

UNIVERSITE DE LIMOGES

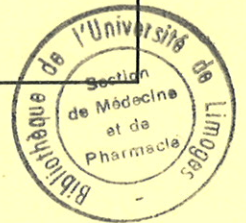
Faculté de Pharmacie

ANNEE 1997

THESE N° 340

*RECHERCHE EXPERIMENTALE DE
LISTERIA DANS LES FROMAGES DE
CHEVRE.
LA QUALITE BACTERIOLOGIQUE DES
FROMAGES ET LES MESURES DE
PREVENTION.*

THESE
Pour le
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE



présentée et soutenue publiquement le 10 décembre 1997

par
Delphine DELIAT
née le 09 avril 1971 à Limoges (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur BOSGIRAUD	- Président
Madame DELEBASSEE - Maître de conférence	- Juge
Monsieur ARNAUD - Docteur vétérinaire à la DSV	- Juge
Monsieur POURET - Pharmacien	- Juge

Errata

Malgré le plus grand soin porté à la réalisation de ce document, quelques erreurs de frappe subsistent.

Veuillez avoir l'obligeance de les corriger comme suit, en acceptant toutes nos excuses.

P : 39 Veuillez lire

Fromage n° 14

DIM	ESC	α Man	DARL	XYL	Rha	MDG	RIB	GIP	TAG
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
	3			5			1		0

Au lieu de

DIM	ESC	α Man	DARL	XYL	Rha	MDG	RIB	GIP	TAG
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
	3			5			1		0

P : 46 Veuillez lire

Tableau 9 : Nombre d'exploitations par département

Au lieu de

Tableau 9 : Nombre d'exploitation par département

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNEE 1997

THESE N° 40

*RECHERCHE EXPERIMENTALE DE
LISTERIA DANS LES FROMAGES DE
CHEVRE.
LA QUALITE BACTERIOLOGIQUE DES
FROMAGES ET LES MESURES DE
PREVENTION.*



THESE
Pour le
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 10 décembre 1997

par
Delphine DELIAT
née le 09 avril 1971 à Limoges (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur BOSGIRAUD	- Président
Madame DELEBASSEE - Maître de conférence	- Juge
Monsieur ARNAUD - Docteur vétérinaire à la DSV	- Juge
Monsieur POURET - Pharmacien	- Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES**FACULTE DE PHARMACIE**

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS :Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur DREYFUSS Gilles – Maître de Conférence**PROFESSEURS :****BENEYTOUT** Jean-Louis

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

BERNARD Michel

PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

BOSGIRAUD ClaudineBACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PARASITOLOGIE**BROSSARD** Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD JacquesCHIMIE ORGANIQUE
CHIMIE THERAPEUTIQUE**CARDOT** Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE-CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS**POMMARET** Maryse

Je dédie ce travail,

A MES PARENTS

Qui m'ont soutenue tout au long de mes études universitaires.

Avec toute mon affection.

A NORBERT

A MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MADAME LE PROFESSEUR C. BOSGIRAUD,

Professeur des Universités de Bactériologie – Virologie –

Parasitologie

(Faculté de Pharmacie de Limoges).

Nous sommes sensibles à l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de diriger ce travail.

Vous avez toujours été disponible et attentive à nos questions et vous nous avez toujours accueillis avec gentillesse et bienveillance.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A NOS JUGES

MADAME S. DELEBASSEE

Maître de conférence

Service de Bactériologie – Virologie – Parasitologie

MONSIEUR R. ARNAUD

Docteur Vétérinaire de la DSV

MONSIEUR M. POURET

Pharmacien à Nexon

Maître de stage de 6^{ème} année

Vous nous avez fait l'honneur de vous intéresser à notre sujet de thèse en acceptant de siéger à ce jury.

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

A MADAME R. MOUZET

Technicienne au laboratoire de Bactériologie – Virologie –
Parasitologie

Pour votre accueil chaleureux et votre précieuse aide,
nous vous exprimons nos sincères remerciements.

PLAN

INTRODUCTION

PARTIE 1 : LES FROMAGES DE CHEVRE

I. Fabrication du fromage de chèvre

A. Définitions

B. Fabrication

1. Caillage

2. Egouttage

3. Affinage

II. Classification

A. Les fromages frais

B. Les fromages à pâte molle

C. Les fromages à pâte persillée

D. Les fromages à pâte pressée

E. Les fromages fondus

PARTIE 2 : EXPERIMENTATION PERSONNELLE

I. Matériel et méthode

A. Les fromages testés

B. Protocole suivi selon la norme AFNOR V08-055

1. Principe

2. Les milieux de culture

- a) Bouillon d'enrichissement primaire
- b) Bouillon d'enrichissement secondaire
- c) Supplément Fraser
- d) Gélose Palcam
- e) Gélose trypto-caseine soja

3. Tests utilisés pour la détermination du genre et de l'espèce

- a) Coloration de Gram
- b) Test de mobilité
- c) Recherche de la catalase
- d) Recherche de l'attaque de l'esculine
- e) La nitrate réductase
- f) β hémolyse
- g) Galerie API Listeria

II. Résultats

A. Analyse de nos échantillons

B. Identification des bactéries

C. Conclusion

PARTIE 3 : ETUDE COMPARATIVE ET DISCUSSION

I. Programme Listeria dans la région centre en 1994

II. Programme Listeria dans la région centre en 1995

III. Résultats fournis par la Direction des Services

Vétérinaires de Limoges

IV. Résultats de la recherche de Listeria dans le lait cru

de chèvre réalisée au laboratoire de Microbiologie de la

faculté de Limoges en 1995

V. Discussion

PARTIE 4 : PREVENTION DES LISTERIA EN FROMAGERIE

I. Les sources de contamination des fromages

A. Contamination par le lait

1. Origine intramammaire

2. Origine extramammaire

- a) *La peau des trayons*
- b) *L'ensilage et les fèces*
- c) *Mauvaise hygiène du logement et de la traite*
- d) *Cas particulier du stockage : le tank à lait*
- e) *Schéma résumant les origines extramammaires*

B. Contamination au niveau de la fabrication des fromages

II. Prévention

A. Actions de lutte dans la production laitière

1. L'ensilage

2. La propreté des animaux

3. L'assistance à la traite

4. Identification et élimination des bêtes excrétrices

B. Actions de lutte dans la fromagerie

1. Le personnel

2. Les locaux

3. Le matériel de fabrication

4. Limitation de la multiplication des Listeria

C. Contrôles officiels et autocontrôles

1. Les contrôles officiels

2. Les autocontrôles

3. Périodicité des contrôles

CONCLUSION

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

La démarche de notre travail est la continuité d'une étude menée en 1995 dans le laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Limoges.

Cette étude portait sur la recherche de bactéries du genre *Listeria* dans le lait de chèvre.

Comme cela a été décrit, ce lait peut contenir des *Listeria* et notamment des *L. monocytogenes* pathogènes pour l'homme.

Plusieurs épidémies de listériose ont eu pour origine des fromages contaminés à base de lait de vache. Le lait de chèvre servant essentiellement à la fabrication des fromages, les résultats de l'étude précédente nous ont conduits à observer ce qu'il en est en fromagerie caprine.

Pour comprendre les modes de contamination possible des fromages de chèvre au lait cru par les *Listeria*, nous avons développé une première partie sur la fabrication des fromages et leur classification.

Notre expérimentation personnelle a porté sur la recherche de *Listeria* dans les fromages de chèvre au lait cru en utilisant le protocole préconisé par l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

Par la suite, une étude comparative nous a permis de discuter nos résultats.

Enfin nous avons présenté les moyens de prévention des *Listeria* en fromagerie.

PARTIE 1

Les fromages de chèvre

I. Fabrication du fromage de chèvre

A. Définitions

10

D'après le décret N° 88 – 1206 du 30 décembre 1988, chapitre I et III.

- La dénomination « **fromage** » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeure, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse.

La teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23 g pour 100 g de fromage.

- **Un fromage au lait cru** est fabriqué exclusivement avec du lait qui n'a pas été chauffé au delà d'une limite de température fixée à 40°C.

- **Un fromage de chèvre** doit être fabriqué exclusivement avec du lait de chèvre.

B. Fabrication

9

1. Caillage ou (coagulation)

Il correspond à la solidification de la caséine du lait qui aboutit à la formation d'un gel : le coagulum et d'une phase aqueuse : le lactosérum ou petit lait.

Il existe deux types de coagulation :

- la coagulation lactique,
- la coagulation présure.

La première est naturelle et spontanée. En effet, c'est la flore lactique du lait qui va transformer le lactose en acide lactique ; ceci aura pour conséquence de diminuer le pH : ce dernier provoquera le départ du caillage à partir de 5,2.

La seconde utilise la présure, extraite de la caillette des veaux. Elle contient deux enzymes gastriques coagulantes : la chymosine et la pepsine. Par ce protocole le caillé est obtenu plus rapidement.

Dans la fabrication des fromages de chèvre, les caillés sont le plus souvent issus d'une coagulation mixte, sauf pour les fromages frais obtenus uniquement par fermentation lactique.

2. L'égouttage

Il permet l'évacuation de la phase aqueuse.

De cette séparation, se formera d'un côté un bloc pâteux composé essentiellement de caséine, de matières grasses et de sels minéraux : c'est le fromage frais ; et d'un autre côté un liquide opalescent et acide, c'est le lactosérum qui contient dissous dans l'eau, du lactose, des matières azotées solubles (albumine, globuline...) et des sels minéraux.

3. L'affinage

Il correspond à la digestion enzymatique du caillé après égouttage. Cette maturation va aboutir à une transformation plus ou moins prononcée qui modèlera la composition, l'aspect, la texture et la saveur de la pâte.

Outre les enzymes naturelles du lait, telle la lipase et la protéase, on retrouve les enzymes coagulantes de la présure et celles des microorganismes :

- les enzymes protéolytiques des streptocoques lactiques des moisissures, des levures et bactéries lactiques,
- les lipases des moisissures ou les lipases bactériennes : *Geotrichum candidum* et quelquefois de Staphylocoque.

La durée de l'affinage doit être d'au moins 10 jours pour assurer au fromage une maturation suffisante.

II. Classification des fromages

10

En France, les fromages sont habituellement classés en cinq catégories : les fromages frais, les fromages à pâte molle, les fromages à pâte persillée, les fromages à pâte pressée et les fromages fondus.

A. Les fromages frais

Ils contiennent 11 à 30 % d'extrait sec.

Ils ne subissent aucun affinage. Ce sont principalement les fromages blancs, les petits suisses, les pâtes salées et aromatisées par le poivre, l'ail ou les fines herbes, les fromages frais traditionnels de vache, de chèvre ou de brebis.

Ces fromages ne pourront subir qu'une fermentation lactique.

B. Les fromages à pâte molle

Pour ces fromages, la valeur de l'extrait sec est supérieure à 36 %. Leur caillé est mixte, à la fois lactique et présuré. De plus ils sont affinés.

