

METHODES D'ANALYSE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

(résumé de l'intervention de Mme ROLLIER de CECALAIT lors de l'Assemblée générale de CECALAIT)

L *isteria monocytogenes* est une préoccupation constante en hygiène alimentaire en général, et dans le secteur laitier, en particulier, du fait de sa fréquence dans l'environnement et de son extrême résistance à de sévères conditions physico-chimiques. Des critères réglementaires clairement établis depuis 1992 ont conduit à l'accroissement du nombre de contrôles officiels et d'autocontrôles de la production à la distribution. D'où une forte augmentation du nombre de méthodes de recherche disponibles, de leur facilité de mise en œuvre, de leur spécificité et de leur rapidité. La méthode de référence ISO 11290-1/2 a, en outre, été l'objet d'un programme européen de grande ampleur, destiné à établir ses performances de fidélité.

D epuis le début de l'année 1999, une succession d'alertes à *Listeria monocytogenes* dans les aliments et deux cas mortels de listériose ont focalisé l'attention du public et des professionnels sur ce problème d'hygiène alimentaire.

La listériose est une maladie plutôt rare – 225 cas en France en 1997- dont l'origine est essentiellement alimentaire. Se traduisant par des symptômes similaires à ceux d'une grippe et sans conséquence chez la plupart des sujets, elle a en revanche des conséquences graves, méningite ou septicémie très souvent mortelles, chez des sujets à risque : les personnes âgées, les nouveaux-nés, les personnes immunodéprimées à la suite de traitements ou de maladies. Chez les femmes enceintes, elle aboutit le plus souvent à un avortement au cours des 2^e et 3^e trimestres ou à la mort du nouveau-né. Elle est due au germe *Listeria monocytogenes*, dont la dose infectante est mal connue et vraisemblablement dépendante de la personne et des conditions de contamination. Or ce germe est, à la fois, très fréquent dans l'environnement et exceptionnellement résistant.

En tout état de cause, la réglementation laitière, à savoir la directive CEE 92/46 et l'arrêté du 30/3/ 1994 spécifie son absence dans 25 g (lait, fromages...) ou plus rarement dans 1 g. Cependant en France, la note de service de la DGAL du 13/7/1994 autorise une dérogation pour les produits à base de lait présentant des caractéristiques traditionnelles en y tolérant 100 germes / g à la DLC / DLUO.

La détection de *L. monocytogenes* dans les aliments est donc un enjeu majeur en hygiène alimentaire. D'où une demande forte pour d'une part, l'amélioration de la rapidité, de la facilité et de la spécificité des méthodes ; d'autre part, la détermination des performances analytiques des méthodes de référence.

Un germe résistant et ubiquiste

Listeria monocytogenes est un bacille Gram +, mobile à 22°C et non à 37°C, aéro-anaérobie, c'est à dire préférant les tensions réduites en oxygène – par exemple celles observées dans les conditionnements sous vide ou sous atmosphère modifiée -. C'est un germe remarquablement résistant aux agents chimiques, ainsi qu'à des conditions sévères de température, pH ou salinité, comme le montre le tableau 1 ci-contre.

	température	pH	NaCl
optimum de croissance <i>optimal growth</i>	30 – 37°C	7,2 – 7,6	0,5 – 5%
croissance possible <i>possible growth</i>	1 – 45°C	4,7 – 9,6	maxi 12%
survie possible <i>possible survival</i>	30 mn, 55°C	4,2 (> 24h, 37°C)	maxi 30% (5 jours à 37°C) (5 days at 37°C)

tableau 1 : croissance et résistance de *Listeria monocytogenes*
(*table 1 : growth and resistance of Listeria monocytogenes*)

Dès lors, on le rencontre dans tous les milieux : l'air, le sol, l'eau, les poussières, les sédiments, les végétaux, les aliments, les porteurs sains...En ce qui concerne les aliments, la DGCCRF conduit, tous les ans, des plans de surveillance de leur taux et de leur fréquence de contamination. Les plans de 1993 à 1995 montrent ainsi que celle-ci, relativement importante pour les produits carnés (avec environ 15% d'échantillons positifs) va ensuite en décroissant pour les produits de la mer, les produits végétaux, les pâtisseries et les produits laitiers. Cependant, la contamination des produits laitiers est souvent spécifique aux fromages à pâte molle et présente alors des taux généralement plus élevés que les autres aliments.

