

LE POINT SUR LA DETECTION DE *LISTERIA*

En Avril 1993, CECALAIT a organisé la première chaîne interlaboratoires de recherche de *Listeria* dans les produits laitiers. Par ailleurs, lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT du 18 juin 1993, Mme BOHNERT du LCHA (Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire) a fait le point sur les méthodes de recherche de *Listeria*.

Il nous a semblé intéressant de rassembler dans un même numéro de La Lettre de CECALAIT, un premier bilan de cette chaîne et un résumé de l'intervention de Mme BOHNERT.

RESUME DE L'INTERVENTION DE Mme BOHNERT

Ce n'est que depuis le début des années 80, qu'il a été possible de faire le lien entre la listériose et les aliments. Cette maladie peu répandue en France (1,2 cas pour 100000 habitants) a cependant des conséquences graves (avortements, méningites...)

Certains sérotypes de *Listeria monocytogenes* sont plus particulièrement impliqués dans la listériose humaine : 4b, 1/2a, 1/2b; la dose infectieuse reste inconnue.

Une grande évolution dans les méthodes de détection

Les méthodes de recherche imposées par les Etats-Unis (FDA pour les produits laitiers, USDA pour les produits carnés) ont fortement évolué :

- d'une incubation de plusieurs semaines au froid, on est passé à une incubation d'un maximum de 7 jours à 30°C, et à 48 h actuellement;

- dans la méthode FDA initiale, le milieu d'isolement (Mac Bride modifié) était peu sélectif. Il est remplacé maintenant par des géloses plus performantes, Oxford et Palcam en particulier;

- une nouvelle méthode a été adoptée lors de la dernière réunion FIL. L'enrichissement se fait en deux étapes dans le milieu FRASER qui a l'avantage d'être fortement tamponné et de contenir du fer, facteur de croissance pour *Listeria*.

★ ENRICHISSEMENT : FRASER 1/2 : 24 h à 30°C et isolement (peu sélectif)

★ SUBCULTURE : FRASER : isolement après 24 et 48 h à 30°C (sélectif)

Les milieux d'isolement sont Oxford ou Palcam.

Cette méthode fera prochainement l'objet d'une note de service des Services Vétérinaires. La méthode AFNOR sera disponible en Novembre.

Grâce à son caractère hémolytique, il est possible de distinguer *Listeria monocytogenes* de l'espèce *L. innocua* sur des milieux sélectifs recouverts de gélose au sang. Des sondes froides sont maintenant parfaitement au point pour la recherche spécifique de

L. monocytogenes.

Aucune étude n'a pu mettre en évidence la croissance préférentielle d'une de ces deux espèces dans les bouillons d'enrichissement habituels.

CHAINE *LISTERIA*

Cette chaîne, consacrée aux "pathogènes", proposait outre la numération de *Listeria*, celle d'*Escherichia coli* et des staphylocoques dans le lait cru.

Selon la directive de la CEE du 14 Juin 1992, *Listeria* doit être recherchée :

- dans 25 g de produit pour les fromages autres que ceux à pâte dure

- dans 1 g pour tous les autres produits (en vigueur avant le 1er Janvier 1994).

Cette chaîne étant réalisée dans le lait, nous avons demandé de rechercher *Listeria* dans 1 ml de lait.

Sur les 5 échantillons envoyés à chacun des laboratoires participants, l'un était négatif, un autre contenait *L. innocua*; deux *L. monocytogenes* et un dernier, un mélange de ces deux espèces.

Un traitement original des résultats

L'interprétation des résultats a amené M. LERAY à développer un nouveau programme de traitement des résultats de type "+ ou -".

Dans ce programme, les réponses de type "oui" ou "non" à certaines questions (par exemple, "présence de *Listeria* ?" "présence de *L. monocytogenes* ?") sont transformées en réponses vraies ou fausses par comparaison à la réponse type de référence. Les laboratoires sont ensuite classés selon leur fréquence de réponses justes (voir tableaux 1 et 2)

Tableau 1 : tableau des réponses des laboratoires (8 laboratoires; 5 échantillons, 3 critères)

* No	!!	1	!	2	!	3	!	4	!	5	*	
	!!	1	2	3	!	1	2	3	!	1	2	3
* 1	!!	O	N	O	!	O	O	N	!	N	M	N
* 2	!!	O	N	O	!	O	O	N	!	N	M	N
* 3	!!	O	N	O	!	O	O	N	!	N	M	N
* 4	!!	O	N	O	!	O	O	O	!	M	N	N
* 5	!!	O	N	N	!	O	N	N	!	N	M	N
* 6	!!	O	N	O	!	N	N	N	!	N	M	N
* 7	!!	O	N	O	!	N	N	N	!	N	M	N
* 8	!!	O	O	N	!	O	O	N	!	N	M	N
* REF.	!!	O	N	O	!	O	O	N	!	N	M	N

