Les listérioses : diagnostic, physiopathologie, prophylaxie

Olivia Legallant

▶ **To cite this version:**

Olivia Legallant. Les listérioses : diagnostic, physiopathologie, prophylaxie. Sciences pharmaceutiques. 1994. dumas-02452842

HAL Id: dumas-02452842

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02452842

Submitted on 23 Jan 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n’a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l’utilisation de ce document.

D’autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur

115 015397 3

2e exemplaire

UNIVERSITE Joseph FOURIER - GRENOBLE I - Sciences Technologie Médecine

U. F. R. DE PHARMACIE

Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE : 1994

N° D'ORDRE : 7025

TITRE DE LA THESE

LES LISTERIOSES :
DIAGNOSTIC, PHYSIOPATHOLOGIE, PROPHYLAXIE

THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE I
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE.

Par

Mlle : LEGALLANT Olivia
[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 20 Juin 1994, devant

Mme le Professeur J. ALARY, Président du jury

Mme A. VILLET, Maître de Conférences

Mme M. BLANC, Pharmacien.

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE-PHARMACIE

UNIVERSITE Joseph FOURIER - GRENOBLE I - Sciences Technologie Médecine

U. F. R. DE PHARMACIE

Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE : 1994

N° D'ORDRE : 7025

TITRE DE LA THESE

LES LISTERIOSES :
DIAGNOSTIC, PHYSIOPATHOLOGIE, PROPHYLAXIE

THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE I
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE.

Par

Mlle : LEGALLANT Olivia
[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 20 Juin 1994, devant

Mme le Professeur J. ALARY, Président du jury

Mme A. VILLET, Maître de Conférences

Mme M. BLANC, Pharmacien.

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE-PHARMACIE

A mes Parents,

A ma Famille,

A tous mes Amis.

A mon Président du Jury et Directeur de Thèse,

Madame le Professeur J. ALARY,
Professeur de Chimie Analytique à l'U.F.R. de Pharmacie de Grenoble.

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse, soyez-en remerciée.

Pour votre amabilité et vos conseils, veuillez trouver ici, l'expression de toute ma gratitude.

A Madame A. VILLET, Maître de Conférences,

Laboratoire de Chimie Analytique de l'U.F.R. de Pharmacie de Grenoble.

Vous avez fait preuve d'une grande disponibilité et votre aide m'a été précieuse.

Je vous en suis profondément reconnaissante.

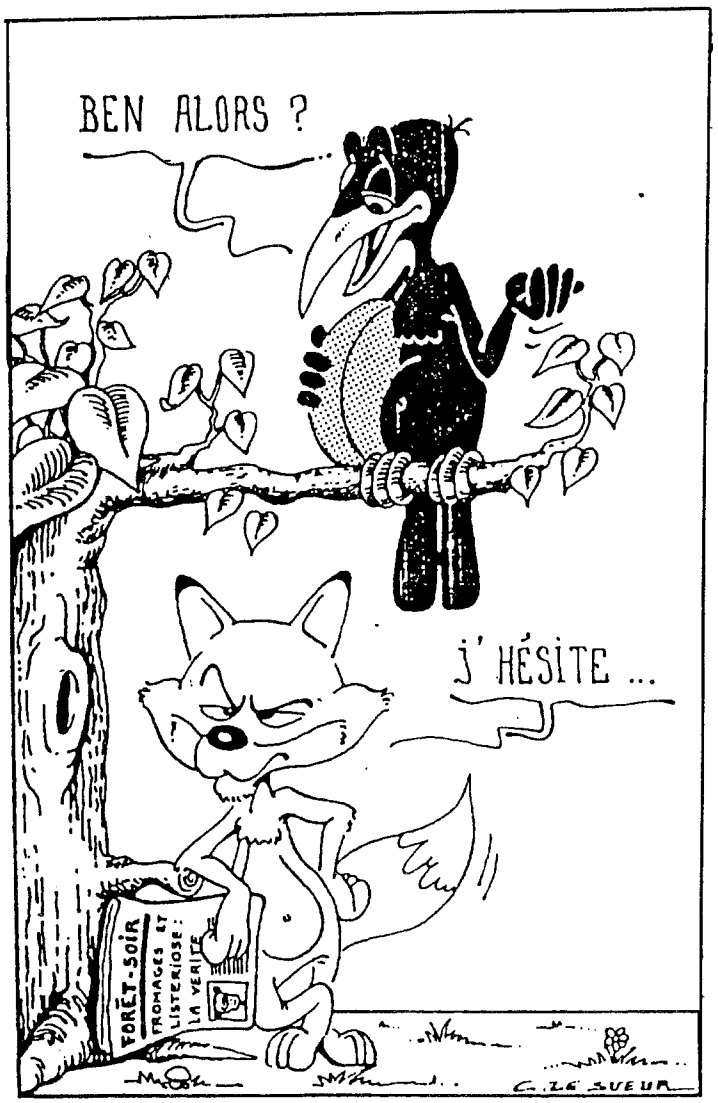
A Madame M. BLANC, Pharmacien,

Laboratoire E.R.C.E.M.

Vous avez bien voulu faire partie de mon jury de thèse.

Je suis sincèrement touchée par votre gentillesse.

LES LISTERIOSES :
DIAGNOSTIC, PHYSIOPATHOLOGIE, PROPHYLAXIE


BEN ALORS ?
J' HÉSITE ...
FORÊT-SOIR
FROMAGES ET LISTERIOSE: LA VÉRITÉ
G. LE SUEUR

SOMMAIRE

1ère PARTIE :

HISTORIQUE

2ème PARTIE :

LE GERME

3ème PARTIE :

EPIDEMIOLOGIE

4ème PARTIE :

PHYSIOPATHOLOGIE

5ème PARTIE :

DIAGNOSTIC

6ème PARTIE :

TRAITEMENT

7ème PARTIE :

PROPHYLAXIE

8ème PARTIE :

LISTERIA DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

9ème PARTIE :

BESOINS DE LA RECHERCHE

INTRODUCTION

La France, comme de nombreux pays, possède une industrie agro-alimentaire relativement développée et exportatrice ; de ce fait, la listériose pose un double problème de santé publique et économique.

Ceci, associé à la peur éprouvée par certains consommateurs, doit amener les pouvoirs publics à prendre des mesures d'hygiène et de prévention.

C'est pourquoi, il nous a paru intéressant de faire la synthèse des connaissances sur :

- la bactériologie des Listeria,
- l'épidémiologie des listérioses,
- la pathologie des listérioses,
- le diagnostic des listérioses,
- le traitement des listérioses,
- la prévention des listérioses,
- la contamination des denrées alimentaires par les Listeria,
- la détection des Listeria dans les aliments,
- les moyens de lutte contre les Listeria.

Néanmoins, de nombreuses incertitudes persistent comme nous le verrons et la recherche a encore beaucoup de progrès à faire dans l'optique de maîtriser totalement cette bactérie extrêmement dangereuse pour certains ; nous nous proposons donc de citer quelques caractéristiques qui mériteraient d'être étudiées.

1ère PARTIE :

HISTORIQUE

Listeria monocytogenes, espèce-type du genre Listeria (du nom du chirurgien anglais Lord Lister) a été isolée en 1926 par MURRAY et coll. (404) à l'Université de Cambridge lors d'une épizootie chez des lapins et des cobayes présentant une mononucléose sanguine et des lésions de nécrose hépatique ; ils lui donnèrent le nom de *Bacterium monocytogenes.*

Mais, des infections à Listeria ont certainement été rencontrées avant cette première description.

HÜLPHERS en Suède l'a décrite en 1911 chez le lapin sous le nom de *Bacillus hepatis.*

DUMON et COTONI (155) isolèrent, en 1918, un germe "diphtéroïde" dans le liquide céphalo-rachidien d'un soldat italien atteint de méningite purulente, en Champagne.

La publication mentionnait seulement l'existence d'une bactérie nouvelle évoquant le "bacille du rouget du porc" ou Erysipelothrix rhusiopathiae.

La souche isolée avait été conservée à l'Institut Pasteur.

A partir de 1924, le germe a été isolé chez de nombreuses espèces et a reçu différents noms :

- chez la gerbille en Afrique par PIRIE (445) en 1927 (*Listeria hepatolytica*),

- chez le porc en 1924 par des russes (*X Bacillus*),

- chez le mouton en Nouvelle-Zélande par GILL en 1929 (*Listerella ovis*),

- chez d'autres animaux présentant des troubles moteurs par MATTHEWS en 1928, SEASTONE, BIESTER et SCHWARTE en 1939 (*Listerella monocytogenes bovis* ou *suis* selon l'espèce).

D'autres noms ont été recensés à savoir :

- *Corynebacterium infantisepticum*,

- *Corynebacterium parvulum*,

- *Erysipelothrix monocytogenes.*

Le premier isolement chez l'homme a été effectué par NYFELDT en 1929 lors d'un syndrome mononucléosique (*Bacterium monocytogenes hominis*) et dès 1933, BURN a démontré le rôle de cette bactérie dans l'infection périnatale.

Le nom officiellement admis depuis 1941, suite aux travaux de COTONI (115), est ***Listeria monocytogenes.***

A partir de 1950, REISS, POTEL et KREBS (464) ont décrit la forme septicémique du nouveau-né ou granulomatosis infantiseptica et SEELIGER (501) (502) a montré que Listeria monocytogenes jouait un rôle important en pathologie ; la relation entre la gestation et la listériose est alors établie.

Mais, l'origine de la contamination est plus difficile à découvrir.

En ce qui concerne les animaux, une relation évidente entre les épisodes de listériose et la consommation d'ensilage est reconnue dès 1960.

Chez l'homme, c'est seulement en 1981 qu'une origine alimentaire est prouvée et que la première épidémie de 1985 en Californie due à la consommation d'un fromage frais de type mexicain par la communauté hispano-américaine est élucidée.

Les autres épidémies importantes datent de 1981 au Canada où est incriminée une salade de chou, en 1983 au Massachusetts où l'agent responsable est un lait pasteurisé, en 1987 en Suisse suite à la consommation de Vacherin Mont d'Or produit dans le canton de Vaud et enfin en 1992 en France où l'agent est de la langue de porc en gelée.

2ème PARTIE :

LE GERME

I. POSITION TAXONOMIQUE.

Selon la classification française de PREVOT (450), Listeria monocytogenes appartient à l'ordre des "Actinobactériales", famille des Actinomycetaceae dont elle constitue le sixième genre voisin de Corynebacterium et Erysipelothrix.

La classification américaine du Bergey's Manual est différente :

- dans l'édition de 1957, Listeria monocytogenes est classée dans la famille des Corynebacteriaceae avec les genres Corynebacterium, Erysipelothrix, Microbacterium, Cellulomonas et Arthrobacter (535),

- dans l'édition de 1974, le germe est classé après la famille des Lactobacillaceae dans une rubrique "genre d'affiliation incertaine" (80) (596) avec les genres Erysipelothrix et Caryophanon.

Ce genre comprend quatre espèces : Listeria monocytogenes, Listeria denitrificans, Listeria grayi et Listeria murrayi, mais Listeria monocytogenes est l'espèce-type du fait de la rareté des autres.

STUART et coll. (536), à la suite d'expériences d'hybridation ADN-ADN ont proposé de créer un nouveau genre Murraya, comprenant Murraya grayi spp. grayi et Murraya grayi spp. murrayi, mais ces taxons sont rarement rencontrés, et jamais à partir de matériel humain.

- dans l'édition de 1986 (500), le genre Listeria est regroupé avec six autres genres dans un ensemble hétérogène de *bacilles à Gram positif réguliers ne formant pas de spore* ou section 14 regular, nonsporing, Gram positive rods d'après des résultats de taxonomie numérique et de séquençage de l'ARN ribosomique 16S (Tableaux I et II).

Ces conclusions sont corroborées par un faible G + C mol. %, la présence d'acides lipotéichoïques ainsi que l'absence d'acides mycoliques (473).

Longtemps considéré comme proche des genres Listeria et Erysipelothrix, le genre Corynebacterium a été éloigné.

De plus, Listeria grayi, Listeria murrayi et Listeria denitrificans sont classées comme étant d'affiliation incertaine.

Dernièrement, Listeria denitrificans, décrite en 1948, a été retirée du genre Listeria sur des arguments génétiques, chimiques, biochimiques et de microscopie électronique pour être classée dans le genre Jonesia comprenant l'espèce unique Jonesia denitrificans (472), alors que Listeria murrayi et Listeria grayi ont été reclassées dans le genre Listeria.