L'observation des principales épidémies d'origine alimentaire recensées depuis le début des années 80, montre de même, une grande diversité des aliments responsables, depuis les choux jusqu'à la charcuterie (rillettes, hot dog...), en passant par les produits laitiers (fromages à pâte molle, lait pasteurisé...) et sans oublier les produits de la mer ! Elle souligne, en revanche, une large prédominance du sérotype 4b, en tant qu'agent responsable. Enfin, elle dessine une tendance récente à la diminution de la durée et du nombre de cas des épidémies. Ce résultat positif est sans aucun doute à mettre au crédit de l'amélioration du réseau épidémiologique, avec notamment des contrôles officiels et des

autocontrôles plus fréquents à tous les stades, de la fabrication à la distribution et de l'amélioration des méthodes d'analyse.

Une nécessaire évolution des méthodes

Cette augmentation du nombre des contrôles, à relier au respect des critères fixés par la réglementation, exigeait une amélioration des méthodes disponibles pour la recherche de *Listeria*

monocytogenes. En effet, les méthodes classiques, antérieures à 1988, sont de mise en oeuvre particulièrement longue et délicate.

Le tableau 2, ci-dessous retrace brièvement l'évolution des méthodes

tableau 2 : évolution des méthodes de recherche et de dénombrement de *Listeria monocytogenes*

table 2 : evolution of the methods of detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*

Etapes importantes <i>important steps</i>	Enrichissement <i>enrichment</i>	Géloses d'isolement sélectif <i>agar for selective isolation</i>	Identification	Numération <i>enumeration</i>
Méthodes classiques <i>classical methods</i> 1985 – 88	LEB LEB modifié	MMA + transillumination oblique + <i>Henry illumination</i> + identification	Galerie Classique <i>classic test strip</i> + hémolyse + <i>hemolysis</i> ou Camp test	NPP : LEB MPN : LEB + MMA + Identification
Amélioration des méthodes <i>improvement of the methods</i> 1988	Fraser ½ + Fraser (1993)	PALCAM (1988) OXFORD (1989) +identification	Mini galeries <i>micro strips</i> (API <i>Listeria</i>) (1990)	Gélose PALCAM <i>agar</i> + Identification
Méthodes rapides <i>rapid methods</i> <i>Listeria spp</i> 1988	milieu d'enrichissement propre à la méthode		Immuno (1988) <i>immunoassays</i> (1988) Sondes ADN <i>DNA probes</i> (1989)	
Méthodes rapides <i>rapid methods</i> <i>L. monocyt.</i> 1992	<i>enrichment medium corresponding to each method</i>	ALOA (1998) Rapid L mono (1998)	Immuno (1995) <i>immunoassays</i> (1995) Sondes ADN, PCR <i>DNA probes, PCR</i> (1992)	ALOA Rapid L mono

LEB : *Listeria* enrichment broth

MMA : modified Mac Bride Agar

NPP : nombre le plus probable = MPN : most probable number

Les méthodes de référence, c'est à dire, aujourd'hui, NF EN ISO 11290-1 et 2 de février 1997 et août 1998 (V 08-028-1 et -2), d'une part et FIL 143A:1995, d'autre part, ont profité de l'amélioration des milieux d'enrichissement et des géloses, signalée dans le tableau 2. Les performances analytiques de la méthode ISO viennent, en outre, d'être validées dans le cadre d'un vaste programme européen (cf ci-dessous). Leur durée de réalisation reste cependant trop longue pour les besoins routiniers des laboratoires. D'où la floraison de méthodes rapides, pour le genre *Listeria* d'abord, puis pour

l'espèce *L. monocytogenes*. Elles sont pour la plupart validées par l'AFNOR et ont permis une réduction très nette de la durée des analyses, comme le montre le tableau 3 ci-dessous. Cependant, l'étape d'enrichissement restant nécessaire, il est difficile, pour le moment, de descendre sous 48 heures.

Tableau 3 : principales méthodes rapides de détection des *Listeria*
 table 3 : major rapid methods for the detection of *Listeria*

Principe	Méthode	Détection (detection)		Durée (h) (duration)		
		<i>Listeria</i>	<i>L. mono</i>	24	48	72
principe	method	<i>Listeria</i>	<i>L. mono</i>	24	48	72
Sonde nucléique DNA probe	Gene Trak					
	Gen Probe					
	Probelia Transia					
Immuno -enzym.	Tecra					
	Vidas					
	Eia Foss					
Immuno- magnét.	Lister- screen					
Immuno- chromato	Listeria Rapid Test					

(en partie d'après Revue Laitière Française n° 547, février 1995)

CECALAIT organisant des essais interlaboratoires d'aptitude pour la détection de *Listeria* dans le lait depuis 1993, a pu observer les changements dans les pratiques des laboratoires. Ceux-ci ont clairement suivi l'évolution et la diversification des méthodes proposées. En témoigne l'ensemble des graphiques présentés dans la figure 1, à la fin de cet article. Elle compare les milieux d'enrichissement, les milieux d'isolement et les techniques d'identification utilisés entre le premier essai interlaboratoire en mars 1993 et le dernier essai en date (avril 1999).