REPONSES : O = OUI, N = NON, AUX QUESTIONS :

- 1 : PRESENCE DE *LISTERIA*
- 2 : PRESENCE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
- 3 : PRESENCE DE *LISTERIA INNOCUA*

Tableau 2 : tableau de justesse (8 laboratoires; 5 échantillons, 3 critères)

No	1	2	3	4	5	HLV	NL	FLV
1	V	V	V	V	V	14	15	93
2	V	V	V	V	V	14	15	93
3	V	V	V	V	V	15	15	100
4	V	V	V	V	V	13	15	87
5	V	V	F	V	V	10	15	67
6	V	V	V	F	V	12	15	80
7	V	V	V	F	V	10	15	67
8	V	F	F	V	V	12	15	80
MEV	8	7	6	6	5	7	8	8
NE	8	8	8	8	8	8	8	8
FEV	100	88	75	75	63	88	100	100

MEV : NOMBRE de réponses JUSTES par ECHANTILLON et par CRITERE
 NE : NOMBRE de réponses TOTAL par ECHANTILLON et par CRITERE
 FEV % : FREQUENCE RELATIVE en réponses JUSTES par ECHANTILLON et par CRITERE
 HLV : NOMBRE de réponses JUSTES par LABORATOIRE
 NL : NOMBRE de réponses TOTAL par LABORATOIRE
 FLV % : FREQUENCE RELATIVE en réponses JUSTES par LABORATOIRE

Une autre façon de traiter les résultats est d'attribuer une note différente selon la question posée afin de prendre en compte l'importance législative ou analytique de certains critères :

- exemple (voir tableau 3)
- * "Présence du genre *Listeria* ?" : 2
- * "Présence *L. monocytogenes* ?" : 2
- * "Présence *L. innocua* ?" : 1

Tableau 3 : tableau des notations des laboratoires (8 laboratoires; 5 échantillons, 3 critères)

No	1	2	3	4	5	NOTE	BASE	NOTE
1	2	2	1	2	2	1	2	2
2	2	2	1	2	2	1	2	2
3	2	2	1	2	2	1	2	2
4	2	2	1	2	2	1	2	2
5	2	2	0	2	2	1	2	2
6	2	2	1	0	0	1	2	2
7	2	2	1	0	0	1	2	2
8	2	2	0	2	2	1	2	2
BASE	2	2	1	2	2	1	2	2

Ces notes ne sont attribuées qu'en cas de réponse juste; en cas de réponse fausse, la note est 0. Une note finale sur 20 permet de classer les laboratoires (voir tableau 5). S'il existe plusieurs critères, ce classement peut être différent de celui obtenu par les fréquences de réponses justes (voir tableau 4).

Tableau 4 : classement des laboratoires selon les fréquences de réponses justes

NUMERO	NUMERO	FLV %
1	3	100.0
2	2	93.3
3	1	93.3
4	4	86.7
5	6	80.0
6	8	80.0
7	7	66.7
8	5	66.7

Tableau 5 : classement des laboratoires selon les notes décroissantes

NUMERO	NUMERO	NOTES sur 20
1	3	20.0
2	2	19.2
3	1	18.4
4	4	17.6
5	8	16.8
6	6	15.2
7	5	13.6
8	7	12.0

Il est possible de réaliser un triple traitement selon le degré d'identification : recherche du genre *Listeria*, recherche de *Listeria monocytogenes*, recherche et identification de *Listeria*. Lors de cette première chaîne, les résultats obtenus selon le type de traitement sont regroupés dans le tableau 6.

TYPE DE TRAITEMENT	NOTE / 20	FREQUENCE DE LABOS SUR 34	SIGNIFICATION ANALYTIQUE
GENRE <i>LISTERIA</i> (aucun faux positif)	20/20	82%	bonnes réponses
	16/20	9%	1 faux négatif
	12/20	9%	2 faux négatifs
<i>L. MONOCYTOGENES</i>	20/20	44%	bonnes réponses
	16/20	29%	1 réponse fausse
	12/20	9%	2 réponses fausses
	8/20	18%	3 réponses fausses
<i>LISTERIA IDENTIFIEES</i>	20/20	30%	bonnes réponses
	< 20/20 > 16/20	44%	1 à 2 fautes d'identification d'espèces
	< 16/20 > 12/20	26%	+ de 2 fautes dans l'identification d'espèce ou de genre ou <i>Listeria</i> non retrouvé

tableau 6 : résultats obtenus selon le type de traitement

* dont 9% n'ont pas effectué l'identification complète de l'espèce.

Ce type de traitement pourra également être utilisé en dehors des analyses microbiologiques, pour la détection des antibiotiques, par exemple. De même, dans un proche avenir, il sera applicable aux chaînes d'analyse "pathogènes" que nous pensons mettre au point dans les fromages.