Ils sont eux mêmes subdivisés en trois groupes :

- Les fromages à croûte fleurie : recouverte d'un feutrage blanc ou bleu de moisissures. Ce sont par exemple le Camembert, le Brie ou certains fromages de chèvre comme le Pouligny St Pierre ou le Sainte Maure.
- Les fromages à croûte lavée : la croûte a une teinte orange ou rouge. Ce sont par exemple le Pont l'Evêque ou le Munster.
- Les fromages à croûte séchée : ils regroupent de nombreux fromages de chèvre, par exemple le crottin de Chavignol ou le Cabecou.

C. Les fromages à pâte persillée

Ils contiennent 50 à 55 % d'extrait sec. Ce sont des fromages à moisissures internes, de couleur bleue à bleu-vert et à pâte assez ferme, ce sont par exemple le Rocquefort et le Bleu d'Auvergne.

D. Les fromages à pâte pressée

La valeur de l'extrait sec varie de 44 à 62 %. Leur caillage est de type présure. Au cours de la fabrication, le caillé est découpé, pressé et éventuellement chauffé.

Ils sont subdivisés en deux groupes :

- les pâtes pressées non cuites, comme par exemple le Cantal ou le Reblochon.
- les pâtes pressées cuites : elles sont chauffées à 53°C au cours de l'égouttage, par exemple le Comté, le Beaufort ou le Gruyère.

E. Les fromages fondus

L'extrait sec est supérieur à 34 %.

Ils sont obtenus par cuisson d'un mélange de divers fromages, par exemple les crèmes de gruyère ou les pâtes à tartiner en portion.

PARTIE 2

Expérimentation

personnelle

Notre étude a consisté à rechercher la présence ou non de *Listeria* dans les fromages de chèvre au lait cru.

Pour cela nous avons appliqué la norme AFNOR V08-055 publiée en décembre 1993 (voir annexe 1).

Cette 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.

I. Matériel et méthode

A. Les fromages testés

Notre analyse a porté sur 99 fromages de chèvre au lait cru provenant de 18 départements différents (voir la carte 1). Elle s'est déroulée du 15 janvier au 15 juillet 1996, la recherche des *Listeria* se faisant au coup par coup, dès la réception des fromages.

28 % de ces fromages ont été fabriqués par une coopérative et 72 % à la ferme.

Nos échantillons peuvent être classés selon les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : Répartition selon le lieu d'achat.

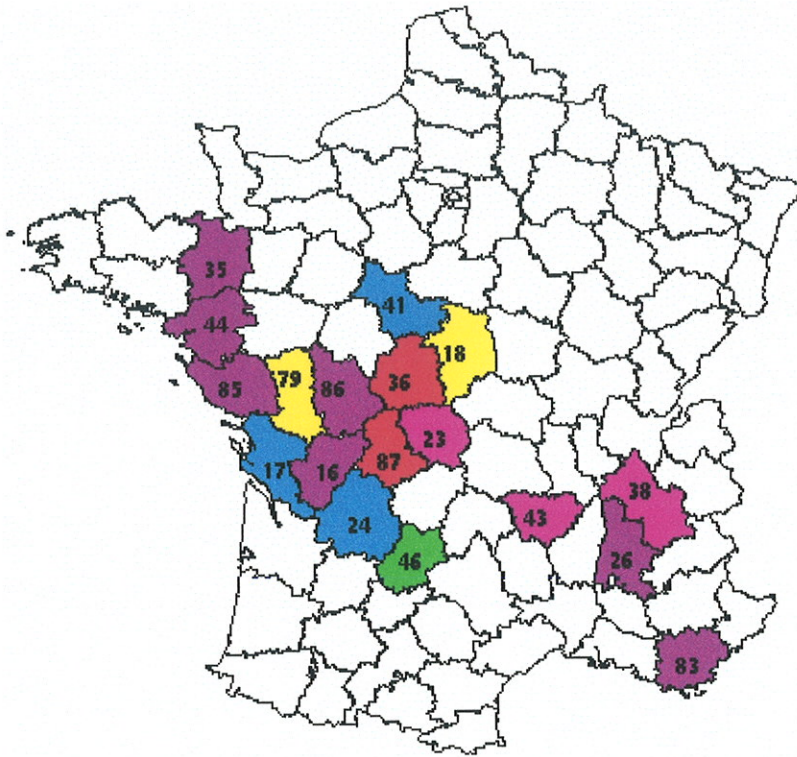
Supermarchés	Marchands de fromages	Marchés
29	8	62

Tableau 2 : Répartition selon le type de fromage.

Fromages frais	Fromages à pâte molle		
14 %	Fromages à croûte		Fromages à moisissures externes
	Séchée	Cendrée	29 %
	33 % Exemples : - Crottin de Chavignol - Cabecou - St Marcelin	24 % Exemples : - Selles du Cher - - Valençay	Exemples : - Levroux - Chabichou - Pouligny St Pierre - Sainte-Maure

Carte 1 : REPARTITION DES FROMAGES TESTES

SELON LEUR ORIGINE GEOGRAPHIQUE



Nombre de fromages	
	1
	2
	3
	4
	De 5 à 10
	> à 25

B. Protocole suivi selon la norme AFNOR V08-055

1. Principe

14

La recherche de *Listeria* nécessite les 7 phases suivantes :

- Obtention de la prise d'essai

Une prise d'essai de 25 grammes de fromage est prélevée délicatement de façon stérile à l'aide d'un scalpel puis pesée stérilement sur une balance Sartorius.

L'échantillon comprend la croûte plus le cœur du fromage.

- Enrichissement primaire en milieu sélectif liquide

L'échantillon est broyé à l'aide d'un mixeur Waring Blendor, préalablement stérilisé au four Pasteur 30 minutes à 180°C, contenant 225 ml de bouillon Fraser – demi additionné de 2,25 ml de supplément Fraser. Après broyage, le contenu du mixeur est transvasé dans un flacon de 300 ml stérile, puis celui-ci est mis à incuber à 30°C pendant 24 h.

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

0,1 ml de la culture obtenue est repiqué en stries sur une gélose Palcam.

N.B. : La gélose Palcam peut être remplacée par la gélose Oxford et ensemencée de la même façon.

- Enrichissement secondaire en milieu sélectif liquide

0,1 ml de la culture obtenue sur Fraser-demi est inoculé dans 10 ml de bouillon d'enrichissement Fraser additionné de 0,1 ml de supplément, puis incubé à 37°C pendant 24 h et 48 h.

- Isolement de l'enrichissement secondaire

A la fin de chacune des deux périodes d'incubation, 24 h et 48 h, 0,1 ml de la culture précédente est repiqué sur une gélose Palcam.

- Examen des différents milieux d'isolement Palcam

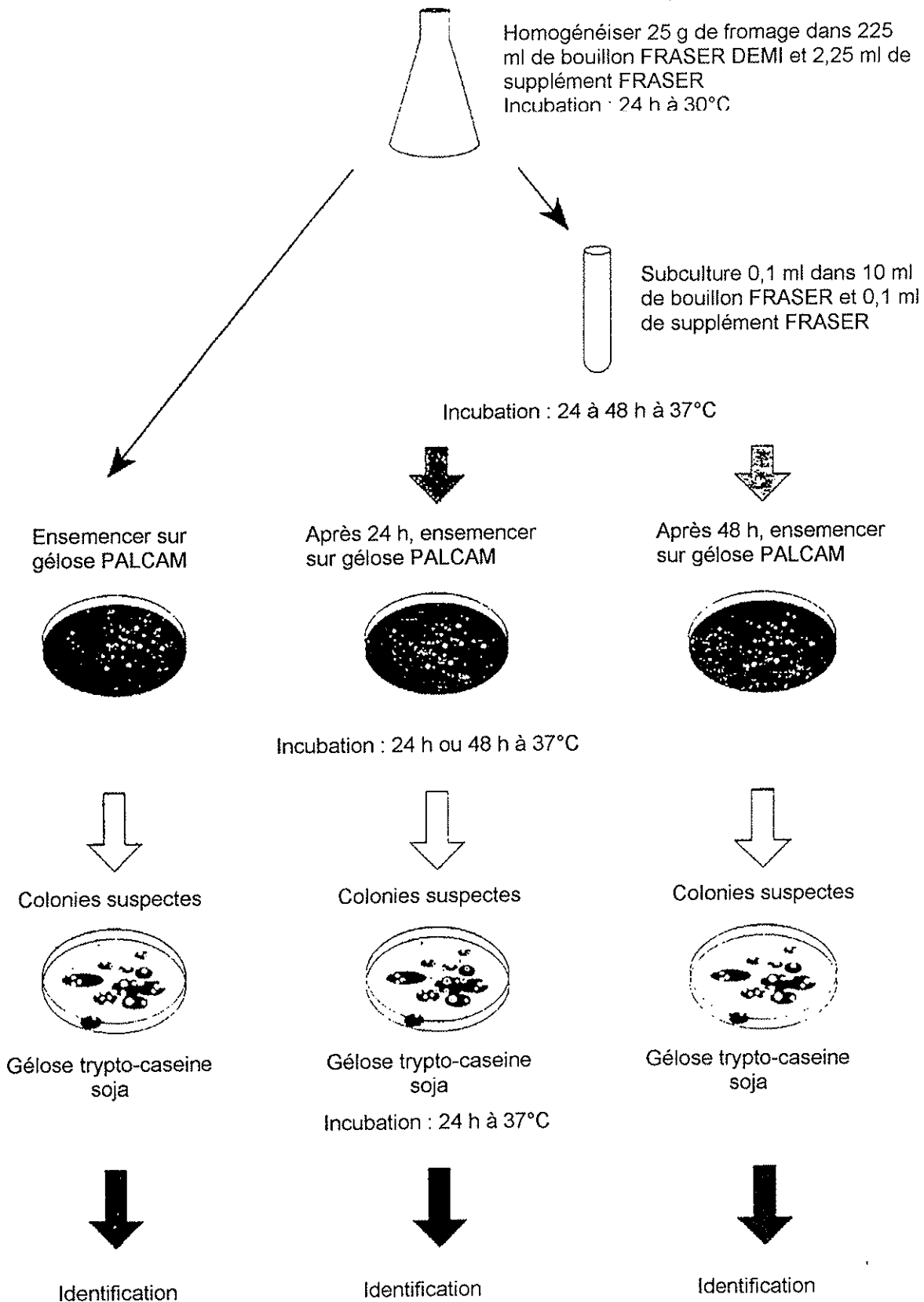
L'observation des milieux Palcam est faite après 24 h et si nécessaire après 48 h d'incubation à 37°C de façon à détecter la présence de colonies caractéristiques.

- Identification

Les colonies suspectes sont repiquées sur une gélose non sélective, gélose trypto-caséine soja, puis incubées 24 h à 37°C.

L'identification se fait à l'aide des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

**Méthode de routine de détection de *Listeria monocytogènes*
selon la norme AFNOR V08-055**



2. Les milieux de culture

Le principe de base de cette méthode est d'incuber en milieu liquide un broyât de produit à analyser. Ce bouillon doit contenir des substances inhibant les autres microorganismes afin d'obtenir un enrichissement relatif en *Listeria*. Les repiquages se font sur des géloses sélectives ou non.

