curtis G.D.W., Mitchell R.G., King A.F. and Griffin E.J. : A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*, Letters in Applied Microbiology, n° 8, 1989, 95-98.
- [5] Van Netten P., Perales L., van de Moosdijk A., Curtis G.D.W. and Mossel D.A.A. : Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. Monocytogenes* and other *Listeria* spp., International Journal of Food Microbiology, n° 8, 1989, 229-316.
- [6] Pharmacopœia of culture Media for Food Microbiology — Food 00M10, Polymycin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol (PALCAM) agar, Int. Journal of Food Microbiology, n° 9, 1989, 111-113.
- [7] Projet de Comité CD 7218 (révision) « Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques ».

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1- AUJOULAT A.
Epidémiologie des Listeria dans les listérioses d'origine alimentaire.
Thèse Université Limoges, 1996.
- 2- BILLE J., CATIMEL B., BANNERMAN E., JACQUET C., YERSIN M.N.,
CANIAUX I.
Api-Listeria, a new and promising one-day system to identify Listeria isolates.
Applied and environmental microbiology, 1992, Vol. 58, 1857-1860.
- 3- BIND J.L.
Analyse critique des méthodes de recherche, de dénombrement et
d'identification des Listeria en industrie agro-alimentaire.
Compte-rendu des conférences prononcées à l'occasion du séminaire CPCIA
d'octobre 1990. Paris, APRIA, 59-94.
- 4- BIND J.L.
Mise en évidence et dénombrement des Listeria à partir de produits laitiers.
Laits, 1991, 71, 99-105.
- 5- BOLTON F.J., POLLOCK H., POWELL S.
Une nouvelle méthode de détection rapide de Listeria spp. dans les aliments par
conductance métrie.
- 6- BUTIN M.
Travaux de validation d'une nouvelle méthode rapide pour la détection des
Listeria dans les produits alimentaires.
Compte-rendu journée de formation "Hygiène alimentaire" du 15 septembre
1994.
- 7- JOFFIN J.N.
Techniques d'étude des Listeria dans les aliments.
L'opéron, 20, (2), Janvier 1995, 3-8.
- 8- LARPENT J.P.
Méthodes d'isolement de recherche et d'identification.
Les Listeria, Fevrier 1995, 3-27.

- 9- LARPENT J.P.
Taxonomie et physiologie.
Les Listeriaz, Fevrier 1995, 3-27.
- 10- MENUQUIER A.
Epidémiologie des Listeria en agro-alimentaire et épreuve de virulence des souches isolées.
Thèse Université Limoges, 1992.
- 11- MOUNIER M., DENIS F.
Les Cocci Gram Positifs.
Bactériologie médicale, techniques usuelles.
EDS SIMEP, 1990, 105-115.
- 12- Norme AFNOR V08-D55.
Recherche de Listeria monocytogenes.
Décembre 1993.
- 13- Oxoid, le manuel. Sempt 1992, 134-143.
- 14- RENAUD F., FRENEY J.
Listeria. Lyon pharmaceutique, 1988, Vol. 39, 3, 175-181.
- 15- ROCOURT J.
Listeriose humaine : aspects cliniques et épidémiologiques.
Rôle de l'alimentation.
Le Biologiste, 179, 29-40.
- 16- ROCOURT J., JACQUET C.
Intérêt du typage de Listeria monocytogenes dans la surveillance épidémiologique de la listeriose humaine en France.
Epidémiologie et santé animale, Vol. 24, 1993, 1-7.
- 17- ROCOURT J., JACQUET C.
Listeriose humaine.
Feuillet de biologie, 1992, Vol. 33, 184, 11-19.

- 18- SEELIGER H-P.R., JONES D.
Genus *Listeria*. In "Bergey's manual of systematic bacteriology". SNEATH P.H.A., MAIR N.S., SHARPE M.E., HOLT J.G. Eds. Baltimore, Williams and Wilkins, 1986, 1235-1245.
- 19- SKEJERVE E., RORVIK L.M., OLSVIKO.
Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. *Applied and environmental microbiology*, 1990, Vol. 11, 3478-3481.
- 20- VILLELGA K.
Lancement d'un nouveau produit : ListerTest. Rapport de stage, 1994.