Le genre Listeria appartient donc au groupe des bacilles à Gram positif réguliers ne formant pas de spore avec les genres Lactobacillus, Erysipelothrix, Brocothrix, Kurthia, Caryophanon et Renibacterium ; Listeria monocytogenes en est l'espèce-type et sept espèces (Figure 1) sont dénombrées :

- Listeria monocytogenes décrite en 1926,

- Listeria grayi décrite en 1966,

- Listeria murrayi décrite en 1973 (582),

- Listeria innocua décrite en 1981 (507),

- Listeria seeligeri décrite en 1983,

- Listeria welshimeri décrite en 1983,

- Listeria ivanovii décrite en 1984 (508).

Tableau I : Groupe des bacilles réguliers à Gram positif.

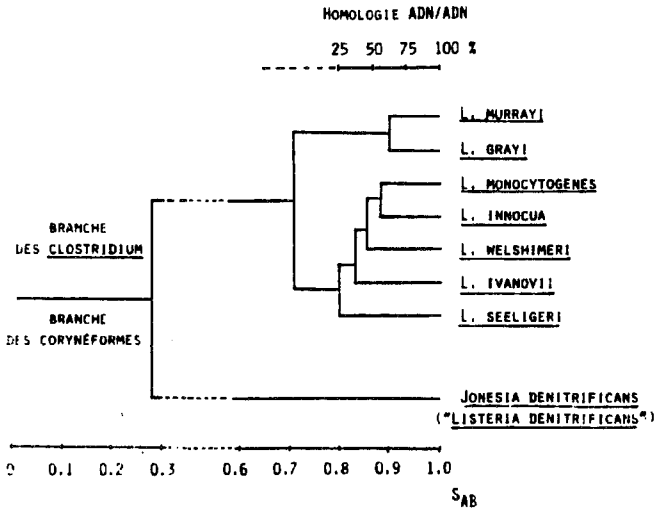
		Catalase	Type resp	Mobilité	Habitat
	Lactobacillus	-	A.A.F	-	Produits fermentés non pathogène
Bacilles fins souvent en filaments	*Erysipelothrix*	-	A.A.F	-	Rouget du porc: pathogène
Bacilles fins souvent en filaments	*Brochothrix*	+	A.A.F	-	Produits carnés : non pathogène
Bacilles courts souvent en courtes chaînettes	*Listeria*	+	A.A.F	+ 20-25°C	Saprophyte:pathogène chez l'homme et l'animal
Bacilles en chaînnettes, coccoïdes dans les cultures âgées	*Kurthia*	+	A.S	+	Intestin des animaux de la ferme Produits carnés : non pathogène
Bacilles courts en chaînettes	*Caryophanon*	+	A.S	+	Intestin de la vache non pathogène
Bacilles courts souvent par paires	*Renibacterium*	+	A.S	-	Pathogène du poisson

A.A.F : aéro-anaérobie facultatif
A.S : aérobie strict

Tableau II : Principaux caractères différentiels des bactéries à Gram positif (morphologie exclue).

	Listeria monocytogenes	Coryné-bactéries	*Enterococcus faecalis*	*Lactobacillus*	*Erysipelothrix rhusiopathiae*	*Bacillus*	*Streptoccus agalactiae*
Mobilité	+(25°C)	-	-	-	-	±	-
Granulations métachromatiques	-	±	-	-	-	-	-
Spores	-	-	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	-	-	-	+	-
Hémolyse	+	d	±	-	-	+	+
Nitrates	-	+(-)	-	-	-	+	-
Mannitol	-	-	+	- ou +	-	±	-
Esculine	+	-	+	-	-	-	-
Uréase	-	- ou +	-	-	-	- ou +	-
SH_2	-	-	-	-	+	-	-
Test Anton	+	-	-	-	-	-	-

Figure 1 : Structure phylogénétique du genre Listeria.



Listeria innocua a été isolée à partir de l'environnement par SEELIGER (507) en 1981 et est considérée comme une espèce non pathogène.

Listeria seeligeri et Listeria welshimeri ont été décrites en 1983 par ROCOURT et GRIMONT (468) et classées primitivement comme Listeria monocytogenes non pathogènes et ensuite distinguées par des études d'hybridation ADN-ADN (467).

Listeria ivanovii a été décrite précédemment sous le nom de Listeria monocytogenes sérovar 5 ou Listeria bulgarica en 1975 par IVANOV et appelée Listeria ivanovii depuis 1984 ; elle est uniquement responsable de maladies chez le mouton (508).

II. HABITAT. (336)

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquitaire présentant les caractères d'une bactérie tellurique puisqu'on la retrouve dans :

- le sol où l'extrême résistance est fonction de la nature du terrain, de la température ambiante et de la saison malgré l'absence de spore.

Elle peut survivre un à deux ans dans le sol alors que dans un prélèvement maintenu à 4°C, la survie peut être de plusieurs années.

- la végétation où elle est présente dans 10 % des ensilages et d'autant plus qu'ils sont de mauvaise qualité et donc que leur pH augmente, favorisant ainsi la survie et la multiplication du germe.

Elle est présente sur les pourtours et en surface du silo mais aussi dans le fumier, les plantes, la paille, les poussières et les boues.

L'environnement plante - sol constitue donc un réservoir mais le problème est de savoir si c'est une flore normale ou s'il y a eu contamination.

- l'eau : Listeria monocytogenes est souvent présente dans les eaux de rivière et les effluents mais jamais dans l'eau de mer.

- l'homme et les animaux (63) (471) :

. le taux de portage dans les matières fécales (147), la gorge et le pharynx d'individus sains varie selon les auteurs de 0,6 à 44 % (173) (294),

. 10 à 30 % des ovins, bovins, porcins, poulets, animaux sauvages sont porteurs de Listeria monocytogenes au niveau des sécrétions nasales et des matières fécales.

III. CARACTERES BIOCHIMIQUES. (336)

Listeria monocytogenes est un bacille à Gram positif, aéro-anaérobie facultatif avec tendance à la microaérophilie, psychrotrophique, catalase + et oxydase -.

III. 1. METABOLISME GLUCIDIQUE.

Il est de type fermentatif donnant naissance à du phosphate de dihydroxyacétone et du glycéraldéhyde lequel est transformé en acide pyruvique puis en acide lactique, éthanol et butanédiol et ceci sans production de gaz ; cette séquence chimique est connue sous le nom de voie d'Embden-Meyerhof.

Sont fermentés les glucose, fructose, mannose, L-rhamnose, méthyl-D-mannoside, amygdaline, salicine, cellobiose, maltose, tréhalose, gentobiose, D-arabitol, lévulose, lactose, saccharose, glycérine, dextrine, galactose, mélézitose, sorbitol alors que les D-lyxose, mannitol, amidon, D-xylose, arabinose, raffinose, mannite, dulcite, inuline, inositol, dulcitol et adonitol ne le sont pas.

L'esculine est hydrolysée rapidement en esculétine ou 6,7 dihydroxycoumarine et D-glucose grâce à une β-glucosidase.

Un système phosphoénolpyruvate (PEP) : fructose phosphotransférase (PTS) générant du fructose-1-phosphate et permettant l'initialisation du métabolisme glucidique a été mis en évidence chez Listeria monocytogenes (397).

III. 2. METABOLISME AZOTE.

Il est peu actif et on peut remarquer :

- l'absence de nitrate réductase,
- l'absence d'uréase car l'urée n'est pas hydrolysée,
- l'absence de production d'indole et de H_2S,
- l'absence d'activité protéolytique du fait que Listeria monocytogenes ne liquéfie pas la gélatine ni le sérum coagulé,
- l'acidification du lait tournesolé sans coagulation.

III. 3. METABOLISME LIPIDIQUE.

KHAN et coll. (291) ont mis en évidence la présence d'une lipase et/ou lécithinase suite à l'hémolyse sur gélose au sang de cheval contenant comme substrat du jaune d'œuf, de la lécithine et de la tributyrine.

III. 4. AUTRES CARACTERES DE DIFFERENCIATION AVEC LES AUTRES ESPECES. (Tableau III) (Figure 2) (Annexe I)

Il s'agit de :

- la réaction de Voges-Proskauer en présence de potasse et d'α-naphtol positive : couleur rouge vif en raison de la production d'acétoïne par fermentation du 2, 3 butanédiol,

- la réaction au rouge de méthyle positive par virage au rouge vif du fait de la fermentation acide-gaz mixte,

- l'hémolyse sur gélose au sang de mouton,

- le test de CAMP : hémolyse en présence de Staphylococcus aureus et Rhodococcus equi (469),

EPREUVE DE CAMP

-Réalisation

Ensemencer une souche de *Staphylococcus aureus* ß-hémolytique (telle que ATCC 25178) et une souche de *Rhodococcus equi* (telle NCTC 1621), de manière verticale, sur la gélose au sang de mouton. Espacer ces deux stries verticales afin de pouvoir ensemencer entre elles, à l'horizontale, et sans les toucher, les souches à examiner.
Après 24 - 48 heures d'incubation à 35°C, examiner les boîtes pour observer la réaction d'hémolyse dans la zone adjacente aux stries verticales.
L'hémolyse produite par *L. monocytogenes* est exaltée à proximité de la strie du *Staphylococcus* ; l'hémolyse produite par *L. ivanovii* est exaltée à proximité de la strie de *Rhodococcus*.
Lors de cette épreuve, les autres espèces demeurent non hémolytiques.
L'épreuve de Camp permet la différenciation entre *L. ivanovii* et *L. seeligeri*, et celle des souches de *L. seeligeri* faiblement hémolytiques, qui ont pu être lues non hémolytiques, de *L. welshimeri*.

-Commentaires

Cette épreuve facilite l'appréciation du pouvoir ß-hémolytique des espèces *L. monocytogenes* et surtout *L. seeligeri*. Il est recommandé d'utiliser une souche de *S. aureus* ayant une zone de ß-hémolyse importante et une souche de *Rhodococcus equi* qui, en exaltant la ß-hémolyse de *L. ivanovii*, la fait paraître sous un aspect caractéristique en forme de pelle.

Les deux souches sont disponibles au Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire - 43, rue de Dantzig - 75015 PARIS.

- le pouvoir pathogène pour la souris par injection par voie intrapéritonéale d'une suspension concentrée (10^9 cellules) entraînant la mort de la souris dans une période de 7 jours,

POUVOIR PATHOGENE POUR LA SOURIS

Faire développer la culture en TSB-YE pendant 24 heures à 35°C. Ensemencer une deuxième fois dans 2 tubes de TSB-YE pendant 24 heures à 35°C.
A partir des deux tubes, rassembler au total 10 ml de culture dans un tube de 16x125 mm bouché à vis et centrifuger à 1600xg pendant 30 mn. Eliminer le surnageant et remettre en suspension le culot avec 1 ml de solution à 0,85 p. 100 de chlorure de sodium.
Cette suspension contiendra approximativement 10^{10} bactéries par ml.
Injecter par voie intrapéritonéale des souris blanches de race Suisse de 16-18 g avec 0,1 ml de la suspension concentrée. Chaque souris reçoit ainsi 10^9 cellules microbiennes.
Observer la mort de l'animal pendant une période de sept jours.
Les souches non pathogènes ne tuent pas, mais 10^9 cellules pathogènes tueront généralement en moins de cinq jours.
Cette épreuve devra être contrôlée avec des souches reconnues pathogènes et non pathogènes.

- le test d'ANTON par introduction dans le sac conjonctival de l'œil de lapin ou de cobaye de 2 à 3 gouttes d'une suspension bactérienne et apparition d'une conjonctivite purulente en 2 à 5 jours guérie par administration locale d'ampicilline.