8

*a) Bouillon d'enrichissement primaire : Bouillon Fraser-demi
(A.E.S. Laboratoire)*

Les inhibiteurs chimiques de ce bouillon sélectif sont l'acide nalidixique, l'acriflavine et le chlorure de lithium. La formule complète est donnée dans la norme AFNOR située en annexe 1.

*b) Bouillon d'enrichissement secondaire : Bouillon Fraser
(A.E.S. Laboratoire)*

Ce bouillon est deux fois plus concentré en acide nalidixique et en acriflavine que le Fraser-demi.

c) Supplément Fraser (A.E.S. Laboratoire)

Il permet de fournir du citrate ferrique ammoniacal aux bouillons Fraser-demi et Fraser au moment de leur utilisation.

d) *Gélose Palcam (A.E.S. Laboratoire)*

C'est un milieu sélectif solide pour la recherche de *Listeria*. Les inhibiteurs chimiques contenus dans cette gélose sont le chlorure de lithium, le ceftazidime, le polymyxine B et l'acriflavine. Ce milieu est composé d'une gélose de base et de supplément Palcam (A.E.S.) ajouté extemporanément. (cf. norme AFNOR en annexe 1).

Lors de notre étude, nous aurions pu utiliser à ce stade les géloses Oxford. Les inhibiteurs chimiques contenus dans ce milieu sélectif sont le chlorure de lithium, la cycloheximidine, le colistine, l'acriflavine, le céfotétan, et la fosfomycine.

Remarque : le tableau 3 regroupe une partie des substances inhibitrices utilisées pour la mise au point des milieux d'enrichissement et des géloses sélectives pour

Listeria.

17

e) *Gélose trypto-caséine soja (A.E.S. Laboratoire)*

Ce sont les géloses non sélectives. Elles sontensemencées en stries par les colonies sélectionnées sur Palcam.

Composition : GT

- Pastone : 15 g/l
- Peptone papainique de soja : 5 g/l
- NaCl : 5 g/l
- Agar : 15 g/l
- Eau distillée : 1000 ml

pH = 7,3 à 25°C.

Tableau 3 : Liste partielle des inhibiteurs utilisés dans les milieux sélectifs pour *Listeria*

17

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 +
Céfitétan	4 - 8 mg	<i>Staphylococcus aureus</i>
Céftazidime	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>
Laxamoxel	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 +

3. Tests utilisés pour la détermination du genre et de l'espèce

Dans notre étude, nous nous sommes limités à identifier **le genre et l'espèce** des bactéries par une analyse des caractères morphologiques et biochimiques simples.

Pour confirmer l'appartenance des bactéries au **genre *Listeria***, nous avons pratiqué les tests suivants.

a) Coloration de Gram

C'est une technique de coloration qui est basée sur la perméabilité sélective plus grande de la paroi des bactéries Gram négatif à l'alcool. Elle comprend les phases suivantes : la réalisation d'un frottis à partir d'une colonie de bactéries isolée sur gélose trypto-caséine soja, puis la coloration successive du frottis par du cristal violet, du lugol, de l'alcool et de la safranine.

La coloration de Gram est observée au microscope optique à l'objectif 100 avec une goutte d'huile à immersion. Les bactéries colorées en rouge par la safranine sont Gram négatif. Les bactéries colorées en violet par le cristal violet sont Gram positif.

b) Test de mobilité

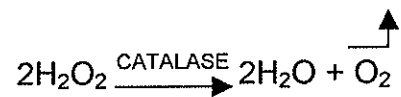
Ce test consiste à ensemencer deux tubes d'eau peptonée avec une colonie de bactéries. Un des tubes est incubé à 25°C, l'autre à 37°C pendant 24 h. Pour constater de la mobilité des bactéries, nous avons réalisé un état frais observé au microscope optique à l'objectif 40.

Composition de l'eau peptonée :

- peptone tryptique : 15 g
 - NaCl : 5 g
 - Eau distillée : 1000 ml
- pH : 7,2

c) Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme capable de décomposer l'eau oxygénée avec libération d'oxygène.



Pour ce test, nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée à 20 volumes sur une lame propre, puis émulsionné une colonie dans cette goutte . En présence de la catalase, il y a apparition immédiate de bulles de gaz.

d) Recherche de l'attaque de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine rompt la liaison glucosidique et libère du glucose et de l'esculétine. L'esculétine donne une coloration noire en présence de sels de fer.

Dans notre étude, les milieux d'enrichissement Fraser-demi et Fraser ainsi que les géloses sélectives Palcam, contiennent de l'esculine et du citrate de fer, ceci entraîne une coloration noire de ces milieux en présence de *Listeria*.

Pour la détermination de l'espèce de *Listeria* nous avons utilisé les tests suivants.

e) *La nitrate réductase*

Pour rechercher la nitrate réductase, nous avons utilisé une gélose nutritive (AES) enrichie avec 1/1000 de nitrate de potassium, présentée en tube incliné. L'ensemencement se fait en stries sur toute la surface de la gélose. Après 24 h d'incubation à 37°C, on révèle la réaction par 3 gouttes d'acide sulfanilique et 3 gouttes d'alpha-naphtylamine qui vont réagir avec les nitrites pour donner une coloration rouge. En cas de réaction négative, on ajoute de la poudre de zinc réducteur des nitrates. Si une coloration rouge apparaît, les bactéries sont nitrates négatifs.

f) *β hémolyse*

Seules *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. seeligeri* sont β hémolytiques. Elles possèdent des lécithinases responsables de la rupture de la membrane plasmique des hématies provoquant leur lyse. Ce phénomène libère de l'hémoglobine qui est ensuite plus ou moins digéré.

Cette hémolyse est recherchée sur une gélose de base (AES) à laquelle sont ajoutés 5 à 10 % de sang de mouton défibriné, stérile (Bio Mérieux). L'ensemencement se fait en stries serrées sur toute la boîte. L'incubation dure 24 à 48 h à 37°C.

NB : β hémolytique signifie que la digestion de l'hémoglobine est totale, une zone incolore, nette et complète, apparaît autour de la colonie.

Composition de base de la gélose au sang (AES) :

- 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 : 7,4 à 25°C

g) *Galerie API-Listeria (Bio Mérieux)* 1 et 3

La galerie API-Listeria comporte 10 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, qui permettent la réalisation de tests enzymatiques ou des fermentations de sucres. Elle est destinée à l'identification des bactéries du genre *Listeria*.

Après avoir déposé dans chaque microtube une petite quantité de suspension bactérienne, la galerie est mise à incuber 24 h à 37°C. La lecture des réactions est ensuite réalisée visuellement par changements de coloration spontanés ou révélés par l'addition d'un réactif (cf. tableau 4 et annexe 2).

Tableau 4 : Tableau de lecture d'après le fabricant

1

TEST	REACTION	RESULTAT	
		NEGATIF	POSITIF
DIM	Différenciation <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	ZYM B < 3 mn	
		Orange pâle	Orange
		Rose beige Gris beige	
ESC	ESCuline (Hydrolyse)	Jaune pâle	Noir
α MAN	α -MANnosidase	Incolore	Jaune
DARL	D-Arabitol (Acidification)	Rouge Rouge orangé	Jaune Jaune orangé
XYL	D-XYlose (Acidification)		
RHA	RHAMnose (Acidification)		
MDG	α -Méthyl-D-Glucoside (Acidification)		
RIB	RIBose (Acidification)		
G1P	Glucose-1-Phosphate (Acidification)		
TAG	D-TAGatose (Acidification)		

II. Résultats

L'analyse des échantillons de fromage s'est déroulée en deux étapes : la première étape consiste en la lecture toutes les 24 h des milieux d'enrichissement et sélectifs, et la deuxième étape correspond à l'identification des *Listeria* isolées de gélose Palcam à partir des échantillons qui se sont révélés positifs.

A. Analyse de nos échantillons

- A partir des **bouillons Fraser-demi et Fraser**, après incubation de 24 h ou 48 h, nous avons observé le noircissement de certains milieux. Une proportion de 20,2 % des échantillons a noirci à ce stade.

- Sur **gélose Palcam**, les *Listeria* forment en 24 h des colonies verdâtres 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. Seuls quelques échantillons ont semblé présenter ces caractéristiques.

Parfois nous avons observé des colonies blanches entourées de noir, non caractéristiques de la description ci-dessus.

- Sur **gélose Trypto-caséine Soja** , les colonies de *Listeria* sont translucides, non pigmentées et apparaissent bleutées en transillumination oblique. Ces colonies sont très caractéristiques pour un lecteur expérimenté.

A ce stade de notre étude, seuls 3 échantillons de fromages se sont révélés susceptibles de contenir des *Listeria*.

B. Identification des bactéries

L'identification du genre et des espèces de *Listeria* repose sur les caractères morphologiques et biochimiques figurant sur les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Caractères morphologiques et biochimiques du genre *Listeria*

8

Caractères positifs	Caractères négatifs
<ul style="list-style-type: none"> • Bacille de Gram \oplus. • Mobilité à 25°C. • Aérobie (anaérobie facultative). • Catalase. • Hydrolyse de l'esculine. • Production d'acide à partir de nombreux sucres dont le glucose. • Réaction du rouge de méthyle et de Voges Proskauer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxydase. • Sporulation. • Hydrolyse de l'urée. • Production d'indole. • Production d'H₂S. • Mobilité à 37°C.

Tableau 6 : Différenciation des espèces de *Listeria*

8

CARACTERISTIQUES	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i> ,	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>
β - hémolyse	+	-	±	-	+	-	-
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 :							
α - Méthyl – D mannoside	+	+	±	+	-	-	-
D – mannitol	-	-	-	-	-	+	+
L – rhamnose	+	±	-	±	-	-	±
D – xylose	-	-	+	+	+	-	-

A partir de colonies que nous avons isolées sur gélose trypto-caséine soja, seuls trois fromages contenaient des bactéries du genre *Listeria*. Il s'agit de deux crottins et d'un Pouligny St Pierre, fabriqués à la ferme, provenant du département de l'Indre.

Les deux crottins ont été achetés le 20 janvier 1996 et le Pouligny St Pierre le 27 janvier 1996.

L'identification a montré les résultats suivants :

	Fromage n°5 crottin	Fromage n°6 crottin	Fromage n°14 Pouigny St Pierre
Coloration de gram	Bacille gram +	Bacille gram +	Bacille gram +
Test mobilité	Mobile à 25°C Immuable à 37°C	Mobile à 25°C Immuable à 37°C	Mobile à 25°C Immuable à 37°C
Catalase	+	+	+
Réduction nitrates	-	-	-
β hémolyse	-	-	-

Afin d'identifier l'espèce des *Listeria*, nous avons utilisé la galerie API. Celle-ci comprend 10 tests : 1

- DIM : pour différencier *L. innocua* et *L. monocytogenes*

Ce test consiste en l'hydrolyse d'un substrat naphtylamide par une arylamidase.