Il faut noter cependant que les utilisateurs de méthodes rapides continuent à utiliser souvent les méthodes classiques pour confirmation. C'est dire l'intérêt que vont présenter les conclusions du programme européen de validation des méthodes ISO 11290-1 & 2 de détection et de dénombrement de *Listeria monocytogenes*.

Le programme européen sur les méthodes microbiologiques.

Il s'agit d'un programme de validation, par essais inter-laboratoires, de six méthodes microbiologiques ISO, destiné à y introduire des paramètres de fidélité, qui seront repris dans les normes européennes et internationales par le CEN et l'ISO. Les méthodes concernées portent sur la détection et/ou le dénombrement des microorganismes pathogènes suivants : *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*.

Après l'étude concernant *Bacillus cereus*, dont nous avons rendu compte, en son temps, (cf La Lettre de CECALAIT, n°26), ce sont les validations des méthodes de détection et dénombrement de *Listeria monocytogenes* qui ont été menées à bien.

ETUDES COLLABORATIVES

Les coordinateur et partenaires du programme sont :

- ♦ coordinateur de l'ensemble du projet : AFSSA (et Mme LAHELLEC)
- ♦ partenaires : le RIVM aux Pays-Bas et le MAFF-CSL au Royaume Uni; ce dernier étant responsable des études sur *L. monocytogenes*
- ♦ sous-contractants :
 - l'Institut Pasteur de Lille, pour la vérification des protocoles expérimentaux,
 - l'ENILBIO de Poligny pour les traitements statistiques de détection,
 - CECALAIT pour la préparation, la mise au point, la définition des paramètres de conservation et l'expédition des échantillons de fromage.

Chacune des évaluations utilise des échantillons de référence (des capsules préparées par le RIVM), et trois types d'aliments à contamination artificielle :

- ♦ des échantillons de fromage,
- ♦ des échantillons de viande déshydratée, préparés par le MAFF-CSL,
- ♦ des échantillons d'un autre aliment en poudre, ici de l'œuf, préparés par le RIVM.

Ils ont tous été contaminés, à plusieurs niveaux d'inoculum, à la fois, par une flore typique de l'aliment concerné, ainsi que par des souches de *Listeria monocytogenes* et *L. innocua* d'origine alimentaire.

Les niveaux finals de contamination sont décrits dans le tableau 4, en 2 parties ci-dessous.

échantillon sample	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua L. innocua</i>
ISO 11290-1 : détection (detection)		
N (négatif) (negative)	0	50 - 100 / 25 g
B (bas) (low)	5 - 10 / 25 g	50 - 100 / 25 g
H (haut) (high)	50 - 100 / 25 g	50 - 100 / 25 g
référence reference	≈ 20 <i>L. monocytogenes</i> par capsule ≈ 20 <i>L. monocytogenes</i> per capsule	

échantillon sample	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i>
ISO 11290-2 : dénombrement (enumeration)		
N (négatif) (negative)	0	0
B (bas) (low)	$2.5 \cdot 10^2$	$2.5 \cdot 10^2$
M (médian) (medium)	$2.5 \cdot 10^3$	$2.5 \cdot 10^3$
H (haut) (high)	$2.5 \cdot 10^4$	$2.5 \cdot 10^4$
référence reference	≈ 5000 <i>L. monocytogenes</i> par capsule ≈ 5000 <i>L. monocytogenes</i> per capsule	

Tableau 4 : niveaux de contamination des échantillons d'aliments utilisés pour les études de détection et de dénombrement de *L. monocytogenes*

Table 4 : range of *L. monocytogenes* in the samples used in the detection and enumeration studies.

Les études collaboratives ont finalement rassemblé :

- ♦ Pour l'étude de la détection :
19 laboratoires de 14 pays européens qui ont chacun analysé un jeu de 15 échantillons de chaque aliment, à savoir 5N, 5B, 5H ; ainsi que les 5 échantillons de référence correspondants.
- ♦ Pour l'étude du dénombrement :
21 laboratoires de 16 pays européens qui ont chacun analysé en double aveugle un jeu de 8 échantillons de chaque aliment, à savoir 2N, 2B, 2M et 2H ; ainsi que les 2 échantillons de référence correspondants.