IV. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE. (336)

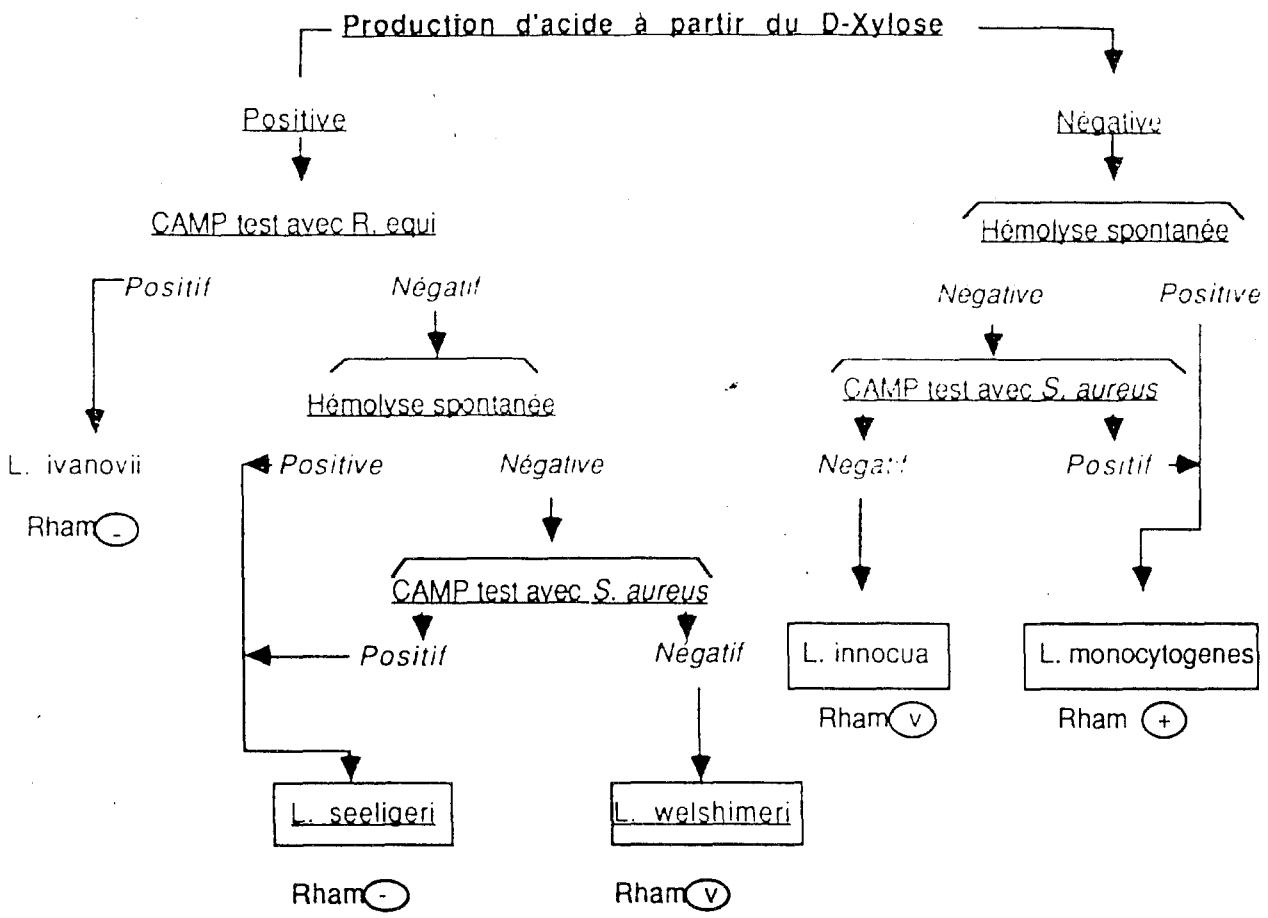
Listeria monocytogenes est un bacille Gram positif de 0,5 µm à 2 µm de long, asporulé, acapsulé bien qu'une capsule ait été observée dans certaines conditions de culture (503), immobile à 37°C, mobile à 20°C par 4 à 5 cils péritriches (mobilité en pirouette à l'état frais, en sapin renversé ou en ombrelle ou en parapluie sur gélose mobilité), ne possédant pas de granulations métachromatiques.

Tableau III : Diagnostic différentiel des espèces du genre Listeria.

	Groupe génomique	Serovars	Hémolyse	Camp test *S. aureus*	Camp test *R. equi*	D* xylose	L** rhamose	α methyl** D-mannoside	Reduction nitrate en nitrite	Mannitol	Pouvoir pathogène	Habitat
L. monocytogenes	1	1/2a, b, c, 3a, b, c 4a, ab, b, c, d, e 7	+	+	–	–	+	+	–	–	+	eaux – végétaux – selles de l'homme et des animaux
L. ivanovii	2	5	+	–	+	+	–	–	–	–	+ avortement chez le mouton	portage chez l'homme et les animaux
L. innocua	3	6a, b 4ab S.nb	–	–	–	–	d	+	–	–	–	eaux – végétaux – selles de l'homme et des animaux
L. welshimeri	4	6a, b	–	–	–	+	d	+	–	–	–	végétaux en décomposition
L. seeligeri	5	1/2b 4c, d,6b S.nd	+	+	–	+	–	–	–	–	–	environnement – aliments – intestin des animaux
L. grayi	HG	composition antigénique identique et différente des autres *Listeria*	–	–	–	–	–	n.d	–	+	–	féces des chinchillas habitat naturel inconnu
L. murrayi	HG		–	–	–	–	–	n.d	+	+	–	sol et végétaux

* en 1 à 4 jours
** en 1 à 2 jours
HG Hors groupe
S.nd Sérotype non déterminé

Figure 2 : Schéma dichotomique pour l'identification d'une souche bactérienne appartenant au genre Listeria (Listeria murrayi exclue).



La morphologie est variable puisque deux formes peuvent être rencontrées :

- des bâtonnets fins, courts, petits (coccoïdes), trapus, réguliers, de 0,4 à 0,5 µm de diamètre, de 0,5 à 2 µm de longueur, à extrémités arrondies, parfois incurvés ou effilés, seuls ou en paires ou en courtes chaînettes (3 à 5 bactéries) présentant un arrangement en palissade évoquant des Corynébactéries ou en V,

- des coques allongés, irréguliers, isolés, en diplo ou en courtes chaînettes, rappelant les Streptocoques et les Entérocoques.

Les cultures âgées donnent des formes filamenteuses se décolorant facilement et pouvant être confondues avec des cultures d'Haemophilus.

Dans les produits pathologiques, Listeria monocytogenes a l'aspect d'un bâtonnet assez court, trapu de 1 à 15 µm de long, extra ou intracellulaire.

Incluse dans le cytoplasme des grands mononucléaires, elle se dispose en amas enchevêtrés, en "paquet d'épingles".

KEELER et coll. (298) ont étudié la structure de la paroi et ont mis en évidence une fraction protéique, des sucres aminés et 5 amino acides ; ils pensent que le facteur lipidique isolé par STANLEY (531) et produisant une monocytose sanguine chez les animaux monogastriques serait également localisé à ce niveau.

De plus, CONKLIN et coll. (111) ont isolé, par extraction phénolique, un composé toxique pour l'embryon de poulet voisin d'une endotoxine et similaire au lipopolysaccharide de Salmonella abortus equi, agent d'avortement chez les animaux.

FIEDLER (190) a proposé un modèle macromoléculaire de l'organisation de la paroi cellulaire.

Des micrographes électroniques de celle-ci ont montré qu'elle était typique des bactéries Gram positif c'est-à-dire une fine structure homogène entourant la membrane cytoplasmique et sans membrane externe caractéristique des bactéries Gram négatif.

Les parois cellulaires isolées sèches sont constituées d'environ 35 % de peptidoglycane se composant d'acide méso-diaminopimélique.

Les hydrates de carbone sont essentiellement représentés par des acides téichoïques à savoir des polymères liés de façon covalente à un site spécifique du peptidoglycane.

Ces acides sont composés de glycérol ou de ribitol, de sucres neutres, de sucres N-acétylaminés et de phosphate.

Deux types d'acides téichoïques existent parmi les sérotypes de Listeria.

Dans les premiers, les résidus ribitol sont liés de façon covalente par des ponts phosphodiester entre C1 et C5 et sont parfois substitués par de la N-acétylglucosamine en C2 ; ce type est associé aux sérotypes 1/2a, b et c, 3a, b et c et 7.

Dans le second, la N-acétylglucosamine est intégrée dans la chaîne ; ce type est associé aux sérotypes 4a, b et d ; les parois cellulaires contiennent aussi des acides lipotéichoïques dans lesquels une moitié glycolipidique comme un diglycéride galactosyl-glucosyl est lié de façon covalente à un phosphomonoester terminal de l'acide téichoïque. Cette région lipidique relie la chaîne polymère à la membrane cytoplasmique.

Une protéine de la paroi cellulaire (P58) a été purifiée à partir de Listeria monocytogenes par extraction avec un détergent et chromatographie en gel puis caractérisée (33).

Elle a un poids moléculaire de 58 kDa, est fortement hydrophobe, contient des groupements thiol et est située partiellement à la surface des cellules bactériennes.

La production de cette protéine prédomine chez Listeria monocytogenes alors qu'elle est indétectable chez Listeria seeligeri et Listeria innocua.

Les souris qui survivent à l'infection listérienne expérimentale produisent des anticorps contre P58 ; cette protéine pourrait donc être utilisée comme marqueur pour le sérodiagnostic de la listériose.

V. CARACTERES CULTURAUX ET CROISSANCE. (336)

Divers facteurs ont été étudiés :

- la température : Listeria résiste et peut se développer au froid du fait de son caractère psychrophile.

La température optimale de culture est située aux alentours de 30-37°C mais Listeria peut se développer entre 4 et 45°C (350).

Selon AUDURIER et BERCHE, des cultures restent viables plusieurs mois à la température du laboratoire et plusieurs années à 4°C (336) ; la croissance à 4°C représente donc un intérêt pour l'isolement à partir des produits pathologiques.

Listeria est sensible à la chaleur et la pasteurisation la détruit bien que l'on ait des données contradictoires à ce sujet ; la destruction débute dès 55°C.

Listeria compte parmi les plus thermotolérants des germes non sporulés.

- le potentiel d'oxydoréduction : Listeria présente un métabolisme aéro-anaérobie facultatif avec une nette tendance à la microaérophilie.

Par contre, SEELIGER, BOJSEN MOLLER, SUC et MOATTI affirment que la croissance est plus abondante sous une tension réduite en oxygène et ils préconisent des cultures dans des conditions faiblement aérobies ou en atmosphère enrichie en gaz carbonique.

BUCHANAN et coll. (85) pensent que la présence d'oxygène, lors de l'incubation en aérobiose, inactive Listeria monocytogenes.

D'autres pensent que la présence d'oxygène permet à Listeria monocytogenes de supporter des pH acides (186).

- le pH : la croissance est obtenue entre pH 5,6 et 9,6 avec un optimum à pH neutre.

- l'activité de l'eau : Listeria peut se développer dans des milieux contenant 10 % de NaCl à pH 7 et à 25°C (359) et peut survivre pendant 15 jours dans 10,5 % de NaCl à 37°C (512), 1 an dans 16 % de NaCl à pH 6 (271), 8 semaines dans 20 % de NaCl à 4°C (504).

- les additifs : les nitrites (290) seuls ne peuvent pas inhiber Listeria mais l'association de 100 ppm de nitrites, de 3 % de NaCl et un pH de 5,5 à 4°C s'avère intéressante pour inhiber une culture de Listeria (83) (359) (360).

Listeria est sensible au propionate de sodium à 0,3 % (pH 5-5,6, 13 et 35°C) (168) et à 8 % (77), au benzoate de sodium de 0,8 à 1 % à 7°C (161), à 0,3 % (pH 5-5,6, 13 et 35°C) (163) (608), au sorbate de potassium à 1 % (76), 0,3 % à pH 5 ou 0,15 % à pH 5 (acide tartrique) (163) (167), au BHA (100 ppm), au BHT (300 ppm) et à la tertiobutylhydroquinone (TBHQ) (10 ppm) ; TBHQ est plus polaire que le BHA et le BHT donc une plus petite proportion est incorporée dans la phase lipidique des aliments (610).

- les intéractions :

. température - salinité : Listeria survit d'autant mieux en milieu hypersalé (25,5 % de NaCl soit Aw = 0,72) que la température est proche de 0°C (109) (359) (360) (512) .

. pH - salinité - nitrites : l'association semble diminuer le seuil inhibiteur de chacun d'eux utilisé seul (511).

. Listeria - flore compétitive : les bactéries lactiques (3) (41) (50) (124) (135) (136) (197) (244) (252) (253) (269) (340) (384) (413) (451) (480) (495) (496) (498) (525) (528) (554) (599) (611) et les carnobactéries (86) (87) (497) inhibent Listeria en occupant les mêmes niches écologiques ou en produisant des bactériocines à effet bactériostatique ou bactéricide mais Pseudomonas ne semble pas affecter la culture de Listeria (193) (380).

- les désinfectants : Listeria monocytogenes n'est pas un germe particulièrement résistant puisque des mesures simples de nettoyage - désinfection sont efficaces.

En effet, Listeria est sensible aux aldéhydes (557), aux produits chlorés (chlore (158), hypochlorite de sodium (330), disochlorine (557)), aux produits iodés, aux ammoniums quaternaires (198) (557), aux composés phénoliques (557) et aux alcools (557) dans les conditions habituelles de leur emploi (température, temps d'action, concentration) (405).