L'arylamidase dégrade un composé amino-acide β-naphtylamide en un acide aminé et une molécule de β-naphtylamine.

La présence de β-naphtylamine est révélée par un sel de diazonium (réactif ZYM B) pour former un composé azoïque coloré en orange.

- ESC : esculine

Le test esculine permet d'étudier la capacité d'un germe à hydrolyser l'esculine sous l'action de la β glucosidase.

- α-MAN : α-mannosidase

L'α-mannosidase hydrolyse un substrat osidique (le mannoside couplé à un radical nitrophénol) et libère mannose et p-nitrophénol, ce dernier se colorant spontanément en jaune.

- DARL D. Arabitol
- XYL D. Xylose
- RHA Rhamnose
- MDG alpha méthyl-D-glucoside
- RIB Ribose
- GIP glucose-1-phosphate
- TAG D-Tagatose

Ces substrats glucosidiques sont testés en fermentation.

La formation de produits acides fait virer l'indicateur du pH (rouge de phénol).

Fromage n°5

DIM	ESC	α Man	DARL	XYL	Rha	MDG	RIB	GIP	TAG
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	7			1			1		0

Fromage n°6

DIM	ESC	α Man	DARL	XYL	Rha	MDG	RIB	GIP	TAG
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
	7			5			1		0

Fromage n°14

DIM	ESC	α Man	DARL	XYL	Rha	MDG	RIB	GIP	TAG
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
	3			5			1		0

Les réactions obtenues sont codées en un profil numérique : sur la fiche de résultat, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1,2 ou 4 est indiquée pour chacun.

En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, un profil numérique à quatre chiffres est obtenu.

L'identification se fait en recherchant le profil numérique dans la liste des profils de la notice technique

1

 (cette liste est donnée en annexe 2).

Les profils 7110 - 7510 et 3510 correspondent tous les trois à *Listeria innocua*.

C. Conclusion

Lors de notre étude, nous avons analysé 99 fromages de chèvre pris au hasard par la méthode décrite dans la norme AFNOR V08-055.

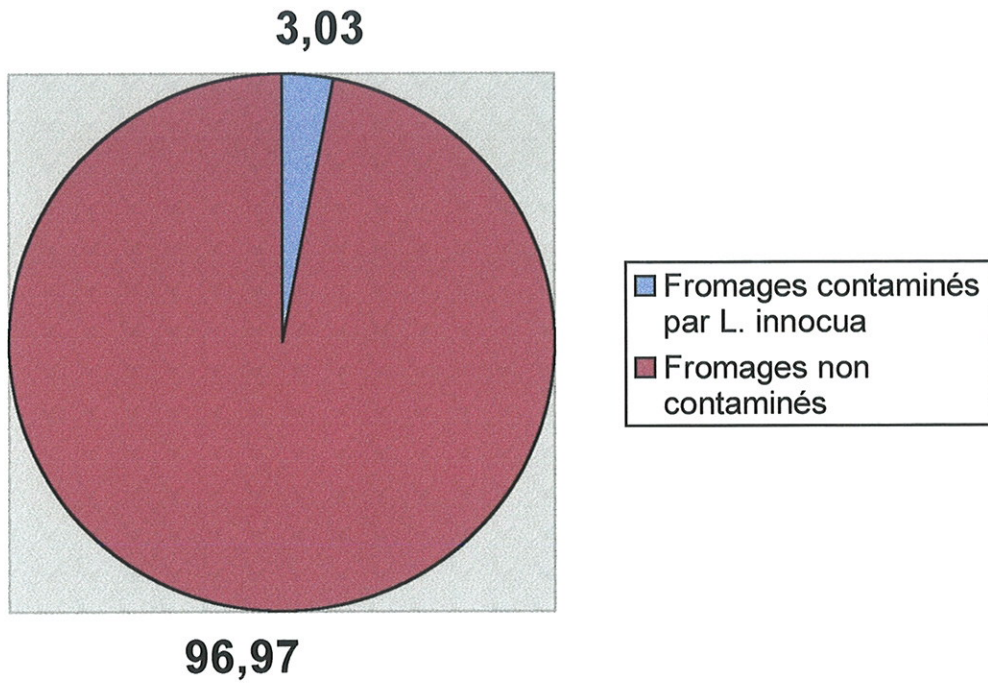
Nous n'avons pas mis en évidence de *Listeria* pathogène comme *L. monocytogenes* ou *L. ivanovii*.

Seuls 3.03% des fromages testés contenaient des *L. innocua* non pathogènes (figure 1).

Les 3 fromages contaminés étaient 3 fromages fermiers à pâte molle provenant du département de l'Indre dont deux fabriqués par le même producteur.

Listeria innocua n'étant pas une bactérie pathogène, la recherche du sérotype et du lysotype n'est pas nécessaire.

Figure 1 : Résultats obtenus sur 99 fromages de chèvre en pourcentage.



PARTIE 3

Etude comparative
et discussion

Peu de références bibliographiques ont été publiées sur la contamination bactérienne de fromages de chèvre.

Plusieurs raisons peuvent expliquer ce manque de données scientifiques. En effet, la fabrication de fromages de chèvre est réservée d'une part à un milieu industriel relativement fermé et d'autre part à des fabrications artisanales dispersées aux régions d'élevage des chèvres. Néanmoins, depuis la sensibilisation du grand public aux différentes épidémies de *Listeria* d'origine alimentaire, la collaboration entre les divers organismes sanitaires et médicaux : **DDASS** (Direction Départementale de l'Action Sanitaire et Sociale), **DSV** (Direction des Services Vétérinaires), **DGCCRF** (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes), **DGS** (Direction Générale de la Santé), **DGAL** (Direction Générale de l'Alimentation), **RNSP** (Réseau National de Santé Publique) ou **CNR** (Centre National de Référence), a permis d'instaurer une surveillance très efficace des processus possibles de contamination.

6

Les principaux résultats bactériologiques concernant les fromages de chèvre sont concentrés au niveau des Laboratoires d'Analyses départementaux ou privés et autres DSV ministérielles.

Nous remercions particulièrement la DSV de Limoges et celle de Châteauroux qui nous ont communiqué quelques résultats de leurs travaux que nous avons ensuite comparés avec les nôtres.

I. Programme Listeria dans la région centre en 1994

7

Ce programme a été mis en place sous l'égide de l'Union Régionale du Groupement de Défense Sanitaire (U.R.G.D.S) de la région Centre pour répondre à l'évolution de la réglementation européenne. Celle-ci prévoit entre autre des critères microbiologiques pour les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché et notamment l'absence de *L. monocytogenes*.

La réglementation impose que les établissements de transformation et les produits soient contrôlés au travers de contrôles officiels et d'autocontrôles.

La notion d'autocontrôles est amenée à se généraliser dans un proche avenir même si les exploitants « vendeurs directs » n'y sont pas encore officiellement contraints.

Un des objectifs de ce programme a été d'initier une politique d'autocontrôles conforme à l'esprit de la réglementation actuelle ou à venir et de compléter les connaissances en matière de contamination des produits à base de lait de chèvre pour lesquels peu d'études ont été réalisées.

Ces autocontrôles se sont déroulés chez des fromagers fermiers (tableau 7). Quatre séries de recherche de *L. monocytogenes* sur un mélange de cinq fromages ont été réalisées chez chaque fromager, ces séries étant réparties sur l'année.

Tableau 7 : Nombre de fromagers inclus dans ce programme.

	DEPARTEMENTS					
	CHER (18)	EURE ET LOIR (28)	INDRE (36)	INDRE ET LOIRE (37)	LOIR ET CHER (41)	LOIRET (45)
Bovins	8					
Ovins						1
Caprins	31	7	34	18	49	13

Les analyses ont porté sur 644 échantillons de fromages, dont la majorité était des fromages de chèvre.

Les résultats de ces analyses sont reportés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Résultats des analyses.

	18	28	36	37	41	45	TOTAL
Analyse de fromages							
Nombre de fromagers	39	7	34	18	49	14	161
Nombre d'analyses	156	28	136	72	196	56	644
Nombre d'isolements de <i>L. monocytogenes</i>	1	0	16	0	3	1	21
Nombre d'isolements d'autres <i>Listeria</i>	3	0	2	0	0	0	5

Il ressort de ces contrôles que 3,26 % des échantillons sont contaminés par *L. monocytogenes* et 0,77 % sont contaminés par d'autres espèces de *Listeria*.

II. Programme Listeria dans la région centre en 1995 2

En 1995, ce même programme d'autocontrôles des fromages fermiers au lait de chèvre a été renouvelé.

145 exploitations réparties sur 3 départements, Cher, Indre, Loir et Cher, ont participé à ces autocontrôles (tableau 9).

Tableau 9 : Nombre d'exploitation par département.

Département	Nombre d'exploitations
18	33
36	55
41	57
	145

Le bilan de ce programme figure dans le tableau 10.

Tableau 10 : Résultats des analyses.

	18	36	41
Analyse de fromages			
Nombre de fromagers	33	55	57
Nombre d'analyses	83	149	148
Nombre d'isolements de <i>L. monocytogenes</i>	0	0	0

Aucune *Listeria monocytogenes* n'a été décelée dans les 380 échantillons analysés.

III. Résultats fournis par la Direction des Services Vétérinaires de Limoges

La D.S.V. de Limoges a mis à notre disposition des contrôles effectués chez des producteurs fermiers de fromages de chèvre au lait cru de la Haute-Vienne.

D'après ces données, nous n'avons collecté qu'un seul contrôle par producteur dans l'année (tableau 11).

Tableau 11 : nombre de fromagers testés et résultats.

	1994	1995	1996	Total
Nombre de fromagers	16	13	10	39
Nombre d'isolements de <i>L. monocytogenes</i> dans 25 g	0	0	0	0

Aucune *L. monocytogenes* n'a été décelée. Ces résultats sont cependant peu significatifs en raison du faible échantillonnage. Ceci est dû au fait que le cheptel caprin de Haute Vienne est restreint.

IV. Résultats de la recherche de *Listeria* dans le lait cru de chèvre réalisée au laboratoire de microbiologie de la faculté de Limoges en 1995

16

Le fromage de chèvre étant un produit de transformation du lait de chèvre, il est intéressant de connaître son degré de contamination.

Lors de cette étude 99 échantillons de lait cru de chèvre ont été analysés.

Chaque échantillon de lait correspondait à un pool de lait en provenance d'un élevage. Ces échantillons ont été fournis par le Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherches de la Haute Vienne (Laboratoire des Laits).

Les résultats de cette recherche ont montré que :

3,03 % des échantillons étaient contaminés par *L. monocytogenes*,

3,03 % des échantillons étaient contaminés par *L. ivanovii*

et 5,05 % des échantillons étaient contaminés par *L. innocua*.

Le lait cru représente donc un risque potentiel de contamination des fromages de chèvre.