**TABLE
DES
MATIERES**

PLAN	9
INTRODUCTION.....	13
PREMIERE PARTIE LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE RECHERCHE DES LISTERIA DANS LE LAIT.....	15
I-PRINCIPE DE L'ENRICHISSEMENT SELECTIF.....	17
I-1-TECHNIQUE D'ENRICHISSEMENT AU FROID DE GRAY	17
I-2-INHIBITEURS CHIMIQUES.....	17
II-LES METHODES.....	20
II-1-METHODE FDA PRECONISEE PAR LA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION	20
II-2-NORME FIL.....	22
II-3-AUTRES PROTOCOLES UTILISES PAR CERTAINS LABORATOIRES DE CONTRÔLE.....	23
II-3-1-Dans le lait	23
II-3-2-Dans les fromages.....	24
III-IDENTIFICATION	25
III-1-CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES COMMUNS AU GENRE LISTERIA	25
III-2-DIFFERENCIATION ENTRE LES ESPECES DE LISTERIA	26
III-3-TYPAGE.....	29
III-3-1-Sérotypage.....	29
III-3-2-Lysotypage.....	31
IV-METHODES RAPIDES DE DETECTION DES LISTERIA.....	32
IV-1-LISTERTEST.....	32
IV-2-LISTERSCREEN	35
IV-3-LISTERIA RAPID TEST (OXOID)	37
IV-4-METHODE MALTHUS.....	37
IV-5-LISTERIA DETECTION KIT (TRANSIA).....	39
IV-6-GENE-TRAK ET GENPROBE.....	40

DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION PERSONNELLE	41
I-MATERIEL ET METHODES	43
I-1-ECHANTILLONS DE LAITS.....	43
I-2-MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS.....	43
I-2-1-Bouillon d'enrichissement primaire.....	43
I-2-2-Bouillon d'enrichissement secondaire.....	44
I-2-3-Supplément Fraser.....	44
I-2-4-Gélose Palcam	44
I-2-5-Gélose trypticase soja.....	45
I-2-6-Coloration de Gram.....	45
I-2-7-Recherche de la catalase.....	46
I-2-8-Eau peptonée.....	46
I-2-9-Gélose nitrate	46
I-2-10-Gélose au sang de mouton.....	47
I-2-11-CAMP-test.....	48
I-2-12-Galerie Api-Listeria.....	48
I-3-PROTOCOLE SUIVI SELON LA NORME AFNOR V08-055.....	50
II-RESULTATS	52
II-1-ISOLEMENT DES LISTERIA	52
II-2-IDENTIFICATION DU GENRE	53
II-3-DIFFERENCIATION DES ESPECES DE LISTERIA.....	53
II-4-RESULTATS DES LAITS DE VACHES.....	57
II-5-RESULTATS DES LAITS DE CHEVRES.....	58
II-5-1-Première série de 57 laits de chèvres C1 à C57	58
II-5-2-Deuxième série de 42 laits de chèvres C58 à C99	59
III-DISCUSSION	64
CONCLUSION	66
ANNEXE	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93

BON A IMPRIMER N° 6

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

ROSIER (Stéphanie) - Recherche de *Listeria* dans le lait de chèvre - 99 f, ill ; tabl ; (Thèse : Pharm ; Limoges ; 1996)

RESUME :

Les *Listeria* sont des bactéries que l'on retrouve largement dans les aliments ; elles représentent un risque d'infections graves chez la femme enceinte, le nouveau-né et le sujet âgé.

Dans ce travail, nous avons réalisé une recherche de *Listeria* dans 99 laits crus de chèvres selon la méthode décrite par la norme AFNOR V08-055.

Sur 42 laits nous avons élargi l'expérimentation en ajoutant une étape de pré-enrichissement au froid.

Les résultats ont montré que 13 % des laits contiennent des *Listeria* dont 4 % de *L. monocytogenes*, 4 % de *L. ivanovii* et 5 % de *L. innocua*.

Après enrichissement au froid deux *Listeria* dont une *monocytogenes* ont été mises en évidence. Ainsi les laits contenant des *Listeria* pathogènes représentent un risque potentiel de contamination des produits dérivés, c'est à dire des fromages crus de chèvres.

MOTS CLES :

- *Listeria*
- Lait
- Chèvre

JURY : Président Madame le Professeur C. BOSGIRAUD
 Juges : Monsieur G. HABRIOUX, Professeur à l'Université de Limoges
 Monsieur R. ARNAUD, Docteur vétérinaire à la DSV
 Madame A. MARIE-DARAGON, Docteur en Pharmacie.