BEST et coll. (44), ont montré l'efficacité du gluconate de chlorhexidine, du glutaraldéhyde, de la chloramine-T, de l'acide phosphorique et du formaldéhyde.

Plusieurs formulations de décontamination ont été étudiées pour désinfecter des surfaces en polypropylène et en acier inoxydable (374) (376) artificiellement contaminées par Listeria monocytogenes à savoir (482) :

- une suspension pure de chaque listériaphage (H387, H387-A et 2671) de la famille des Siphoviridae,

- un mélange de quantités égales de ces 3 phages,

- 1 à 100 ppm de solution de désinfectant chimique ; le QUATAL (N-alkyldiméthyl-benzylammonium HCl 10,5 % et glutaraldéhyde 5,5 %),

- une combinaison de phages et de QUATAL.

Les résultats de ces expériences montrent que :

- les suspensions de phages à des concentrations de $3,5.10^8$ PFU/ml sont aussi efficaces qu'une solution à 20 ppm de composé ammonium quaternaire (QUATAL) dans la réduction des populations de Listeria monocytogenes,

- l'efficacité des 3 phages est équivalente sur les deux surfaces,

- le mélange des 3 phages présente une meilleure efficacité sur l'acier inoxydable que sur le polypropylène ce qui suggère un effet synergique des 3 phages quand ils sont utilisés en combinaison pour désinfecter les surfaces en acier inoxydable,

- le développement de résistance contre les bactériophages, phénomène bien connu, peut être minimisé ou évité en utilisant des mélanges de 2 ou plusieurs phages ayant un mode d'infection des cellules bactériennes différent,

- les combinaisons de deux ou plusieurs phages ou les suspensions phages-QUATAL présentent une activité synergique donc l'utilisation des listériaphages en combinaison avec un désinfectant chimique peut améliorer le taux de destruction de Listeria monocytogenes ; la combinaison d'un désinfectant biologique et d'un désinfectant chimique apparaît donc plus efficace que l'utilisation de chacun individuellement,

- une concentration en QUATAL de 50 ppm est nécessaire à la destruction totale de toutes les souches sur surfaces en acier inoxydable et en polypropylène,

- la suspension listériaphage-QUATAL est plus efficace pour inactiver les cellules Listeria sur surfaces en acier inoxydable que sur polypropylène,

- l'activité biologique des 3 phages n'est pas affectée par des concentrations en QUATAL de 50 ppm et un temps de contact de 4h mais des concentrations de 75 à 100 ppm réduisent les titres phagiques,

En raison de leur spécificité élevée, les bactériophages ont des impacts minimes sur l'écologie microbienne des aliments, des matériaux de fabrication et de l'environnement et l'efficacité des composés chimiques peut être influencée par des facteurs de l'environnement comme le pH, les résidus organiques, la dureté de l'eau et la température.

De ce fait, l'addition de listériaphages à un composé ammonium quaternaire permet de réduire la concentration des produits chimiques pour détruire la population entière des cellules de Listeria contaminantes.

La combinaison d'un agent chimique avec des bactériophages apparaît donc être un moyen de réduire la concentration en composés dangereux pour l'environnement tout en maintenant la même activité désinfectante envers Listeria monocytogenes.

L'effet synergique observé des listériaphages et de QUATAL montre donc une voie d'accés prometteuse dans l'amélioration du niveau de destruction.

Mais, des travaux supplémentaires doivent être faits pour optimiser les conditions physiques et chimiques et améliorer l'efficacité de cette nouvelle approche de biodésinfection.

- les antibiotiques : Listeria monocytogenes est sensible à de nombreux antibiotiques notamment la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline.

Peu de résistance a été démontrée.

Listeria monocytogenes n'est pas modifiée par la dessiccation et par la lumière.

Elle cultive en présence de 40 % de bile, de 0,5 % de tellurite de potassium, de polymyxine et d'acide nalidixique mais pas en présence de citrate de sodium.

L'adjonction de glucose (443) favorise la culture.

En effet, toutes les espèces se développent en présence de glucose et par voie aérobie forment de l'acide lactique et/ou de l'acide acétique alors que la voie anaérobie ne donne lieu qu'à la formation d'acide acétique.

Au cours de l'incubation aérobie, de petites quantités d'acide isovalérique, d'acide 2-hydroxyisovalérique et des traces d'acide isobutyrique sont formées.

L'ajout de leucine stimule la formation d'acide isovalérique.

Les fermentations anaérobies du glucose sont suivies de 60 à 80 % de lyse cellulaire mais celle-ci est moins importante en condition aérobie.

Par voie anaérobie, seuls les hexoses et les pentoses favorisent la croissance tandis que par voie aérobie, le maltose et le lactose favorisent la croissance de certaines souches mais le saccharose ne favorise pas la croissance de l'ensemble des souches.

Listeria grayi et Listeria murrayi utilisent les galactose et glucose pour leur croissance alors que Listeria monocytogenes et Listeria innocua n'utilisent que le glucose.

La glucosamine, la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétyl muranique favorisent les croissances aérobie et anaérobie, tout comme le glucose et leur présence stimule l'utilisation du lactose par les souches "lactose-négatives".

La croissance en présence de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl muranique, composés des parois cellulaires bactériennes et fongiques, suggère que la digestion des bactéries et des champignons présents dans les aliments peut permettre la colonisation et la survie de Listeria monocytogenes dans ces aliments en raison de la capacité de Listeria monocytogenes à utiliser le tréhalose et le cellobiose des champignons.

Le glucose, la caséine, la chitine et les parois cellulaires bactériennes (Lactococcus lactis) permettent la survie.

Il a été suggéré que Listeria monocytogenes puisse digérer les parois cellulaires de la microflore secondaire et obtenir le carbone et l'énergie durant la colonisation des aliments.

L'étude des besoins nutritionnels et métaboliques de Listeria monocytogenes montre que les acides aminés tels que la leucine, l'isoleucine, la valine et la cystéine sont indispensables et que la présence d'ions Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} et l'adjonction de thioglycolate sont nécessaires (456).

Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, lisses, translucides, petites (moins de 1 mm de diamètre), dites smooth mais après quelques jours elles s'élargissent, s'opacifient (type rough).

La méthode de HENRY (261) en transillumination oblique permet d'observer des colonies de coloration bleu-vert.

Sur gélose au sang, les colonies sont lisses, légèrement bombées et présentent une zone d'hémolyse de type β.

En milieu liquide, Listeria donne un trouble intense et homogène.

VI. STRUCTURE ANTIGENIQUE. (336) (Tableaux IV et V)

En 1935, SEASTONE puis JULANIELLE et PONS ont divisé le genre Listeria en deux groupes sérologiques : le type I isolé chez les rongeurs et le type II isolé chez les mammifères.

En 1940, PATERSON l'a divisé en quatre types sérologiques en se basant sur l'étude des antigènes somatiques 0 et flagellaires H ; les types 1, 3 et 4 diffèrent par l'antigène 0 et le type 2 a un antigène H différent.

Enfin, SEELIGER (505) (506) et DONKER-VOET (147) ont complété ce schéma antigénique par l'introduction de nouveaux types pour aboutir à la classification actuelle.

Les acides téichoïques de la paroi représentent les antigènes somatiques 0 au nombre de 15 et numérotés de I à XV.

Les cils confèrent à la bactérie une propriété antigénique H dont 5 antigènes ont été individualisés et auxquels on attribue les lettres A, B, C, D, E.

La combinaison des deux types antigéniques 0 et H définit le sérovar complet de la souche.

On distingue actuellement 18 sérovars à savoir 1/2 (a, b, c), 3 (a, b, c), 4 (a, ab, b, c, d, e, f, g), 5, 6 (a, b), 7 dont certains sont spécifiques d'une espèce donnée comme le sérovar 5 qui est spécifique de Listeria ivanovii.

L'antigène flagellaire E est spécifique de Listeria grayi et Listeria murrayi.

Les sérovars 1/2a, 1/2b et surtout 4b sont le plus souvent rencontrés en France chez l'homme.

Il n'y a pas de rapport entre un sérovar particulier et son origine géographique.

Des antigènes communs existent entre Listeria, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis et Bacillus.

Ce sérotypage est réalisé par agglutination sur lame au moyen d'antisérums spécifiques et complété du lysotypage.

Le gène flaA (152) codant pour la protéine flagellaire de Listeria monocytogenes a été isolé en utilisant un anticorps monoclonal spécifique de flagelle.

L'analyse de la séquence ADN d'un clone positif révèle la présence d'une zone de lecture ouverte de 287 acides aminés de masse moléculaire 30,4 kDa.

La comparaison de cette séquence avec les flagelles d'autres bactéries montre un degré significatif d'homologie aux extrémités N et C de la protéine.

L'ARNm flagellaire a une taille de 1 kb, taille attendue pour un ARNm monocistronique et l'expression dépendante de la température des flagelles est régulée au niveau transcriptionnel.

Tableau IV : Sérovars de Listeria monocytogenes et des espèces voisines (506).

Désignation		*Antigènes O*												*Antigènes H*				
Paterson	*Seeliger et Donker-Voet*																	
1	1/2 a	I	II	(III)										A	B			
	1/2 b	I	II	(III)										A	B	C		
2	1/2 c	I	II	(III)											B		D	
3	3 a		II	(III)	IV									A	B			
	3 b		II	(III)	IV							(XII)	(XIII)	A	B	C		
	3 c		II	(III)	IV							(XII)	(XIII)		B		D	
4	4 a			(III)		(V)		VII		IX				A	B	C		
	4 ab			(III)		V	VI	VII		IX	X			A	B	C		
	4 b			(III)		V	VI							A	B	C		
	4 c			(III)		V		VII						A	B	C		
	4 d			(III)		(V)	VI		VIII					A	B	C		
	4 e			(III)		V	VI		(VIII)	(IX)				A	B	C		
Listeria ivanovii	5			(III)		(V)	VI		(VIII)		X			A	B	C		
	7 ?			(III)								XII	XIII	A	B	C		
Listeria innocua (a)	6 a (4 f)			(III)		V	(VI)	(VII)		(IX)							XV	A B C
	6 b (4 g)			(III)		(V)	(VI)	(VII)		IX	X	XI						A B C
M. gravi subsp *gravi*				(III)								XII	XIV					E
M. gravi subsp *murrayi*				(III)								XII	XIV					E

(a) D'autres combinaisons sont connues.

Tableau V : Répartition des différents sérovars.

	L.monocytogenes	L.ivanovii	L.innocua	L.welshimeri	L.seeligeri	L.murravi L.gravi
serovar	1/2 (a,b,c) 3 (a,b,c) 4 (a,ab,b,c,d,e) 7	5	6 (a,b) 4 (ab) S.nd	6 (a,b)	1/2b 4 (c,d) 6b S.nd	composition antigénique identique mais différent des autres L.

S.nd : sérotype non déterminé

VII. BACTERIOCYNOTYPIE. (336)

Listeria monocytogenes élabore des bactériocines appelées monocines de HAMON (122) (240) (326) (427) ; cela permet d'envisager une bactériocynotypie.

Ces monocines sont également actives sur d'autres souches de Listeria, sur certains Bacillus aureus, Bacillus mycoïdes et sur certains Microcoques.

Des bactériophages (279) (539), isolés de souches lysogènes, sont utilisés pour la lysotypie (12) (13) (14) (426) (470) (474) (475).

Un lot de 29 bactériophages a permis de reconnaître des lysotypes (370) (371).

Cette méthode se révèle être efficace pour déterminer l'origine de certains foyers épidémiques.

La lysotypie doit être précédée de la sérotypie car les phages ont une activité lytique spécifique de sérovar.

Malheureusement, elle n'a pas permis d'établir de relation phagovar - sérovar - hôte - origine géographique.

3ème PARTIE :

EPIDEMIOLOGIE

I. CARACTERISTIQUES GENERALES. (477)

I. 1. INCIDENCE. (463) (476)

La listériose est une maladie relativement peu fréquente avec 10 à 15 cas par million d'habitants.

En 1984, l'analyse de GOULET et coll. (228) a permis d'estimer à 1,13 pour 100000 habitants la fréquence de cette maladie alors que l'étude de RALOVICH (457) l'estime à 0,327.

Mais depuis 1986, il semblerait que l'incidence fléchisse et ceci peut-être grâce aux efforts des réseaux de surveillance et de prévention ; cela est encore trop tôt pour l'affirmer.

En effet, le nombre de cas pour 100000 habitants était de 2 en 1986, de 1,6 en 1987, de 1,5 en 1988 et 1989 et de 1,1 en 1990.

Ce fléchissement concerne essentiellement les formes materno-néonatales dont l'incidence est passée de 67 en 1986 à 30 en 1990.