V. DISCUSSION

Nous rapportons les résultats :

- de notre expérimentation personnelle : 3,03 % des échantillons de fromages de chèvre au lait cru sont contaminés par *L. innocua*,
- du programme Listeria Centre 1994 : 3,26 % sont contaminés par *L. monocytogenes* et 0,77 % par d'autres Listeria,
- du programme Listeria Centre 1995 et des données de la DSV Limoges de 1994, 1995 et 1996 : aucun échantillon n'est contaminé,
- de la recherche de 1995 sur le lait cru de chèvre : 3,03 % des échantillons de lait contiennent des *L. monocytogenes*, 3,03 % des *L. ivanovii* et 5,05 % des *L. innocua*.

Les résultats de notre expérimentation personnelle, ceux de la recherche sur le lait cru de chèvre ou bien ceux obtenus à partir des données de la DSV

Limoges peuvent paraître peu significatifs en raison du petit nombre d'échantillons. Cependant, en comparaison avec le bilan du programme Listeria Centre, sur deux années, qui implique beaucoup plus de producteurs, nous pouvons constater que les résultats sont du même ordre de grandeur.

Peu de recherches systématiques ont été faites sur le lait et les fromages de chèvre au lait cru. Les résultats que nous énonçons montrent bien que le *genre Listeria* peut être présent. Dans ce genre sont reconnues *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* et *L. murrayi*.

Seules les espèces *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* sont pathogènes.

15

Même si actuellement seule *L. monocytogenes* est considérée comme pathogène pour l'homme, la présence d'autres espèces de *Listeria* est un argument pour inciter à la vigilance. En effet, quand un *genre Listeria* est présent, il n'est pas rare de rencontrer différentes espèces. En outre, *L. ivanovii* est à l'heure actuelle uniquement pathogène pour les animaux mais le caractère hémolytique est un facteur de virulence.

Vu le faible pourcentage de fromages positifs de notre étude expérimentale : 3,03 %, nous n'avons pas pu établir de relations significatives quant au type de fromage, à la saison des prélèvements ou aux départements concernés. Toutefois, nous pouvons remarquer qu'il s'agit de trois fromages fermiers à pâte molle provenant du département de l'Indre. Ceci concorde avec les résultats de l'URGDS en 1994 qui montrent que c'est dans ce département que le taux de contamination des fromages de chèvre est le plus élevé. En outre, les deux crottins proviennent du même producteur et ils ont été fabriqués à la même saison, l'un étant plus sec que l'autre. Ils ont été achetés sur un marché alors que le Pouligny St Pierre a lui été acheté dans un supermarché.

Nous constatons également que lors de notre expérimentation personnelle 20,2 % des milieux d'enrichissement Fraser et Fraser-demi étaient devenus noirs, par contre 3,03 % des échantillons de fromages contenaient des *Listeria*. Nous pouvons donc supposer que ces échantillons contenaient d'autres bactéries qui peuvent hydrolyser l'esculine comme les Entérocoques ou les Streptocoques de groupe antigénique D.

En 1996 aucune *L. monocytogenes* n'a été détectée dans les fromages de chèvre, ni dans notre étude ni d'après les données obtenues à la DSV de Limoges. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer stricto sensu, ni vérifier que les fromages que nous avons testés n'ont pas été chauffés en cours de fabrication, notamment ceux provenant de supermarchés.

Enfin, nous avons recherché s'il existait une corrélation entre l'isolement des *Listeria* dans le lait cru de chèvre et la contamination des fromages. 11,11 % des échantillons de lait sont contaminés alors que ce taux pour les fromages ne dépasse pas 4,03 % par étude. Ceci permet de penser que le procédé de fabrication, en particulier la fermentation lactique inhibe le développement de *Listeria* dans le caillé.

PARTIE 4

Prévention des Listeria en fromagerie

Les risques de contamination des fromages ne peuvent être ignorés dans la mesure où le lait est un produit naturel issu d'animaux.

I. Les sources de contamination des fromages

Listeria est une bactérie omniprésente dans l'environnement : terre, eau, etc... 4

Au niveau de la fabrication des fromages, les modes de contamination sont multiples.

A. Contamination par le lait

Le lait peut être contaminé par voie intramammaire (endogène) ou par voie extramammaire (exogène).

1. Origine intramammaire

18 et 21

La contamination par Listeria peut intervenir à l'intérieur de la mamelle chez les animaux atteints de mammites. Les mammites sont des inflammations de la glande mammaire. Elles traduisent une réaction de défense contre une agression locale, très généralement d'origine infectieuse.

Avec Listeria, les mammites sont généralement subcliniques, cela signifie que l'inflammation du quartier est modérée et reste totalement imperceptible par observation directe. Elles se traduisent surtout par un afflux de globules blancs dans le lait, ce qui est décelé par numération cellulaire.

La pénétration des *Listeria* dans le quartier s'effectue le plus souvent de l'extérieur vers l'intérieur, à travers le canal du trayon. C'est pourquoi le risque d'infection est d'autant plus grand que le nombre de bactéries présentes sur la peau des trayons est élevé.

Dans ce cas, les *Listeria* sont excrétées en concentration souvent élevée (1 000 à 1 000 000 de bactéries par ml).

Lors d'une contamination endogène, le lait de tank ne contient que rarement de façon simultanée des *L. monocytogenes* et des *L. innocua*. De plus, la présence de *Listeria* peut provenir d'une seule bête excrétrice, voire d'un seul quartier de mamelle.

Cependant ce mode de contamination reste exceptionnel. Une étude faite sur 33 élevages livrant du lait contaminé, a montré que les mammites sont responsables dans 6 % des cas. 18

2. Origine extramammaire 18

La fréquence d'une origine extramammaire des *Listeria* dans le lait de tank est élevée. En effet, dans 94 % des cas les *Listeria* proviennent de l'environnement.

Dans les contaminations exogènes, la présence de *L. innocua* seule ou associée à *L. monocytogenes* est fréquente.

Les sources potentielles de contamination extramammaire du lait sont diverses. Tout ce qui entre en contact avec le lait constitue une source directe de contamination.

a) *La peau des trayons* 13

Elle représente un habitat naturel de certaines bactéries pathogènes, dont les bactéries psychrotrophes comme les *Listeria*. En outre, elle est souvent souillée par des fèces ou des litières sales qui peuvent être contaminées.

Les principaux vecteurs sont les mains du trayeur, ou les lavettes uniques servant au nettoyage de plusieurs animaux à la suite.

b) *L'ensilage et les fèces* 8, 13 et 19

Les *Listeria* sont des bactéries qui se développent essentiellement à des pH compris entre 7,2 et 7,4. Cependant, elles peuvent survivre jusqu'à un pH égal à 5. De ce fait, une mauvaise qualité de conservation des ensilages peut permettre leur développement.

Par exemple quand le pH mesuré dans la zone centrale du silo est supérieur à 4, le risque de contamination du lait de tank est 2,88 fois plus élevé que celui des élevages où ce pH est inférieur à 4. Pour la zone périphérique du silo, le risque est 6,10 fois plus élevé si le pH est supérieur à 4.

Les *Listeria* sont des hôtes possibles du tube digestif des animaux à sang chaud, en particulier après ingestion d'aliments contaminés comme l'ensilage. Ces bactéries sont donc fréquemment présentes dans les fèces. Les animaux excréant des souches pathogènes dans leurs fèces peuvent ne développer aucune pathologie apparente. Ils sont alors qualifiés de porteurs sains.

Globalement, la présence de *L. monocytogenes* dans les ensilages et / ou les bouses multiplie par 20 le risque de contamination du lait de tank.

c) *Mauvaise hygiène du logement et de la traite*

13 et 20

Les sources de contamination sont l'eau, l'air, les litières souillées par les fèces, les mains du trayeur, la peau du trayon, le matériel mal nettoyé qui devient un support très propice au développement des bactéries...

Le tableau (12) nous montre l'importance de l'hygiène dans la lutte contre les *Listeria*.

d) *Cas particulier du stockage : le tank à lait*

10

Le tank ou le refroidisseur à bidons est l'endroit où l'on va conserver le lait après la traite. Sa température doit être comprise entre 1 et 4°C. Les *Listeria* qui sont des bactéries psychrotrophes, pourront donc se multiplier dans les tanks de réfrigération.

Leur nombre au moment de la collecte est à la fois fonction de la contamination initiale du lait avant sa réfrigération et de l'importance de la multiplication pendant le stockage.

Il est donc primordial d'éviter la contamination du lait en amont du tank.

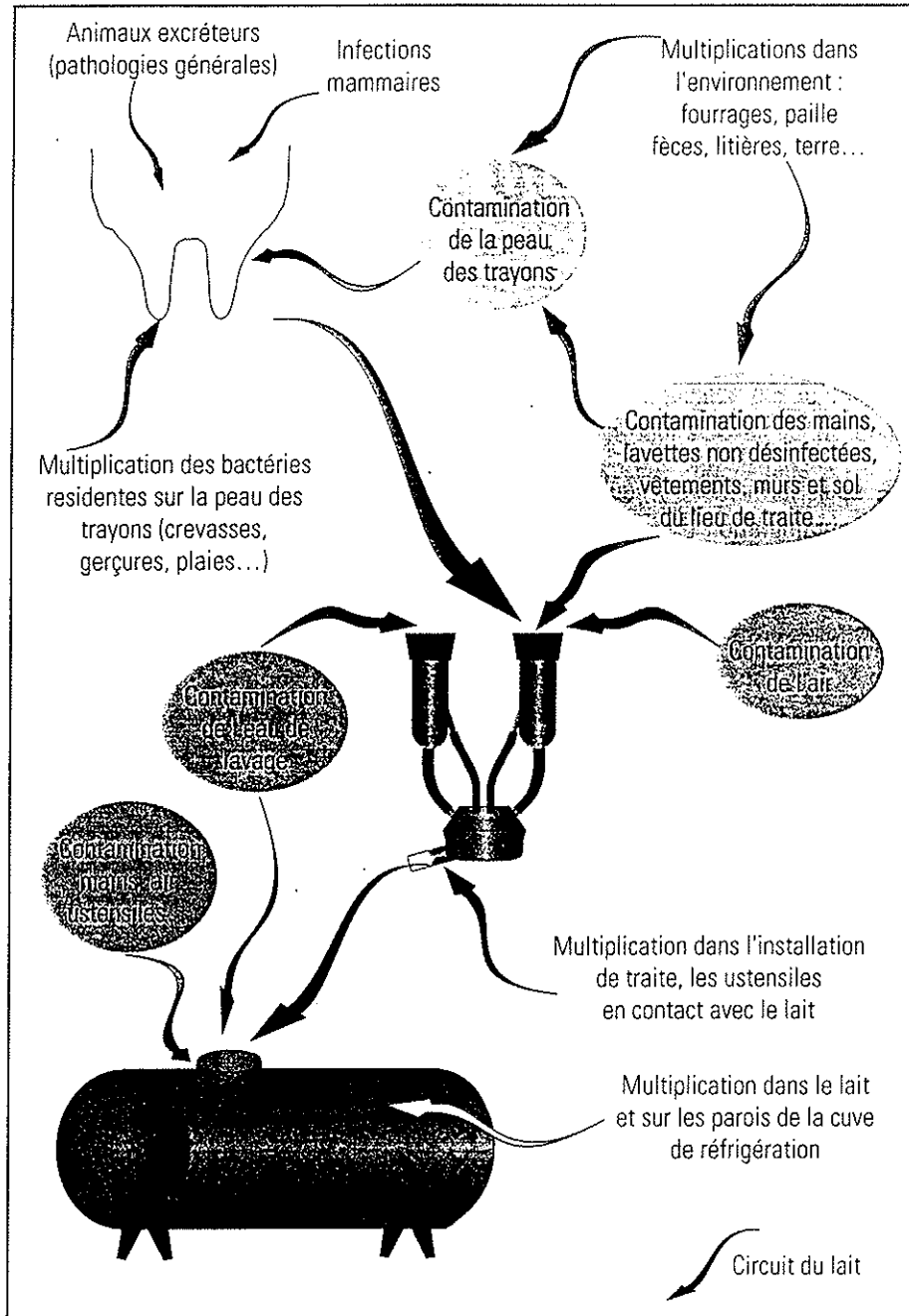
Tableau 12 : Evolution du Risque Relatif (RR) de la contamination par Listeria en fonction de différentes variables .