Les principes des méthodes ISO 11290-1 et ISO 11290-2 se décomposent en plusieurs phases successives à partir de la préparation de la suspension mère

- ♦ Pour la détection, ISO 11290-1 :
 - enrichissement primaire en milieu Fraser 1/2,
 - enrichissement secondaire en milieu Fraser,
 - isolement sur géloses sélectives OXFORD et PALCAM, à partir des cultures obtenues à l'issue de chacune des deux étapes d'enrichissement,
 - confirmation du genre, puis de l'espèce au moyen de tests biochimiques, physiologiques et morphologiques appropriés (catalase, coloration de Gram, mobilité, éventuellement illumination de Henry ; puis hémolyse, utilisation des glucides et test de CAMP). A noter que l'étude collaborative n'a imposé que

les tests de la catalase, de l'utilisation des glucides et de CAMP ; les autres étant facultatifs.

- ♦ Pour le dénombrement, ISO 11290-2 :

- revivification pendant 1h à 20°C,
- isolement sur gélose sélective PALCAM, à partir de l'échantillon, s'il est liquide, ou de la suspension mère (préparée en utilisant comme diluant, soit l'eau peptonnée tamponnée, soit le milieu de base du Fraser 1/2), puis de leurs dilutions décimales,
- confirmation du genre, puis de l'espèce comme ci-dessus,
- à partir du nombre de colonies confirmées, calcul du nombre de *L. monocytogenes* par g.

RESULTATS

DETECTION

Les résultats montrent une bonne sensibilité générale de la méthode, environ 86% des échantillons positifs, même faiblement contaminés, sont détectés. Ils ne font apparaître aucune différence entre l'utilisation de la gélose OXFORD et de la gélose PALCAM. Enfin, ils confirment la nécessité de maintenir deux étapes d'enrichissement.

DENOMBREMENT

Les résultats des comptages ont été transformés en log. Puis les résultats aberrants ont été éliminés pour permettre la détermination des valeurs de répétabilité et de reproductibilité.

Le tableau 5 présente les valeurs obtenues

Tableau 5 : répétabilité et reproductibilité de la méthode ISO 11290-2

Table 5 : repeatability and reproducibility of ISO 11290-2

Echantillons samples	Taux range	Nombre labos number of labs	r (log)	R (log)
Fromage <i>cheese</i>	B	16	0.29	0.44
	M	16	0.60	0.71
	H	16	0.35	0.50
Viande <i>meat</i>	B	17	0.31	0.55
	M	17	0.56	0.63
	H	17	2.29	2.38
Œuf <i>egg</i>	B	16	1.28	1.28
	M	16	0.47	0.61
	H	16	2.26	2.29
Référence		18	0.32	0.67

avec / with

r : répétabilité : *repeatability*.

En échelle log signifie que la différence logarithmique obtenue entre deux répétitions dans le même laboratoire a une probabilité de 95% d'être inférieure à r.

R : reproductibilité : *reproducibility*

En échelle log signifie que la différence logarithmique obtenue entre deux analyses dans des laboratoires différents a une probabilité de 95% d'être inférieure à R.

B : niveau bas : *low range*

M : niveau médian : *medium range*

H : niveau haut : *high range*

Le tableau montre de grandes différences selon les types d'aliments et illustre la difficulté de mise en œuvre de la méthode, étant donné la non-spécificité de la gélose vis à vis de *L. monocytogenes*

CONCLUSIONS

Les conclusions de cette étude ont été transmises au CEN et à l'ISO en tant que recommandations pour l'évolution des normes. Les propositions acceptées pour la normalisation sont :

POUR LA NORME ISO 12990-1(DETECTION)

- ◆ reprendre les critères de performance ; sensibilité, spécificité, accordance, concordance, odds ratio, obtenus et mis au point dans cette étude (★)

POUR LA NORME ISO 12990-2(DENOMBREMENT)

- ◆ reprendre dans sa totalité, le tableau des répétabilités et reproductibilités dans le corps de la norme 11290-2. En effet, vu la dispersion des résultats, aucune valeur moyenne ne peut s'en dégager.