Mais les femmes enceintes sont toujours une cible privilégiée puisqu'elles ont un risque de développer la maladie multiplié par 40 à 75 par rapport au reste de la population.

L'incidence des formes non materno-fœtales a peu diminué puisqu'elle est passée de 1 à 0,74 entre 1986 et 1990.

Par contre, l'incidence est particulièrement élevée chez les sujets immunodéprimés avec 13 pour les cancéreux et 200 pour les transplantés en 1987 soit des risques multipliés respectivement par 17 et 250 par rapport à la population générale.

Chez les sujets sans immunodépression connue, l'incidence varie de 0,2 à 0,4 en 1987 et 1988.

Elle augmente avec l'âge avec 1,4 chez les sujets âgés de 65 ans et plus mais reste beaucoup plus faible que dans les autres catégories à risque.

Aux Etats-Unis, elle était de 0,7 cas pour 100000 habitants en 1986 et 0,74 entre 1989 et 1990.

Au Canada, elle varie de 0,17 à 0,23 selon les années entre 1987 et 1990.

Au Danemark, elle varie de 0,2 à 0,8 selon les années entre 1981 et 1990.

En Suisse, elle a chuté de 5 durant l'épidémie de 1983-1987 à 0,3 en 1990.

I. 2. MORTALITE. (477)

La listériose est l'infection d'origine alimentaire entachée de la plus forte létalité avec un taux de 30 % environ.

Les séquelles neurologiques sont souvent à redouter chez les sujets ayant souffert de méningite, de méningo-encéphalite ou surtout d'encéphalite.

Aux Etats-Unis, LUCHANSKI et coll. (352) ont signalé qu'entre 1973 et 1987, Listeria monocytogenes a été la seconde cause de décès dûs aux infections à transmission alimentaire derrière les Salmonelles (respectivement 25 et 32 %).

I. 3. DUREE D'INCUBATION. (463) (477)

Elle est variable et estimée entre 1 et 90 jours avec une médiane de 35 jours, soit de 1 à plusieurs semaines.

Cela soulève à nouveau la possibilité que la maladie clinique soit déclenchée chez un porteur de germes par une cause telle qu'une infection virale intercurrente.

I. 4. DOSE INFECTANTE. (236) (477)

On ne sait pratiquement rien sur la dose minimale infectante et il n'y a pas non plus d'étude quantitative fiable sur la corrélation entre la quantité de nourriture contaminée absorbée et le risque infectieux.

Il est vraisemblable qu'elle dépende de la réceptivité de l'hôte (463) et de la nature même de l'aliment. Cela reste à vérifier.

I. 5. FACTEURS DE RECEPTIVITE.

La listériose résulte de plusieurs facteurs à savoir :

- le sexe ; on peut effectivement observer :

  . une faible prédominance de garçons touchés de la naissance à 1 an,

  . une égalité chez les enfants et les adolescents,

  . peu d'hommes du fait de la listériose materno-fœtale entre 20 et 40 ans,

  . deux périodes à partir de 41 ans :

    - une prédominance d'hommes de 41 à 70 ans,

    - une égalité de 71 à 100 ans.

- l'âge :

  . le pic des nouveau-nés et nourrissons reste de loin le plus important,

  . la listériose maternelle est prédominante de 21 à 40 ans,

  . la listériose de l'enfant et de l'adolescent reste rare de 2 à 20 ans,

. la listériose de l'adulte et du sujet âgé reste fréquente et d'autant plus que l'âge augmente.

La néonatalité et la vieillesse majorent la réceptivité et la gravité de l'infection à cause de l'immaturité immunologique du nouveau-né et de la diminution des moyens de défense des sujets vieillissants.

- les conditions de vie :

. l'habitat : la maladie semble plus fréquente chez les personnes dont les conditions d'habitat et d'hygiène sont précaires,

. la profession : certaines professions semblent plus exposées à savoir les vétérinaires, les éleveurs, les tanneurs, les agriculteurs, les éboueurs, les gardes-chasse, les équarrisseurs et les employés d'abattoirs, de fromageries, de cuisine.

- le rôle du terrain :

. au cours des états physiologiques : la grossesse est un facteur favorisant mais pas de gravité chez la femme puisque peu de méningites ont été enregistrées chez la femme enceinte.

En effet, la grossesse, par les profondes modifications métaboliques et endocriniennes qu'elle entraîne dans l'organisme, peut devenir un terrain favorisant le développement de Listeria monocytogenes ; de plus, le placenta est sans doute un foyer favorable à la multiplication bactérienne.

La contamination peut se produire pendant la grossesse ou même lui être antérieure et c'est à la faveur de la gravidité que la virulence de Listeria monocytogenes, présente à l'état quiescent dans le tractus génital, s'exalterait.

. au cours des états pathologiques : l'existence d'une maladie antérieure ou d'une infection peut favoriser l'éclosion d'une listériose et contribuer à sa gravité.

- les affections hépatiques : l'éthylisme semble être un facteur non négligeable du fait de l'hypochlorhydrie présente chez les alcooliques (156) d'où leur réceptivité particulière,

- les maladies métaboliques comme le diabète (419),

- le SIDA,

- les infections bactériennes : des bactéries pathogènes comme Mycobacterium tuberculosis, Salmonella typhimurium et les espèces appartenant au genre Cephalosporium peuvent sensibiliser un sujet à Listeria monocytogenes.

- les infections virales : la listériose peut être la maladie de sortie de certaines viroses comme la grippe, la varicelle, la rougeole ou l'hépatite virale (552).

Elle est une complication de la mononucléose infectieuse (322) et non l'agent responsable comme on l'avait cru au départ.

- les hémopathies, réticulopathies et tumeurs bégnines diminuent la résistance à Listeria monocytogenes.

- le rôle de certaines thérapeutiques :

  . la corticothérapie exalte la virulence de Listeria monocytogenes (234),

  . les malades traités par les immunodépresseurs au cours de greffes rénales sont très sensibles aux bactéries opportunistes dont Listeria monocytogenes (415),

  . les radiations ionisantes ont une incidence sur l'apparition des listérioses (534),

. la chlortétracycline administrée au cobaye entraîne une modification de la flore intestinale d'où la prolifération de Listeria monocytogenes.

I. 6. REPARTITION. (Annexe II)

I. 6. 1. DANS L'ESPACE GEOGRAPHIQUE.

La listériose semble plus fréquente dans les pays industrialisés (Europe, Amérique du Nord) que dans les régions tropicales.

Par contre, on ne sait pas si cette maladie existe mais n'est pas diagnostiquée ou si elle n'existe pas dans les pays en voie de développement.

En Allemagne, elle appartient aux maladies à déclaration obligatoire.

En France, la répartition géographique étudiée par le Centre National de Référence des Listeria de Nantes montre que l'Ile de France et Rhône-Alpes, régions les plus peuplées, restent les principaux fournisseurs de souches.

Mais, l'examen de la répartition des principaux sérovars parmi les souches isolées dans les diverses régions montre que celle-ci n'est pas homogène avec une prédominance générale du sérovar 4b.

I. 6. 2. DANS LE TEMPS.

Il semble que la listériose obéisse à des fluctuations périodiques :

- selon les saisons : on observe des prédominances printanières et automnales.

- selon les années : une certaine périodicité a été décrite aux Etats-Unis et en Hongrie tous les 2 à 4 ans.

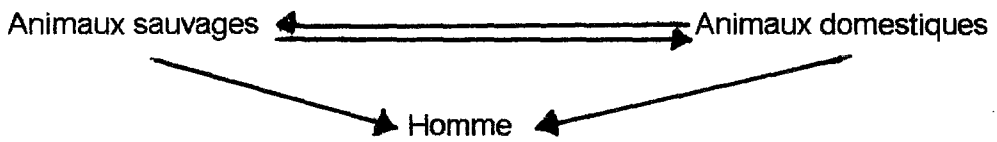
Il est à noter que depuis 1985, une augmentation notable de la réception des souches au Centre de Référence des Listeria est apparue avec 408 souches en 1985, 1276 en 1986, 1719 en 1987, 3103 en 1988.

Par contre, on observe une diminuation du nombre de souches à partir de 1989 avec 1713 en 1989, 1647 en 1990 et 1455 en 1991 ; ceci est dû à la saturation des capacités du Centre donc seul le nombre de souches traitées est donné mais le Centre en a reçues beaucoup plus.

En 1992, le Centre a dû faire face à un accroissement des envois de souches du fait de l'épidémie ; il en a traitées 2060.

II. RESERVOIRS.

Pendant longtemps, l'épidémiologie de la maladie s'est résumée au schéma simple d'une anthropozoonose ; le règne animal représentant dans ce cas le seul réservoir.



L'animal infecté peut être source de contamination par les excréta (urine et fèces), par les sécrétions des muqueuses atteintes (génitales, conjonctivales, rhinopharyngées) mais aussi par les produits alimentaires.

De nos jours, la listériose ne peut plus être considérée comme une zoonose ; on considère donc d'autres sources de contamination.

II. 1. L'ENVIRONNEMENT.

Du fait de la grande résistance de Listeria monocytogenes aux agents biologiques, chimiques et physiques, le milieu extérieur constitue un réservoir important où la survie de Listeria monocytogenes est étonnante.

Listeria monocytogenes est largement distribuée dans l'environnement puisqu'on la retrouve dans l'eau de rivière ou d'effluents, la paille, les produits d'ensilage, le fumier, les plantes, le fourrage, la terre, les boues, les poussières, probablement contaminés par les déjections d'origine animale.

L'étude de COX et coll. (119) montre que la contamination de l'environnement peut être hiérarchisée comme suit :

- égouts, siphons de sol, orifices d'évacuation des eaux résiduaires : 54 %,
- eaux stagnantes, condensats : 40 %,
- sols : 45 %,
- déchets : 33 %,
- matériels : 19 %,
- autres : 17 %.

La charge est d'autant plus importante que le milieu est humide et qu'il subsiste des nutriments issus d'un nettoyage incorrect.

En ce qui concerne la contamination d'un environnement domestique, il ressort d'une étude faite aux Pays-Bas que la contamination touche 17 % des lavettes, 6 % des sacs à poussières des aspirateurs, 3 % des parois des compartiments légumes de réfrigérateur (97).

Listeria monocytogenes est présente dans le sol, mais il n'a pas été prouvé qu'elle pouvait s'y multiplier.

Une question reste en suspens ; Listeria monocytogenes est-elle un hôte normal de la flore tellurique ou bien y a t'elle été introduite par les réservoirs humains ou animaux ?

I. 2. LES DENREES ALIMENTAIRES.

L'ensemble des aliments peut être contaminé pour deux raisons ; d'une part, Listeria est un germe ubiquitaire largement répandu dans l'environnement, qu'il s'agisse de la terre, de la végétation ou encore des eaux d'égouts mais aussi dans le contenu intestinal et d'autre part, elle est résistante aux conditions du milieu extérieur et plus particulièrement, elle est capable de se multiplier à des températures aussi basses que 4°C.

Sont contaminés :

- les œufs : la contamination peut s'effectuer au cours de la septicémie listérienne du poulet, accompagnée de lésions nécrotiques de l'oviducte ; ils sont un bon vecteur.

KAMPELMACHER (294) a isolé Listeria monocytogenes de 29 % des fèces d'individus apparemment sains, travaillant dans un élevage industriel de production d'œufs.

- le lait et les produits laitiers constituent un réservoir important : GRAY (336) a rapporté que sur 652 vaches ayant eu un avortement listérien, 53 avaient éliminé des bacilles dans le lait.

De plus, la localisation intra-mammaire de Listeria monocytogenes peut passer inaperçue sans manifestation inflammatoire organique.

C'est ainsi que des fromages ont été incriminés dans des épisodes de listériose.

- les viandes, salaisons et carcasses de volailles et d'autres animaux sont considérés comme des vecteurs de listériose car les animaux en cause peuvent héberger Listeria dans les cas de septicémie avec localisation pluriviscérale.

II. 3. LES MALADES.

Presque toutes les sécrétions ou excrétions des malades à savoir les liquides fœto-maternels, le LCR dans les méninges, les urines, les fèces souvent bacillifères, les sécrétions des muqueuses conjonctivales et rhinopharyngées mais aussi les lésions cutanées de l'enfant et les placentas représentent un danger en tant que sources probables de contamination.

II. 4. LES PORTEURS DE GERMES CHRONIQUES, CONVALESCENTS OU SAINS.

Des femmes sous traitement et présentant des avortements listériens ont éliminé des Listeria pendant au moins 20 semaines (460).

Certains sujets atteints de formes atypiques constituent un réservoir important.