20

	RR
LOGEMENT	
• Propreté des animaux Propres Sales	5,81
• Fréquence d'entretien de l'aire d'exercice Suffisante Insuffisante	5,81
• Surface de couchage par animal Suffisante Insuffisante	2,63
TRAITE	
• Nettoyage du parc d'attente Suffisant Insuffisant	2,10
• Propreté du local de traite Suffisant Insuffisant	4,88
• Utilisation de lavettes individuelles Oui Non	2,20
• Désinfection des lavettes entre les traites Oui Non	2,05

e) Schéma résumant les origines extramammaires

13



B. Contamination au niveau de la fabrication des fromages

10

Au niveau de la fromagerie, la contamination peut se faire essentiellement à partir :

- du lait, qui sera préalablement contaminé,
- du lactosérum, utilisé comme levain, et venant de fabrications elles-mêmes contaminées,
- de bains de saumure contaminés par l'eau, l'environnement ou les fromages saumurés auparavant,
- de l'environnement de la fromagerie (air, matériel...) contaminé par l'introduction de *Listeria* par les hommes, les animaux, l'eau, le matériel, les bidons ou les fromages fabriqués antérieurement.

Enfin, le personnel peut être un vecteur de contamination lors des diverses étapes de la fabrication. Ceci est particulièrement vérifié pour les fromages à croûtes lavées qui font l'objet de manipulations au cours de l'affinage.

II. Prévention

A. Actions de lutte dans la production laitière

1. L'ensilage

20

Pour maîtriser la conservation de l'ensilage, il est nécessaire de vérifier régulièrement le pH. De plus, les règles de confection et de reprise des ensilages (propreté, qualité du tassement, étanchéité de la fermeture, nature et chargement

de la bâche) doivent être respectées. Il est déconseillé d'utiliser du NaCl pour sa fabrication, et d'avoir des délais trop brefs entre la confection du silo et son ouverture.

2. La propreté des animaux 10

Ce facteur est très important à contrôler, car la contamination superficielle des trayons par le genre *Listeria* est assez fréquente, cette contamination se faisant dans la majorité des cas par les fèces. Le respect des conditions d'hygiène du logement (entretien journalier des litières et des aires d'exercice) et de conception des locaux permet d'avoir constamment des animaux propres.

3. L'assistance à la traite 7, 10 et 13

Le lait ne contient pas de germe dans la mamelle. L'hygiène de la traite est donc importante.

Avant toute chose, les mains du trayeur doivent être propres, lavées à l'eau et au savon avant la traite.

Les trayons doivent être nettoyés avec une lavette individuelle par animal, puis essuyés avec le côté propre de la lavette essorée. Entre deux traites, ces lavettes doivent être désinfectées. Après la traite, une désinfection des trayons est nécessaire.

Si la peau des mamelles est une source privilégiée de contamination, le matériel en contact avec le lait (machine à traire, récipients mesureurs, pots, bacs réfrigérants) reste la principale source de pollution. Il importe donc de bien le nettoyer et de le désinfecter.

- Le nettoyage : il consiste en une action mécanique, l'eau entraînant les saletés. On utilise en général une solution détergente alcaline qui solubilise les résidus et les décolle du support où ils sont fixés. Le nettoyage est très important car des résidus de matières organiques risqueraient d'inhiber l'action des désinfectants.

- La désinfection : les principaux désinfectants utilisés sont des produits chimiques à activité bactéricide, mais l'eau bouillante est également très efficace. NB : Vis à vis des désinfectants, *Listeria* ne se singularise pas par une résistance particulière : ces germes sont sensibles aux aldéhydes, aux produits chlorés, iodés, aux ammoniums quaternaires dans les conditions habituelles de leur emploi (température, temps d'action, concentration).

- Le détartrage : il consiste à éliminer les dépôts minéraux, surtout le calcaire, accumulés lors du passage du lait et de l'eau. Les détartrages seront plus ou moins fréquents, en fonction de la dureté de l'eau. Les produits utilisés sont des acides.

- Le rinçage : il permet d'évacuer tous les résidus, aussi bien organiques que chimiques.

Chacune de ces opérations est complémentaire des autres et leur respect est important pour que le lavage soit efficace. Les mêmes principes sont à retenir pour le lavage du tank à lait.

4. Identification et élimination des bêtes excrétrices

20

Si le lait est régulièrement contaminé par *Listeria*, il faut suspecter une origine intramammaire. L'animal excréteur doit être identifié par un vétérinaire.

Si le lait est régulièrement contaminé par *Listeria*, il faut suspecter une origine intramammaire. L'animal excréteur doit être identifié par un vétérinaire. Pour cela des prélèvements aseptiques de lait doivent être pratiqués sur les animaux présentant des numérations cellulaires anormales (supérieures à 300 000 / ml). Lorsque la mammite est confirmée, l'éleveur doit envisager la réforme de l'animal dans les plus brefs délais.

B. Actions de lutte dans la fromagerie 5, 11 et 12

Les règles d'hygiène à tenir en fromagerie concernent le personnel, les locaux et le matériel de fabrication.

1. Le personnel

Avant toute manipulation, le fromager doit s'assurer de la propreté de ses mains et de sa tenue vestimentaire. Il devra porter des bottes et une blouse réservées à la fabrication et entreposées dans un sas d'entrée.

Que ce soit en entreprise ou à la ferme, le fromager ne doit présenter ni blessure ni maladie.

2. Les locaux

La conception des locaux doit respecter deux grands principes :

- Celui de la marche en avant qui permet une séparation des étapes de fabrication sans retour sur les opérations précédentes et sans croisement : le lait entre d'un côté, les fromages sortent de l'autre.

- Celui de la séparation entre les secteurs dits « propres » comme la fromagerie et les secteurs dits « sales » : sas, laverie.

Les locaux devront subir un entretien fréquent du sol et des murs de façon à maîtriser l'air ambiant.

3. Le matériel de fabrication

Le matériel de fromagerie (claires de manipulation, tables d'égouttage, bacs de caillage, moules, louches...) doit être nettoyé et désinfecté quotidiennement. Ces opérations ne doivent pas être négligées car les ustensiles sont la principale source de contamination en fromagerie.

4. Limitation de la multiplication des Listeria

Listeria est tolérante au sel. Elle survit en présence de plus de 10 % de sel, donc notamment dans les bains de saumure. En outre, la fromagerie utilise largement le froid au niveau des caves d'affinage et des chambres froides, or cette température est propice à la multiplication des Listeria. Un contrôle fréquent de ces points critiques sera donc indispensable. 12

De plus, les fromages fabriqués à partir d'une coagulation lactique acquièrent, dans une certaine mesure, une forme de protection contre les Listeria. En effet, les ferments lactiques sont responsables de l'acidification rapide qui se produit en début de fabrication du fromage et un pH inférieur à 5,4 inhibe le développement des Listeria dans le caillé. 8

Il est donc nécessaire de bien maîtriser la fermentation lactique au cours de la fabrication (niveau de vitesse d'acidification). Toutefois, certains fromages ne

bénéficient pas d'une telle protection, comme certaines variétés de pâtes molles à caillé présuré. 10

C. Contrôles officiels et autocontrôles. 10

La réglementation sanitaire est en évolution constante. La directive 92/46 de la CEE du 16 juin 1992, dite directive « sanitaire », entrée en vigueur le 1^{er} janvier 1994 impose de transposer ses prescriptions dans le droit français.

Selon cette Directive CEE, les fromages doivent être exempts de *L. monocytogenes* dans 25 grammes (absence dans un gramme pour les fromages à pâte dure), sinon ils sont retirés du marché.

Les contrôles sur les fromages concernent donc tous les producteurs.

1. Les contrôles officiels

Ces contrôles sont effectués par des agents des services officiels départementaux c'est à dire les Services Vétérinaires et les Services de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (D.G.C.C.R.F.). Ces services officiels doivent effectuer des prélèvements d'échantillons de fromages nécessaires aux analyses de laboratoire et procéder au retrait de la consommation des fromages reconnus impropres. Ces contrôles officiels permettent également de vérifier la conformité avec la réglementation du cheptel, des locaux, des installations, des conditions de fabrication et de vente des fromages.

Enfin, le coût de ces contrôles est à la charge de l'administration.

2. Les autocontrôles

Les autocontrôles sont réalisés par le producteur à ses frais.

- Ils sont une obligation réglementaire sauf pour le producteur dont la totalité de la production fromagère est commercialisée en vente directe. Cependant ces producteurs restent soumis aux contrôles officiels.

- Ils peuvent être également volontaires.

Les autocontrôles consistent à prélever et à faire analyser des échantillons de lait et de fromages dans un laboratoire agréé choisi par le producteur et à ses frais.

Les résultats seront ensuite présentés à l'administration.

Ils servent également à surveiller les points critiques de fabrication et de vente.

Enfin ils permettent d'informer les Services Vétérinaires si les résultats des laboratoires révèlent un risque sanitaire grave pour la santé du consommateur (avec parfois retrait du produit).

3. Périodicité des contrôles

La fréquence des contrôles est fonction des tranches de volume de lait transformé. (tableau 13) 10

Tableau 13 : Nombre de contrôles par an. 10

Transformation journalière moyenne Ovins et caprins	Contrôles officiels	Autocontrôles
< à 100 l	1 par an	Au minimum 2 par an
de 100 à 200 l	2 par an	Au minimum 3 par an
> à 200 l	3 par an	Au minimum 4 par an

CONCLUSION

Actuellement les producteurs fromagers prennent conscience de l'importance de la qualité bactériologique des aliments et de leur intérêt à mettre en place toutes les mesures d'hygiène permettant de maîtriser la contamination des produits par les *Listeria*.

La contamination des aliments peut être originelle. Mais comme les *Listeria* sont des germes ubiquitaires et psychrotrophes, elle peut se produire par le biais de l'environnement sachant que la réfrigération n'inhibe pas leur multiplication. Donc les produits pasteurisés, même s'ils présentent moins de risques de contamination que les produits crus, peuvent aussi être des vecteurs de listériose.