- ◆ approfondir la recherche sur l'étape de revivification d'une heure

POUR LES DEUX TEXTES

- ◆ Corriger une valeur erronée dans l'essai d'hémolyse en microplaque (% d'hématie de mouton = 2%, valeur vraie)

- ◆ mener des études pour proposer un milieu permettant de mieux différencier *L. monocytogenes* des autres espèces, notamment *L. innocua*.

Conclusion générale

La prise en compte de ces recommandations va donc mener à une révision prochaine des normes EN ISO 11290-1 et -2.

En outre, la tendance au développement de méthodes plus rapides et plus spécifiques, observée dans les tableaux 2 et 3, devrait permettre de détecter plus facilement et plus vite *Listeria monocytogenes*. Prévenir et enrayer les listérioses devrait dès lors devenir plus aisé. Cependant l'ubiquité et la résistance de ce germe doivent faire penser « que le risque 0 n'existe pas » et inciter au développement de l'information des consommateurs, notamment les sujets à risque.

BIBLIOGRAPHIE

- ◆ **arrêté du 30/3/1994**, relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché. Journal Officiel de la République Française du 21/4/1994

- ◆ **BIND J.L. ; DELAVAL J.** Les listérioses. Bull. Soc. Vét. Prat. de France, 1994, V. 78, N. 6-7, p. 387-407

- ◆ **Directive 92/46 CEE** du Conseil arrétant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait. JO CE L 268 du 14/9/1992

- ◆ **FIL 143A:1995** : lait et produits laitiers : recherche de *Listeria monocytogenes*

- ◆ **ISO 11290-1** (NF EN ISO 11290-1- V 08-028-1, février 1997) : microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 1 : méthode de recherche

- ◆ **ISO 11290-2** (NF EN ISO 11290-2- V 08-028-2, août 1998) : microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 2 : méthode de dénombrement.

- ◆ **note de service DGAL/SDHA/N94/N° 8121 du 13/7/1994**. Conditions d'agrément des établissements de traitement et de transformation du lait et des produits à base de lait. In Hygiène alimentaire « Lait et produits laitiers. n° 148 VI. Direction des Journaux Officiels, Paris, 1996.

- ◆ Revue Laitière Française, 1995, n° 547, p. 22

& aussi pour en savoir plus

- ◆ **CATTEAU M.** *Listeria monocytogenes* : un problème de méthode d'analyse ? Bull. Soc. Fr. Microbiol, 1999, V. 14, N. 2, p. 99-101

- ◆ **JICQUEL J.L.** *Listeria* : nouveau tour de vis pour la sécurité alimentaire. RIA, 1999, n° 591, p. 34-36

- ◆ **MOREL F.** Des fromagers condamnés à l'excellence. Process, 1999, n° 1148, p. 6-7

- ◆ **TJOMB P.** *Listeria* : les efforts ne sont pas récompensés. RIA, 1999, n° 590, p. 46-48

- ◆ site d'hygiène alimentaire de Bruno Peiffer : <http://www.chez.com/guatemalt/index.html>

- ◆ U.S. Food & Drug Administration : Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook : <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire desAliments

CEN : Comité Européen de Normalisation

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

DGCCRF : Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes

DLC /DLUO : date limite de consommation / date limite d'utilisation optimale

ENILBIO : Ecole Nationale d'Industrie Laitière et des Biotechnologies

ISO : International Standard Organization

MAFF-CSL : Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Central Science Laboratory

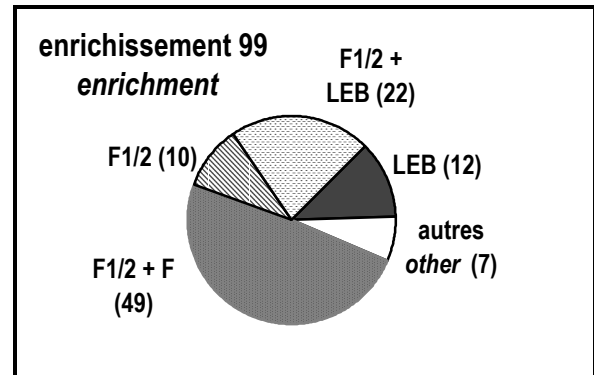
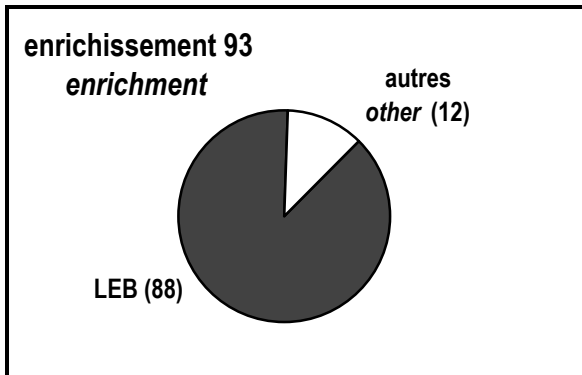
RIVM : Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu

Figure 1 Essais interlaboratoires CECALAIT dans le lait
comparaison des méthodes entre 1993 et 1999

Figure 1 : CECALAIT ringtests : comparaison de méthodes between
1993 and 1999

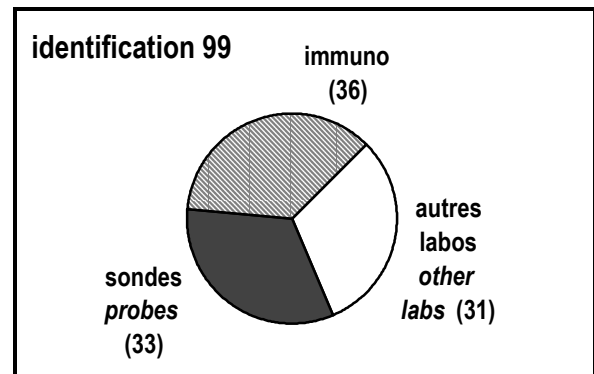
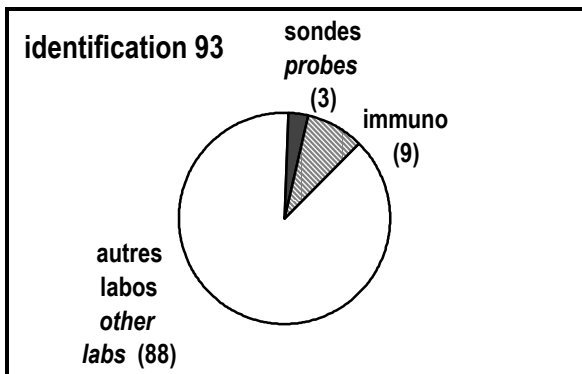
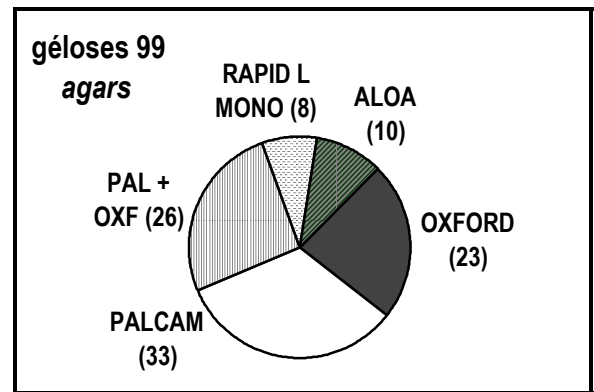
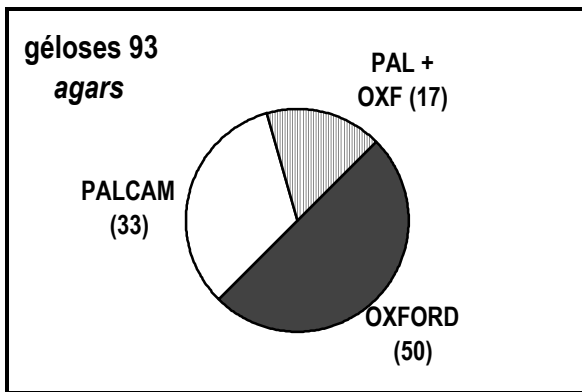
Mars 1993 (33 laboratoires)
March 1993 (33 labs)

Avril 1999 (42 laboratoires)
April 1999 (42 labs)



LEB : *Listeria* enrichment broth

F : milieu de Fraser F1/2 : milieu de Fraser 1/2



(% des laboratoires) / (% of labs)

★

sensibilité : pourcentage d'échantillons positifs reconnus correctement

spécificité : pourcentage d'échantillons négatifs reconnus correctement

accordance : paramètre équivalent, en gros, à la répétabilité dans les études quantitatives

concordance : paramètre équivalent, en gros, à la reproductibilité dans les études quantitatives

odd ratio : paramètre permettant d'évaluer le degré des variations entre laboratoires, par comparaison entre les valeurs d'accordance et de concordance

Définitions plus précises auprès de Cecalait, sur demande.