On dénombre également beaucoup de porteurs sains comme des femmes dont la grossesse sert de révélateur à une listériose inapparente, du personnel d'abattoir, de fabrication de produits de charcuterie et de laboratoires.

Ceci est dû au fait que Listeria monocytogenes peut vivre à l'état commensal dans le tube digestif, le rhinopharynx et l'appareil génital.

Le portage sain chez l'homme varie de 0,6 à 44 % des sujets examinés.

Des animaux sains, non seulement domestiques (ovins, bovins, porcs, poulets) mais aussi sauvages sont également porteurs de germes dans les sécrétions nasales et les matières fécales ; le taux de portage est de 10 à 30 %.

La listériose ne serait donc pas une anthropozoonose comme on l'avait cru mais une maladie hydrotellurique ou une sapronose du fait du caractère ubiquitaire et saprophyte de ce germe facultativement pathogène.

III. MODES DE CONTAMINATION. (Schémas 1, 2, 3)

Ils sont au nombre de deux. (386)

III. 1. CONTAMINATION DIRECTE.

Il s'agit du mode le moins fréquent car ceci suppose que la listériose soit une maladie contagieuse avec transmission par contact direct avec l'individu malade.

III. 1. 1. CONTAGION INTER HUMAINE.

C'est le cas de la listériose congénitale où la transmission est verticale et se fait selon quatre mécanismes :

- la voie hématogène transplacentaire à la suite de l'infection de la mère dans les mois précédant l'accouchement.

Dans ce cas, Listeria monocytogenes gagne le placenta puis le fœtus par la voie sanguine et entraîne la naissance d'un enfant prématuré septicémique.

- l'origine endométriale est la plus fréquente ; le point de départ est un abcès rétroplacentaire pouvant rester quiescent ou se compliquer d'une placentite miliaire ce qui entraîne une infection grave du fœtus ou du nouveau né.

- la voie ascendante transmembranaire avec un point de départ cervico-vaginal puis Listeria monocytogenes pénètre dans la cavité amniotique que les membranes soient rompues ou non.

- la contamination durant l'accouchement lors de la traversée des voies génitales contaminées ou par déglutition ou inhalation de matières virulentes au cours de l'expulsion.

WENKEBACH (583) a rapporté un cas de contamination vénérienne où Listeria monocytogenes a été isolée de l'urètre de cinq hommes ayant eu une partenaire commune.

Des cas d'infections nosocomiales en maternité et nourricerie ont été rapportés ; dans ce cas, la listériose prend le visage d'une infection croisée néonatale (323).

Le schéma est le suivant : un premier enfant naît d'emblée très infecté et un deuxième enfant né quelques heures avant ou après le premier manifeste, dans les jours qui suivent sa naissance, les signes d'une listériose méningée.

Dans ce type d'infection, les modes de contamination sont de deux ordres :

- une transmission directe par contact entre nouveau-nés (couveuse de transport commune), par contact entre une mère infectée et un nouveau-né sain ou par les actes médicaux (accouchement dans la même salle, enfants soignés dans la même nourricerie),

- une transmission indirecte par le matériel utilisé en salle de travail (sonde de désobstruction ou d'aspiration à usages multiples, thermomètre non désinfecté, couveuse).

Une infection nosocomiale à Listeria monocytogenes 4b est survenue en janvier 1991 dans une maternité de Grenoble (280).

Les trois enfants impliqués sont nés dans un intervalle de 24 h.

Le prématuré à l'origine de la contamination était asymptomatique.

Deux autres nouveau-nés sans risque infectieux périnatal ont présenté une méningite, l'un à 5 jours de vie à la maternité, l'autre à 11 jours de vie.

Les trois souches isolées présentaient les mêmes sérovar et lysovar.

L'enquête épidémiologique a fait suspecter une contamination en salle de prise en charge néonatale et lors des soins aux enfants.

La transmission s'est effectuée en deux étapes : une première au moment de l'accouchement ou juste en post-partum entre un enfant infecté et un autre sans risque infectieux ; une deuxième entre ce deuxième enfant incubant sa listériose en cours d'hospitalisation, devenant porteur, et un troisième contaminé en fin d'hospitalisation et incubant sa listériose à son retour à domicile.

Le respect des consignes d'hygiène à tous les stades de l'hospitalisation est donc indispensable pour éviter ce genre d'infection.

III. 1. 2. CONTAGION INTER ANIMALE.

Il s'agit de la listériose congénitale animale et d'enzootie d'amplitude variable chez les animaux vivant en groupe comme la méningo-encéphalite des moutons pouvant affecter 1 à 2 % de l'effectif et la listériose des poulets pouvant atteindre 30 % de l'élevage.

III. 1. 3. TRANSMISSION DE L'ANIMAL A L'HOMME.

Elle est démontrée chez des ouvriers agricoles en contact avec des avortons et des membranes fœtales lors de la parturition ou chez des vétérinaires qui ont effectué des manœuvres obstétricales ou pratiqué des avortements.

III. 2. CONTAMINATION INDIRECTE.

C'est le mode le plus fréquent.

L'homme peut se contaminer par :

- le milieu extérieur : sol, poussière, fumier,

- les sécrétions et excrétions animales : membranes fœtales, fèces,

- les productions animales et les aliments contaminés ; c'est la transmission alimentaire ; différents aliments ont été la source d'épidémies.

Schéma 1 : Schéma épidémiologique des listérioses selon KUBASIAK (315).

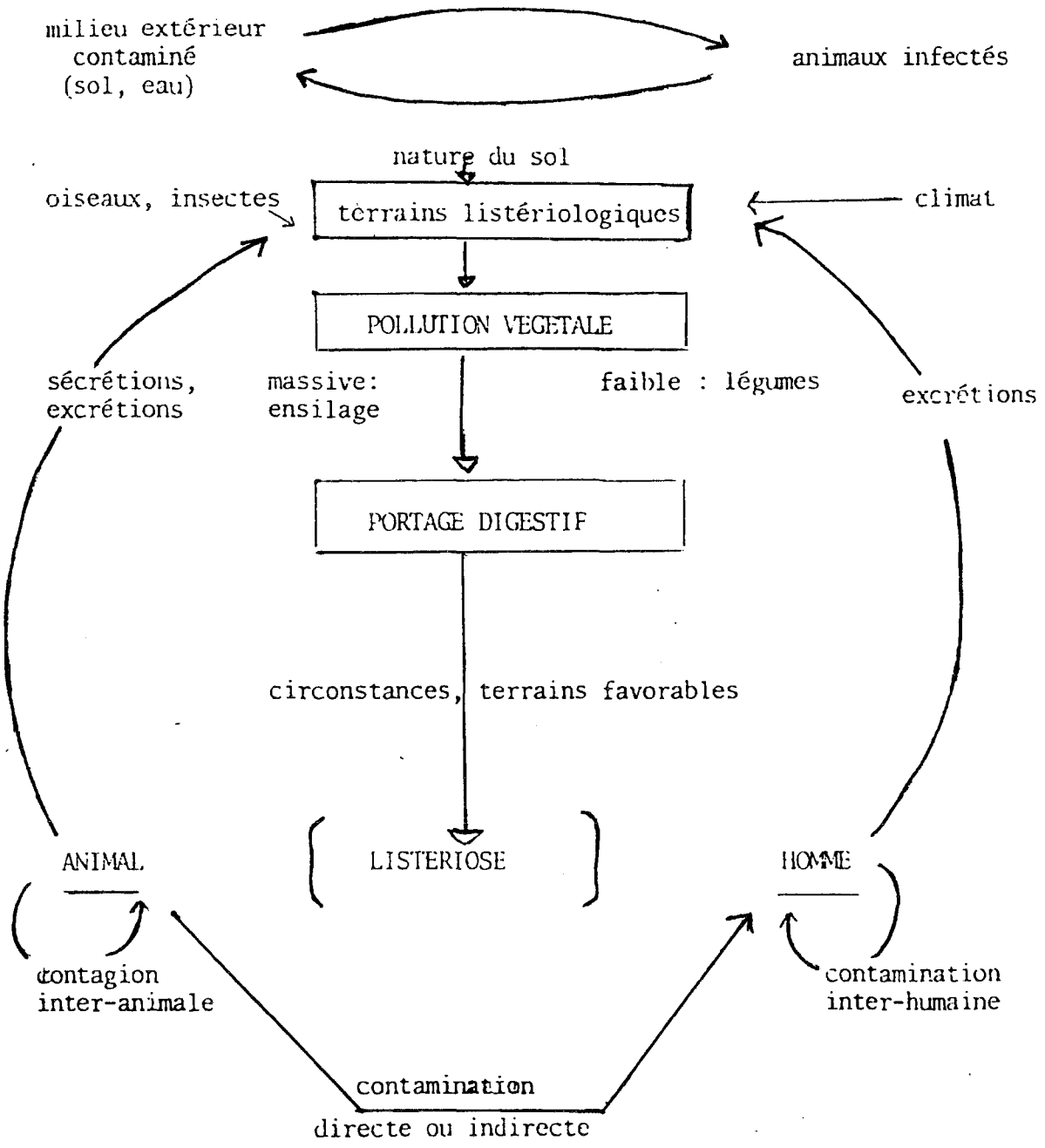


Schéma 2 : Schéma épidémiologique des listérioses d'après HUMBERT et AUBERTIN (274).