La seule approche possible dans la lutte contre les *Listeria* alimentaires est une approche intégrée sur l'ensemble de la filière. Il convient donc de maîtriser la listériose animale, de contrôler l'ensemble des procédés utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, de la transformation et de la distribution.

Cette stratégie est possible grâce au raccourcissement et à l'amélioration des diagnostics. En effet les méthodes classiques de détection des *Listeria* basées sur des enrichissements et des isolements possèdent deux inconvénients : le manque de rapidité et l'impossibilité de dénombrement. Actuellement de nouvelles techniques de séparations immunologiques se sont développées. Parmi elles, deux types de tests basés sur l'immunocapture ont été mis au point, il s'agit du Listertest et du Listerscreem. Le Listertest permet de dénombrer les *Listeria monocytogenes* en 24 h et le Listerscreem est une méthode qualitative qui permet d'obtenir une détection des *L. monocytogenes* en 48 h.

Pourtant, malgré tous ces efforts, la contamination zéro des aliments par *Listeria* est irréalisable du fait de son caractère ubiquitaire.

Les contrôles ne permettront que de diminuer au maximum les risques et les niveaux de contamination alimentaire, donc les recommandations alimentaires à prendre pour les personnes à risque : immunodéprimés, personnes âgées, femmes enceintes, seront toujours de vigueur.

ANNEXES

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 methodD: 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 A 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



Microbiologie alimentaire

AFNOR V08B

Membres de la commission de normalisation

Président : M CATTEAU

Secrétariat : M LOMBARD — AFNOR

M	ARROUY	CELIA SA
M	BAL FONTAINE	IDEVAL
M	BAYLAC	MINISTÈRE DE LA DEFENSE — SERVICE CENTRAL D'ETUDE ET DE REALISATION DU COMMISSARIAT A L'ARMEE DE TERRE (ISCERCAT)
M	BEERENS	UER DE PHARMACIE
MME	BERNARD	UNION NATIONALE DES COOPERATIVES AGRICOLES D'APPROVISIONNEMENT — UNION DES COOPERATIVES AGRICOLES D'ALIMENTATION OU BETAIL (UNCAAUCAAB)
M	BEUGNIES	LABORATOIRE DEPARTEMENTAL ANALYSE — DROME
MME	BOHNERT	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE — CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES — LABORATOIRE CENTRAL DE RECHERCHES AVICOLE ET PORCINE (CNEVALCRAP)
M	BILLAUX	SOCIETE SCIENTIFIQUE D'HYGIENE ALIMENTAIRE INSTITUT SCIENTIFIQUE D'HYGIENE ALIMENTAIRE (SSHAMSHA)
M	BOMBE	CENTRE TECHNIQUE DE LA CONSERVATION DES PRODUITS AGRICOLES (CTCPA)
M	BONBLEO	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE — DIRECTION GENERALE DE L'ALIMENTATION (DGAL)
M	BOUDET	BIOKAR DIAGNOSTICS
MME	BOUHET	BESNIER BRIDEL
M	CARLIER	ECOLE NATIONALE VETERINAIRE
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 PECHE — CENTRE NATIONAL DE FORMATION DES TECHNICIENS DES SERVICES VETERINAIRES (CNFTSV)
M	CHEVET	FOULO SPRINGER SA
M	CLAISSE	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
MME	COIGNARD	ASEPT
M	COLIN	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES LABORATOIRE CENTRAL DE RECHERCHES AVICOLE ET PORCINE (CNEVALCRAP)
M	COLONNA CECCALOI	UNIR
MME	COME	LABORATOIRE VETERINAIRE DEPARTEMENTAL
MME	COPIN	LABORATOIRES DM SANTE
M	CREYSSEL	CFCGA
M	DEBRAL LY	FRANCE GLACES FONDUS SA
M	DENIJVE	MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE CENTRE NATIONAL DE FORMATION DES TECHNICIENS DES SERVICES VETERINAIRES (CNFTSV)
M	DUFFOUR	LABORATOIRE COBAC
M	DUPONT	IFREMER
MME	ETIENNE	ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DU PAYSAGE (ENSP)
M	FISS	RIA

MME FORT	MINISTERE DE L'ECONOMIE — DIRECTION GENERALE DE LA CONSOMMATION, DE LA CONCURRENCE ET DE LA REPRESSION DES FRAUDES (DGCCRF/TALENCE)
MME GICQUEL	
M GLEDEL	
M GOHIER	SOPAO NESTLE SA
MME GOMY	AFNOR CERTIFICATION
MME HUMMEL	MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE — CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES — LABORATOIRE CENTRAL D'HYGIENE ALIMENTAIRE (CNEVALCHAI)
M JALENQUES	INTERSCIENCES
MILLE JAROY	MINISTERE DE L'ECONOMIE — DIRECTION GENERALE DE LA CONSOMMATION, DE LA CONCURRENCE ET DE LA REPRESSION DES FRAUDES (DGCCRF — RENNES)
M JOUVE	ECOLE NATIONALE VETERINAIRE
MILLE LAHELLEC	MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE — CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES — LABORATOIRE CENTRAL D'HYGIENE ALIMENTAIRE (CNEVALCHAI)
M LESTOILLE	MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE — DIRECTION GENERALE DE L'ALIMENTATION (DGAL)
MME MALO	LYO.VIENNE
MME MONTEARD	GENERALE TRAITEUR
M NADAUD	LABORATOIRE DU JARDIN DE JAYAN
MME NIEL	MINISTERE DE L'ECONOMIE — DIRECTION GENERALE DE LA CONSOMMATION, DE LA CONCURRENCE ET DE LA REPRESSION 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	MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE — CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES — LABORATOIRE CENTRAL D'HYGIENE ALIMENTAIRE (CNEVALCHAI)
M RAMBACH	CHROMAGAR
MILLE RICHARD	MINISTERE DE L'ECONOMIE — DIRECTION GENERALE DE LA CONSOMMATION, DE LA CONCURRENCE ET DE LA REPRESSION DES FRAUDES (DGCCRF.MONTPELLIER)
M ROTEREAU	CNIEL
MME THOMAS	AFNOR
M THOUVENOT	ESMISAB
MME VANELLE	LABORATOIRE SEP' CES VETERINAIRES
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 D, (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 suspects 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 O)

Voir article 8.1.

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

Voir article 8.2.

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 O)

5.2.2.1.1 *Base*

Voir paragraphe 8.3.1.

5.2.2.1.2 *Suppléments*

Voir paragraphe 8.3.2.

5.2.2.1.3 *Milieu complet*

Voir paragraphe 8.3.3.

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

5.2.2.2.1 *Base*

Voir paragraphe 8.4.1.

5.2.2.2.2 *Suppléments*

Voir paragraphe 8.4.2.

5.2.2.2.3 *Milieu complet*

Voir paragraphe 8.4.3.

5.2.3 Milieux d'identification

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

Voir article 8.5.

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 8.5.1

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 *Milieux 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 : 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 incubé à nouveau pendant 18 h à 24 h à 37 °C .

9.3 Isolation de *Listeria monocytogenes*

À 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).

À 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 22 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)

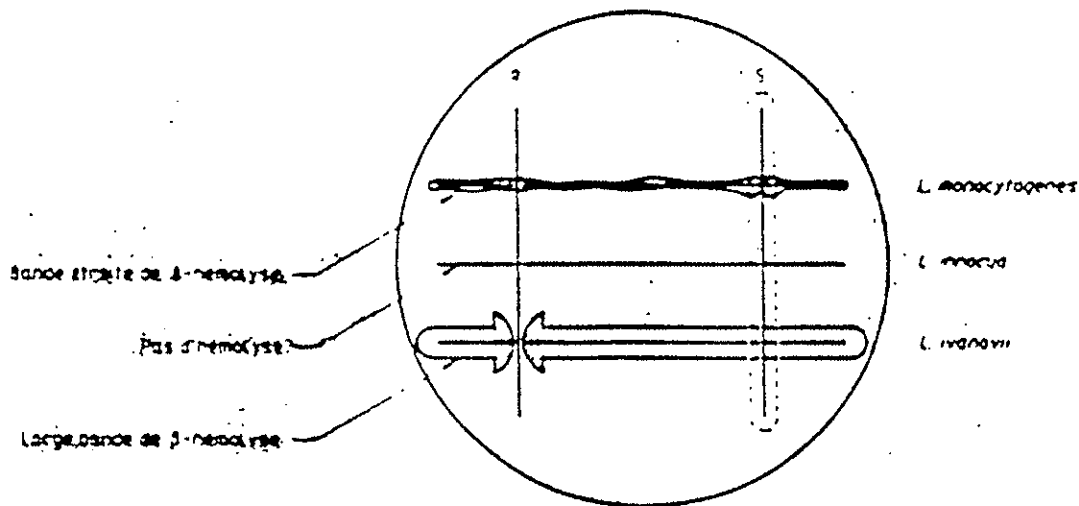
L'examen de la mobilité est réalisé soit à l'état frais (9.4.2.2.3.1), soit en milieu gélosé (9.4.2.2.3.2).

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* présentant 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 bouasse 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 pointilles 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 Hémolyse

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 rpm, 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 a 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 effectuée, 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 B.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
Hydrogénophosphate disodique dihydrate	12,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,35 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
Dihydrogénophosphate disodique dihydrate	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.2 Milieu sélectif gélosé pour *Listeria*, formule Oxford

B.3.1 Base

Composition

Tableau 8.3

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
<i>1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.</i>	

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 8.4

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 B.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 à 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 Lintamoxef	0,020 g
Chlorhydrate d'acriflavine	0,005 g
Eau	10 ml

Préparation

Dissoudre les ingrédients déshydrates 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 (TSAYEY)

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 déshydrates 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
1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

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 25 °C. Répartir 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.5.2) 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 gélifiant 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 caseine	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 gélifiant 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 ivanovi*).

Entretenir 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.

Steriliser 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-xyllose	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.walshimeri</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 Mossat 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 ».