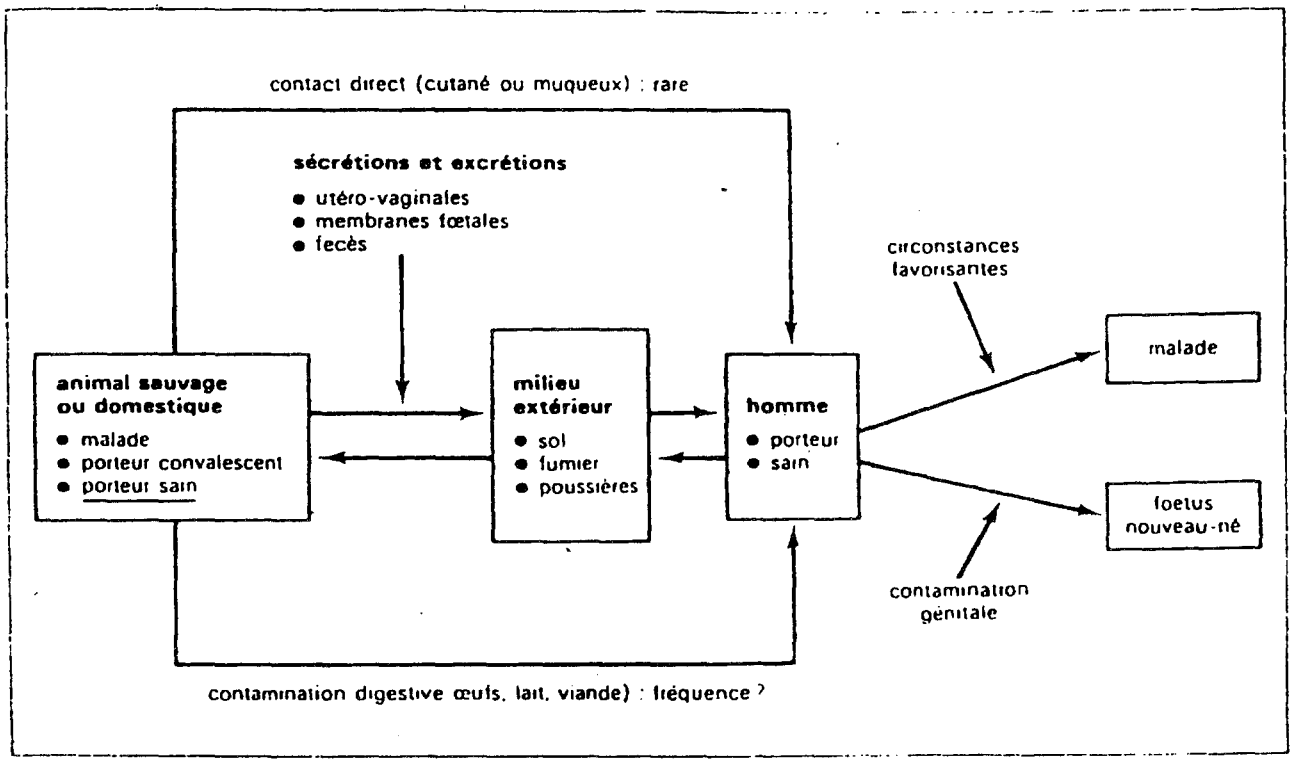
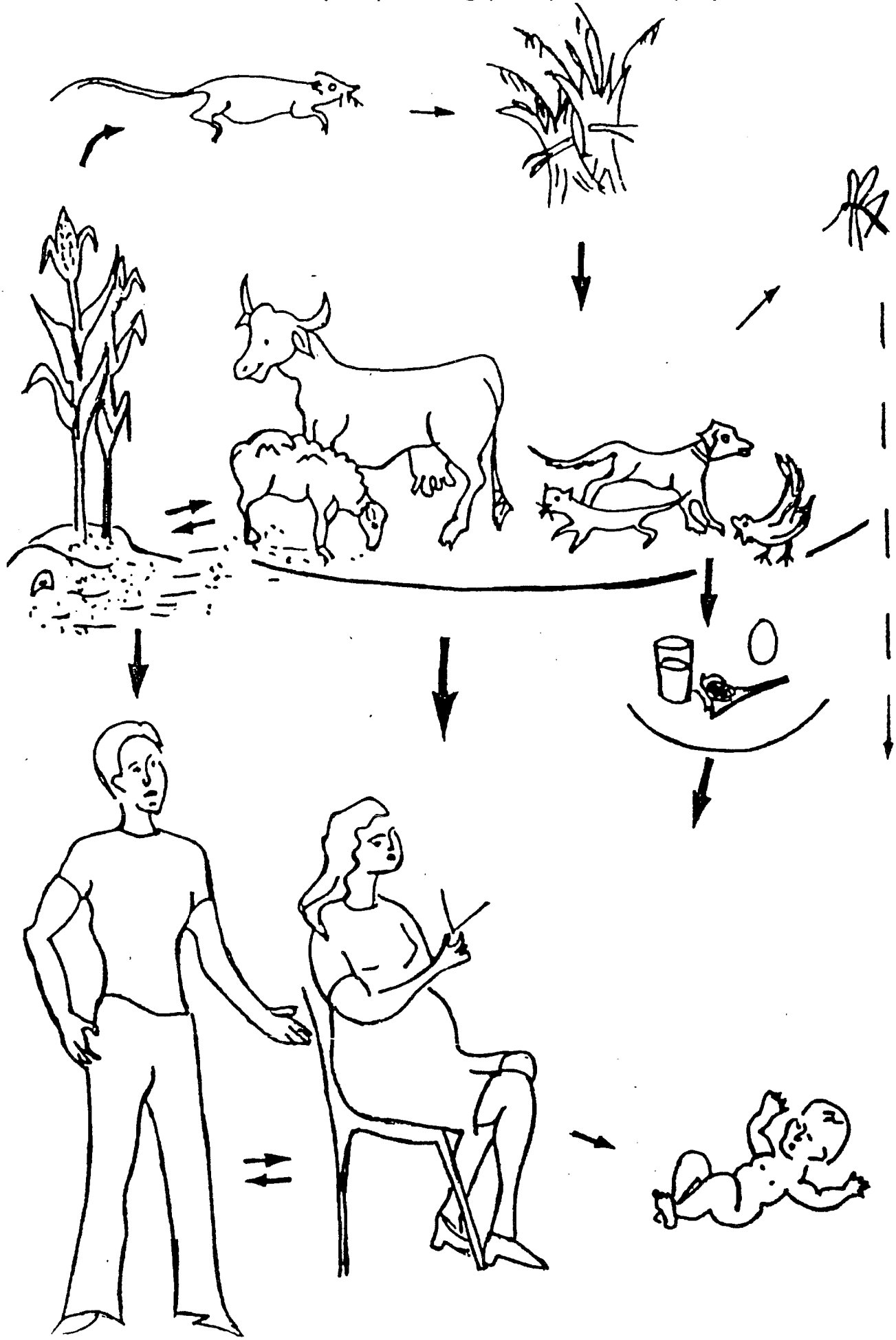


Schéma 3 : Cycle épidémiologique d'après PEREZ (436).



IV. EVOLUTION. (477)

Les modifications du mode de vie survenue depuis 1960, caractérisées notamment par un développement sans précédent de la chaîne du froid qui favorise non seulement la survie mais également la croissance de Listeria monocytogenes dans les denrées alimentaires sont incontestablement responsables, dans une grande proportion, du nombre de cas de listériose.

De plus, l'augmentation du nombre de cas de listériose observée depuis 1960 est vraisemblablement liée en partie à un meilleur recensement du nombre de cas.

IV. 1. SURVEILLANCE.

De nombreux pays industrialisés ont instauré des systèmes de surveillance qui ont pour mission :

- d'évaluer l'incidence annuelle,

- de détecter la survenue d'épidémies,

- de rechercher l'origine alimentaire de ces infections.

IV. 1. 1. EN FRANCE. (Annexe III)

En France, la surveillance est assurée par l'intrication de trois Ministères ; Santé, Agriculture et Finances et de deux Centres de Référence : celui de Nantes qui assure la sérotypie des souches et celui de Paris (Institut Pasteur) qui effectue la lysotypie.

Elle se fait ainsi :

- les bactériologistes signalent les cas au médecin de la DDASS dès l'isolement d'une Listeria monocytogenes et envoient la souche pour sérotypage et lysotypage aux deux Centres concernés.

- le médecin de la DDASS réalise l'enquête cas-témoin rétrospectivement portant sur l'alimentation du mois précédant la date de l'isolement de Listeria monocytogenes.

Deux témoins sont appariés au malade sur l'âge, le sexe, le lieu de domicile et le type de pathologie sous-jacente ou sur le terme de la grossesse.

- la DDASS prévient les services vétérinaires (DSV) et les services de la répression des fraudes (DDCCRF).

- la DSV réalise des prélèvements au domicile du malade et la DDCCRF dans les magasins d'alimentation où le malade effectue habituellement ses achats.

Le résultat du typage est communiqué secondairement à la DDASS.

Les informations collectées (questionnaires, résultats de prélèvements microbiologiques) sont analysées et recoupées au niveau d'une cellule de crise (Laboratoire National de la Santé, Centres Nationaux de Référence, Direction Générale de la Santé, Direction Générale de l'Alimentation, Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes) afin d'orienter les investigations ultérieures.

IV. 1. 2. DANS LES AUTRES PAYS.

La surveillance est pratiquée :

- en Europe : Allemagne, Belgique, Bulgarie, Danemark, Espagne, Finlande, Grande-Bretagne, Italie, Pays-Bas, Suède, Suisse et Yougoslavie.

- en Amérique du Nord et du Sud : Argentine, Brésil, Canada et Etats-Unis.

- en Océanie : Australie et Nouvelle-Zélande.

- en Afrique et en Asie : Pakistan et Afrique du Sud.

La plupart des pays envoient leurs souches à leur Centre de Référence pour le sérotypage, quand celui-ci existe ; le lysotypage étant effectué à Paris à l'Institut Pasteur pour certains d'entre eux ; les autres ayant leur propres structures.

IV. 2. CAS SPORADIQUES. (476)

La listériose évolue essentiellement sous forme de cas sporadiques ; dans ce cas, il est difficile d'en identifier l'origine.

Mais, certains aliments ont été incriminés comme des fromages, des produits carnés (poulet insuffisamment cuit, dinde cuite au micro-ondes, hot dog cru, saucisses), des champignons salés, une tablette de luzerne ou des poissons.

Ce furent les rares cas où une denrée contaminée par la même souche que celle ayant provoqué l'infection a pu être retrouvée dans le réfrigérateur du patient.

Il ne faut pas négliger une contamination croisée à l'intérieur du réfrigérateur ce qui rend l'identification de l'aliment encore plus difficile.

En France, HUMBERT et coll. (275) n'ont recensé que 1021 cas entre 1970 et 1975 alors que GOULET et coll. (229) en ont recensés 630 en 1984 et 811 en 1986.

IV. 3. EPIDEMIES. (476) (477)

IV. 3. 1. LISTERIOSES D'ORIGINE ALIMENTAIRE. (Tableaux VI, VII, VIII)

Elles sont assez anciennes puisque la première décrite dans la littérature a été observée en 1960-1961 en Allemagne Fédérale avec 81 cas.

Les épidémies de Halle (Allemagne Démocratique) en 1986 et d'Anjou en 1975-1976 ont été très importantes puisqu'on a recensé respectivement 281 et 167 cas (126 formes fœto-maternelles et néonatales et 41 chez l'adulte).

Celle d'Anjou avait duré une vingtaine de mois et avait fait l'objet d'investigations approfondies incluant notamment la recherche de Listeria dans le lait ; malgré cela, la source n'a pas pu être identifiée.

Ces épidémies semblent de plus en plus fréquemment observées notamment sur le continent nord-américain où 6 épisodes ont été décrits depuis 1979 ; on peut citer l'épidémie de 1981 au Canada où une salade de chou (coleslaw) provenant d'une entreprise locale et distribuée à travers toute les Maritimes a été incriminée comme véhicule. Les choux avaient été contaminés avant leur arrivée à l'usine de traitement par suite de la fertilisation des plants au moyen de fumier (lisier) provenant d'un troupeau de moutons porteurs de Listeria monocytogenes.

Citons aussi les épidémies de 1979 à Boston (Massachusets) impliquant des crudités, de 1983 à Boston due à la consommation de lait entier ou à 2 % de matière grasse pasteurisé, de 1975 à Los Angeles (Californie) où l'aliment contaminant était un fromage frais de type mexicain consommé par la communauté hispano-mexicaine fait avec du lait pasteurisé auquel on avait ajouté du lait cru.

En Europe, l'infection jusqu'alors la plus retentissante a été observée en Suisse dans le canton de Vaud avec 122 cas de 1983 à 1987.

C'est seulement le 20 Septembre 1987 que le coupable fut désigné ; il s'agissait du Vacherin suisse Mont d'Or.

Il fut alors interdit à la vente et à la production, ce qui déclencha une psychose en Suisse.

Le stock entier de fromage fut alors détruit, les 11 caves d'affinage artisanal du canton de Vaud produisant à lui seul la totalité du fromage soit 800 à 1000 tonnes/an fermées et la production complètement arrêtée.

En France, aucune épidémie importante n'a été observée depuis celle d'Anjou en 1975-1976 jusqu'à celle de 1992 où 279 cas ont été répertoriés avec 63 décès et 22 avortements (230) (Annexe IV).

Cette bouffée épidémique se situe au deuxième rang par le nombre de cas parmi celles décrites depuis 1980.

Elle est due à une souche de sérovar 4b et de lysovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340.

Après une enquête cas-témoin portant sur plusieurs types d'aliments (charcuterie et fromage), le responsable a pu être identifié ; il s'agit de la langue de porc en gelée vendue à la coupe dans les rayons de charcuterie.

Depuis le 1 Janvier 1993, aucun cas n'a été recensé ; l'épidémie semble donc terminée.

Cette épidémie a montré que des aliments jusqu'alors peu suspectés pouvaient être contaminés et qu'il existe une contamination croisée des aliments à la coupe sur l'étal des distributeurs.

Les pouvoirs publics ont alors préconisé des mesures de contrôle renforcées dans l'industrie agro-alimentaire ainsi que des mesures de prévention (hygiène alimentaire) destinées aux personnes à risque.

Le bilan de cette épidémie est donnée en annexe (Annexe IV).

Durant l'été 1993, des rillettes bretonnes ont été à l'origine d'une nouvelle épidémie de listériose de 33 cas dont 4 décès et 4 avortements.

IV. 3. 2. LISTERIOSES NOSOCOMIALES.

Elles sont presque uniquement limitées aux maternités, assez rares et essentiellement causées par un problème d'hygiène.

Le premier cas a été rapporté en 1936.

Parmi les infections répertoriées, on peut citer celle du Costa Rica en 1990, les deux du Canada en 1990 où un stéthoscope a été incriminé, celle de Suisse en 1990 et celle de Grenoble en 1991, laquelle a déjà été décrite précédemment.

Tableau VI : Caractéristiques des principales épidémies de listériose humaine (nombre de cas supérieur à 20).

Lieu	Date	Nombre de cas	Sérovar	Origine
Europe				
RFA (Brème)	1960-61	81	4b	
	1963	20	4b	
RDA (Halle)	1966	281	1/2	
France (Anjou)	1975-76	167	4b	
RFA (Basse Saxe)	1983	24	4b	
Suisse (Vaud)	1983-87	122	4b	fromage
Autriche (Linz)	1986	20	1/2a	
Amérique du Nord				
Canada (Nelle. Ecosse)	1981	41	4b	"coleslaw"
USA (Boston)	1979	23	4b	crudités ?
USA (Houston)	1983	10	1/2b	
USA (Boston)	1983	49	4b	lait ?
USA (Californie)	1985	142	4b	fromage
USA (Pennsylvanie)	1987	36	*	
Autres continents				
Nelle. Zélande (Auckland)	1969	20	4b	
	1980	29	1/2b	
(Christchurch)	1981	18	4b	
Afrique du Sud (Johannesburg)	1977-78	14	4b	

* *Souches de sérovars variés.*

Tableau VII : Principales épidémies de listériose classées selon le nombre de cas.