LISTE DE PROFILS NUMERIQUES / LIST OF NUMERICAL PROFILES /
 LISTE DER NUMERISCHEN PROFILE / LISTA DEI PROFILI NUMERICI /
 LISTA DE PERFILES NUMERICOS

2 150	<i>Listeria ivanovii</i>	3 750	<i>Listeria ivanovii</i>
2 170	<i>Listeria ivanovii</i>	3 770	<i>Listeria ivanovii</i>
2 250	<i>Listeria ivanovii</i>	6 010	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 310	<i>Listeria seeligeri/ivanovii</i>	6 110	<i>Listeria monocytogenes/innocua</i>
2 311	<i>Listeria welshimeri</i>	6 120	<i>Listeria grayi</i>
2 330	<i>Listeria ivanovii</i>	6 130	<i>Listeria grayi</i>
2 340	<i>Listeria ivanovii</i>	6 150	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 350	<i>Listeria ivanovii</i>	6 310	<i>Listeria seeligeri/welshimeri</i>
2 370	<i>Listeria ivanovii</i>	6 311	<i>Listeria welshimeri</i>
2 410	<i>Listeria monocytogenes</i>	6 410	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 510	<i>Listeria monocytogenes</i>	6 450	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 550	<i>Listeria monocytogenes/ivanovii</i>	6 510	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 711	<i>Listeria welshimeri</i>	6 520	<i>Listeria grayi</i>
2 750	<i>Listeria ivanovii</i>	6 550	<i>Listeria monocytogenes</i>
2 770	<i>Listeria ivanovii</i>	6 701	<i>Listeria welshimeri</i>
3 110	<i>Listeria seeligeri/innocua/ivanovii</i>	6 711	<i>Listeria welshimeri</i>
3 120	<i>Listeria grayi</i>	7 110	<i>Listeria innocua</i>
3 130	<i>Listeria grayi/ivanovii</i>	7 111	<i>Listeria welshimeri</i>
3 150	<i>Listeria ivanovii</i>	7 120	<i>Listeria grayi</i>
3 170	<i>Listeria ivanovii</i>	7 130	<i>Listeria grayi</i>
3 210	<i>Listeria seeligeri/ivanovii</i>	7 301	<i>Listeria welshimeri</i>
3 250	<i>Listeria ivanovii</i>	7 310	<i>Listeria seeligeri/welshimeri/innocua</i>
3 270	<i>Listeria ivanovii</i>	7 311	<i>Listeria welshimeri</i>
3 300	<i>Listeria seeligeri/ivanovii</i>	7 320	<i>Listeria grayi</i>
3 310	<i>Listeria seeligeri</i>	7 330	<i>Listeria grayi</i>
3 311	<i>Listeria welshimeri</i>	7 500	<i>Listeria innocua</i>
3 330	<i>Listeria ivanovii</i>	7 510	<i>Listeria innocua</i>
3 340	<i>Listeria ivanovii</i>	7 511	<i>Listeria welshimeri</i>
3 350	<i>Listeria ivanovii</i>	7 520	<i>Listeria grayi</i>
3 360	<i>Listeria ivanovii</i>	7 530	<i>Listeria grayi</i>
3 370	<i>Listeria ivanovii</i>	7 701	<i>Listeria welshimeri</i>
3 510	<i>Listeria innocua</i>	7 710	<i>Listeria welshimeri/innocua</i>
3 520	<i>Listeria grayi</i>	7 711	<i>Listeria welshimeri</i>
3 711	<i>Listeria welshimeri</i>	7 720	<i>Listeria grayi</i>
3 730	<i>Listeria ivanovii</i>		

BIBLIOGRAPHIE

- 1 API LISTERIA., Système d'identification des Listeria. Lyon, Laboratoire Bio Mérieux SA, 1993.
- 2 BILAN DU PROGRAMME AUTOCONTROLES FROMAGES FERMIERS 1995 DE L'URGDS. Bourges, URGDS, 1996.
- 3 BILLE J., CATIMEL B., BANNERMAN E., JACQUET C., YERSIN M.N., CANIAUX I. Api – Listeria, an new and promissing one – day system to indentify Listeria isolates. Applied and environmental microbiology, 1992, vol. 58, 1857 – 1860.
- 4 BUTIN M. Compte rendu journée de formation « Hygiène alimentaire » du 15 septembre 1994. Edt, AES Laboratoire.
- 5 GLEDEL J. Importance de l'hygiène : influence sur la qualité des produits laitiers. Revue GTV, 1986, mai.
- 6 JACQUET C. and Coll. La listeriose humaine en France en 1994 : Données du Centre National de Référence des Listeria. B.E.H., 1995, 39, 173 – 174.
- 7 LA LISTERIA : Prévenir c'est possible. Synthèse du plan intégré de lutte contre la contamination par Listeria du lait et des fromages de la région Centre en 1994 (Convention ONILAIT). Bourges, URGDS, 1994.
- 8 LARPENT JP. Les Listeria. 1995, Lavoisier, 140 p.

- 9 LE JAOUEN JC. La fabrication du fromage de chèvre fermier. 5^{ème} édition, PARIS, 1990, Société de presse et d'édition ovine et caprine, 209 p.
- 10 LE JAOUEN JC. Guide national des bonnes pratiques en production fromagère fermière : Recueil réglementaire. Guide des bonnes pratiques fromagères. 1993, Institut de l'Élevage, 231 p.
- 11 LEMENS P. Fromagerie : maîtriser l'hygiène. La Chèvre, 1987, mars – avril, N° 159
- 12 LEMENS P. Maîtrise des risques en fabrication fromagère. Réussir la chèvre, 1993, 195, 41 – 43.
- 13 MOULIN C., HEUCHEL V., MENARD JL. La Qualité bactériologique du lait de ferme. Institut de l'Élevage, Collection Le Point Sur, 1996, 56 p.
- 14 NORME AFNOR V08 – 055 – Recherche de *Listeria monocytogenes*. Décembre 1993.
- 15 ROCOURT J. Listeria et listeriose humaine. Ann. Inst. Past., 1990, 1, 25 – 30.
- 16 ROSIER S. Recherche de Listeria dans le lait de chèvre. Thèse Université Limoges, 1996.

- 17 RYSER ET., and MARTH EH. *Listeria*, listeriosis and food safety. New York, Marcel Dekker Inc, 1991, 642 p.
- 18 SANAA M. Epidémiologie de la contamination de lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Thèse Doctorat Univ. Paris XI, 1993, 207 p.
- 19 SANAA M. and Coll. Risk Factors Associated with Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy Farms. *J. Dairy Sci.*, 1993, 76, 2881 – 2891
- 20 SANAA M. Listériose et contamination du lait et des produits dérivés du lait. *Le Point Vétérinaire*, 1994, 26, numéro spécial, Ruminants et santé publique.
- 21 SERIEYS F. Le point sur les mammites des vaches laitières. 3^{ème} édition, 1995, Institut de l'Élevage, Technipel Edt, 64 p.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p 12
PARTIE 1 : LES FROMAGES DE CHEVRE	p 14
I. Fabrication du fromage de chèvre	p 15
A. Définitions	p15
B. Fabrication	p15
1. <u>Caillage</u>	p16
2. <u>Egouttage</u>	p16
3. <u>Affinage</u>	p17
II. Classification	p 17
A. Les fromages frais	p 17
B. Les fromages à pâte molle	p 18
C. Les fromages à pâte persillée	p 18
D. Les fromages à pâte pressée	p 19
E. Les fromages fondus	p 19
PARTIE 2 : EXPERIMENTATION PERSONNELLE	p 20
I. Matériel et méthode	p 21
A. Les fromages testés	p 21
B. Protocole suivi selon la norme AFNOR V08-055	p 24
1. <u>Principe</u>	p 24
2. <u>Les milieux de culture</u>	p 27
a) Bouillon d'enrichissement primaire	p 27
b) Bouillon d'enrichissement secondaire	p 27
c) Supplément Fraser	p 27
d) Gélose Palcam	p 28
e) Gélose trypto-caseine soja	p 28
3. <u>Tests utilisés pour la détermination du genre et de l'espèce</u>	p 30
a) Coloration de Gram	p 30
b) Test de mobilité	p 30
c) Recherche de la catalase	p 31
d) Recherche de l'attaque de l'esculine	p 31
e) La nitrate réductase	p 32
f) β hémolyse	p 32
g) Galerie API Listeria	p 33

II. Résultats	p 35
A. <i>Analyse de nos échantillons</i>	p 35
B. <i>Identification des bactéries</i>	p 36
C. <i>Conclusion</i>	p 40

PARTIE 3 : ETUDE COMPARATIVE ET DISCUSSION

p 42

I. Programme Listeria dans la région centre en 1994	p 44
--	------

II. Programme Listeria dans la région centre en 1995	p 46
---	------

III. Résultats fournis par la Direction des Services Vétérinaires de Limoges	p 47
---	------

IV. Résultats de la recherche de Listeria dans le lait cru de chèvre réalisée au laboratoire de Microbiologie de la faculté de Limoges en 1995	p 47
---	------

V. Discussion	p 48
----------------------	------

PARTIE 4 : PREVENTION DES LISTERIA EN FROMAGERIE

p 51

I. Les sources de contamination des fromages	p 52
---	------

A. <i>Contamination par le lait</i>	p 52
-------------------------------------	------

1. <u>Origine intramammaire</u>	p 52
---------------------------------	------

2. <u>Origine extramammaire</u>	p 53
---------------------------------	------

a) <i>La peau des trayons</i>	p 54
-------------------------------	------

b) <i>L'ensilage et les fèces</i>	p 54
-----------------------------------	------

c) <i>Mauvaise hygiène du logement et de la traite</i>	p 55
--	------

d) <i>Cas particulier du stockage : le tank à lait</i>	p 55
--	------

e) <i>Schéma résumant les origines extramammaires</i>	p 57
---	------

B. <i>Contamination au niveau de la fabrication des fromages</i>	p 58
--	------

II. Prévention	p 58
-----------------------	------

A. <i>Actions de lutte dans la production laitière</i>	p 58
--	------

1. <u>L'ensilage</u>	p 58
----------------------	------

<i>B. Actions de lutte dans la fromagerie</i>	p 61
1. <u>Le personnel</u>	p 61
2. <u>Les locaux</u>	p 61
3. <u>Le matériel de fabrication</u>	p 62
4. <u>Limitation de la multiplication des Listeria</u>	p 62
<i>C. Contrôles officiels et autocontrôles</i>	p 63
1. <u>Les contrôles officiels</u>	p 63
2. <u>Les autocontrôles</u>	p 64
3. <u>Périodicité des contrôles</u>	p 64
CONCLUSION	p 65
ANNEXES	p 68
BIBLIOGRAPHIE	p 94

BON A IMPRIMER N° 40

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

DELIAT (Delphine) – Recherche expérimentale de *Listeria* dans les fromages de chèvre. La qualité bactériologique des fromages et les mesures de prévention. – 101 f. ; ill. ; tabl. ; 30 cm (Thèse : Pharm. ; Limoges ; 1997).

RESUME :

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

Les résultats ont montré que 3,03 % des fromages contenaient des *L. innocua*, bactéries non pathogènes. Aucune autre espèce de *Listeria* n'a été mise en évidence, en particulier *L. monocytogenes*, la seule pathogène pour l'homme.

En revanche l'analyse d'autres études a montré que 3,26 % des fromages de chèvre pouvaient être contaminés par des *L. monocytogenes*.

Actuellement les fromagers prennent conscience de la notion de qualité bactériologique et de l'importance des mesures prophylactiques au niveau de la production laitière et de la fromagerie dans la lutte contre les *Listeria*.

MOTS CLES :

- *Listeria*
 - Fromages
 - Chèvre
 - Prévention
-

JURY : Président

: Madame le Professeur BOSGIRAUD

Juges

: Madame DELEBASSEE – Maître de conférence

Monsieur ARNAUD

Monsieur POURET