Lieu	Date	Nombre de cas	Durée	Véhicule alimentaire majeur
Grande-Bretagne	1987-89	> 300	2 ans 1/2	Pâté
France	**1992**	**279**	**10 mois**	**Langue de porc en gelée**
France (Ouest)	1975-76	167*	2 ans	n. i.
USA (Californie)	1985	142*	7 mois 1/2	Fromage
Suisse (Vaud)	1983-87	122	4 ans	Fromage
Usa (Massachusetts)	1983	49*	2 mois	Lait ?
Canada (Nv. Écosse)	1981	41*	6 mois	« Coleslaw »

n. i. : Non identifiée.

* Nombre total de cas, sans mention du nombre de cas épidémiques.

PAYS ET ANNEE	DENREE MISE EN CAUSE	NOMBRE DE CAS	MORTALITE
CANADA, 1981	SALADE COMPOSEE	41 CAS	17 (24%)
USA, BOSTON, 1983	LAIT PASTEURISE	49 CAS	14 (29%)
USA, CALIFORNIE 1985	FROMAGE FRAIS " MEXICAIN "	86 CAS	29 (34%)
GRANDE BRETAGNE, 1986	FROMAGE A PATE MOLLE	1 CAS	- - - -
SUISSE, 1983	VACHERIN	92 CAS	29 (31%)
SUISSE, 1987	VACHERIN	30 CAS	4 (13%)
SUISSE, 1988	VACHERIN	1 CAS	- - - -

Tableau VIII : Epidémies de listériose dont l'origine alimentaire est suspectée.

4ème PARTIE :

PHYSIO-PATHOLOGIE

I. MECANISME DE LA MALADIE. (36) (37) (38) (39) (220) (306)

Listeria monocytogenes est un micro-organisme à multiplication intracellulaire facultative ; il se multiplie à l'intérieur des cellules y compris les macrophages de l'organisme infecté.

Les bactéries peuvent ensuite passer d'une cellule à l'autre sans jamais ressortir dans le milieu extracellulaire.

La porte d'entrée de l'infection chez l'homme est localisée aux voies aériennes supérieures dans les cas d'angines, de pharyngites et d'infections pseudogrippales et surtout au tube digestif après absorption d'aliments contaminés (37).

Il est également possible que le germe atteigne le milieu gastro-intestinal par l'excrétion biliaire (70).

Après franchissement de l'épithélium intestinal, les cellules M, cellules épithéliales spécialisées de l'intestin, lesquelles ont des propriétés phagocytaires, pourraient servir de porte d'entrée mais cela n'a pas encore été démontré.

De toute façon, les bactéries gagneraient le système lymphatique puis la circulation sanguine où elles seraient immédiatement phagocytées par les macrophages résidents du système réticulo-endothélial, en particulier par les cellules de KÜPFFER du foie et par les macrophages de la rate.

Depuis les travaux de MACKANESS (363), on sait que Listeria monocytogenes peut se multiplier dans les phagocytes et créer des granulomes inflammatoires au contact des endothéliums vasculaires, lesquels sont surtout constitués de polynucléaires et de macrophages.

Si les défenses immunitaires ne peuvent pas contrôler l'infection, les bactéries envahissent secondairement de nombreux organes en franchissant les endothéliums capillaires : le placenta, la peau, le système nerveux central.

A l'heure actuelle, on ne sait pratiquement rien du mécanisme moléculaire du processus d'invasion, ni du mécanisme du tropisme neuro-méningé et fœto-placentaire ; en revanche, le mécanisme de la croissance intracellulaire est actuellement en grande partie élucidé grâce à une approche génétique utilisant des transposons (205) (206) (296) (327) (447).

Ces éléments génétiques mobiles, qui codent pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques sont capables de s'insérer sur le chromosome bactérien et ainsi d'activer un gène.

Par exemple, le transposon Tn 1545 est capable de s'insérer dans le gène de structure de l'hémolysine (38).

I. 1. PENETRATION DANS LES CELLULES.

La mise en contact de souches virulentes de Listeria monocytogenes avec des cellules de l'hôte déclenche une internalisation rapide des bactéries dans les cellules par un phénomène de phagocytose induite après intéraction spécifique entre un récepteur cellulaire et une protéine p60 (79) ancrée dans la membrane de Listeria monocytogenes appelée internaline (207).

La phagocytose est réalisée par des phagocytes professionnels (monocytes, macrophages) et des phagocytes dits non professionnels (cellules épithéliales, hépatocytes, cellules endothéliales).

Cette protéine p60 est codée par le gène iap (protéine associée à l'invasion) (603).

Il s'agit d'un polypeptide de 484 acides aminés contenant une séquence signal de 27 acides aminés.

La protéine p60 mature possède un poids moléculaire de 47,5 kDa et un point isoélectrique de 9,3 donc il s'agit d'une protéine basique.

Ce poids moléculaire est inférieur au poids moléculaire déterminé par SDS-PAGE de 60 kDa.

Les séquences d'acides aminés des protéines apparentées à p60 codées par des gènes apparentés à iap de Listeria innocua, Listeria ivanovii, Listeria seeligeri, Listeria welshimeri et Listeria grayi indiquent des régions communes de près de 120 acides aminés aux deux extrémités N et C alors que la portion médiane d'environ 240 acides aminés varie considérablement selon les espèces.

Les protéines apparentées à p60 de Listeria grayi, Listeria ivanovii, Listeria seeligeri et Listeria welshimeri contiennent chacune une séquence de 54 acides aminés qui est absente dans les protéines p60 de Listeria monocytogenes et Listeria innocua.

Cette protéine contient un domaine consistant en 19 répétitions Thr-Asn présent uniquement chez Listeria monocytogenes et Listeria innocua ; seul l'arrangement de ces répétitions diffèrent chez ces deux espèces.

L'utilisation d'un antisérum polyclonal spécifique (anti p60) marqué indirectement de façon immunomagnétique dirigé contre la protéine extracellulaire de 60 kDa de Listeria monocytogenes purifiée sur gel suivie de la microscopie électronique a permis de montrer que 25 % de cette protéine extracellulaire est associé à la surface cellulaire (483).

L'immunoblot des protéines extracellulaires avec des anticorps polyclonaux anti-p60 montre une réaction croisée avec des protéines de 58 à 67 kDa des souches de Listeria de différents sérogroupes mais pas avec Listeria seeligeri, Listeria welshimeri, Listeria grayi et Listeria murrayi ni avec aucune souche d'autres bactéries d'autres genres (237) (483).

L'homologie observée entre p60 et les autres protéines est aussi remarquée avec une protéine p54 d'Enterococcus faecium composée de 507 acides aminés et située à la surface des cellules mais dont la fonction n'est pas connue.

La protéine p60 produite par Listeria monocytogenes montre une activité bactériolytique détectée en gels dénaturant polyacrylamide contenant une souche de Micrococcus lysodeikticus tuée par la chaleur.

Du fait de cette activité hydrolase, p60 peut être impliquée dans l'invasion des cellules phagocytiques non professsionnelles et avoir un rôle dans la division cellulaire.

La protéine p60 peut être classée comme autolysine listérienne avec la N-acétyl muramidase, la N-acétylglucosaminidase, la N-acétyl muramyl-L-alanine amidase, l'endopeptidase, la transglycosylase impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires importantes comme la croissance de la paroi cellulaire, le turnover et la scission de septum.

La purification de la protéine p60 conduit à son aggrégation et à la perte de la rupture des chaînes cellulaires et de l'activité bactériolytique.

Un résidu cystéine à l'extrémité C à la position 347 de p60 présent aussi dans toutes les protéines apparentées à p60 des autres espèces Listeria semble être essentiel à son activité bactériolytique.

Le groupe sulfhydryle de cette unique cystéine est bloqué de façon réversible par le groupe méthanethiol (CH_3S) du MMTS ou méthyl méthanethiosulfonate.

La protéine majeure extracellulaire p60 de Listeria monocytogenes semble être nécessaire à l'adhérence du micro-organisme aux fibroblastes de souris 3T6 et à l'invasion des fibroblastes de souris 3T6 mais pas à l'adhérence aux cellules épithéliales humaines Caco-2 donc l'adhérence de Listeria monocytogenes aux cellules épithéliales Caco-2 semble être indépendante de p60 (402).

La propriété d'adhésion de p60 de Listeria monocytogenes est directement corrélée au domaine de répétition.

Seule la protéine p60 de Listeria monocytogenes est capable de permettre aux mutants R montrant une synthèse réduite de p60 d'adhérer aux fibroblastes 3T6 de souris.

L'expression du gène iap est contrôlée au niveau post-transcriptionnel (311) et non pas par le gène PrfA.

Le gène iap ne peut pas être inactivé sans une perte de viabilité cellulaire, indiquant que p60 est une protéine essentielle pour Listeria monocytogenes et probablement aussi pour d'autres espèces de Listeria.

I. 2. MULTIPLICATION CELLULAIRE.

Les bactéries phagocytées s'échappent rapidement du compartiment phagolysosomal et accèdent directement au cytoplasme des cellules où s'effectue la réplication bactérienne.

La sortie du phagolysosome est liée à la sécrétion d'une exotoxine, la listériolysine O, protéine de 58 kDa active à pH 5,5.

Cette toxine détruit la membrane vacuolaire, dont elle reconnaît le cholestérol, qui entoure la bactérie dans le cytoplasme.

Cela permet à la bactérie, après pénétration dans une cellule, d'échapper à l'acidité et aux protéases, sans oublier chez les macrophages la redoutable bouffée oxydative de la vacuole de phagocytose.

Listeria peut alors se multiplier dans le cytoplasme moins hostile.

La bactérie se multiplie mais sans faire exploser les cellules qui l'abritent ; elle détourne à son profit leur cytosquelette pour se déplacer dans le cytoplasme.

I. 3. DISSEMINATION DE CELLULE A CELLULE.

Listeria monocytogenes est capable de polymériser l'actine dans le cytoplasme cellulaire ; ce phénomène est essentiel pour la dissémination et indispensable à la virulence.

Cette polymérisation est liée à la présence d'une protéine inductrice de la paroi de Listeria monocytogenes, la protéine ActA , polypeptide de 90 kDa (309).

Une étude de microscopie par immunofluorescence et de microscopie électronique utilisant un marquage immunomagnétique a montré que la protéine ActA était nécessaire à l'intéraction des bactéries avec les composés du système microfilamentaire des cellules hôtes pour générer un mouvement intra- et intercellulaire et à l'initiation de l'accumulation d'actine par la bactérie et n'était apparemment pas directement impliqué dans la génération de la queue d'actine contrairement à ce qu'on pensait (410) (547) (548).

La localisation, la distribution et l'expression du polypeptide ActA dans Listeria monocytogenes ont été étudiées après isolement de cette protéine par chromatographie d'affinité.

Les résultats montrent que ActA est située à la surface des bactéries infectant les cellules à tous les stades du cycle de l'infection et est facilement accessible aux anticorps ActA.

Listeria ivanovii est considérée comme pathogène pour les animaux mais a rarement été associée aux infections humaines.

On a prétendu que Listeria ivanovii était déficiente en gène ActA qui dans Listeria monocytogenes code pour une protéine nécessaire à l'intéraction actine - cellules hôtes.

La microscopie à fluorescence et la microscopie électronique ont démontré que Listeria ivanovii pouvait envahir les cellules de mammifères, lyser la membrane phagosomale, polymériser l'actine des cellules hôtes, réorganiser l'actine pour former des queues et disséminer de cellule à cellule (295).

Cependant, aucun ADN homologue au gène ActA ne peut être détecté par PCR.

De plus, Listeria ivanovii ne possède pas de protéine de surface de 90 kDa codée par ActA dans Listeria monocytogenes.

Lorsque Listeria monocytogenes atteint la membrane de la cellule hôte, elle la déforme, créant une protusion cellulaire pouvant mesurer plusieurs dizaines de fois la longueur de la bactérie.

Si cette protusion touche une autre cellule, elle s'y enfonce et y introduit la bactérie parasite emprisonnée dans une vacuole à double membrane.

La sortie de cette vacuole se fait grâce à l'action d'une phospholipase C ou lécithinase (561) sécrétée par la bactérie et digérant la phosphatidylcholine.

Listeria monocytogenes s'échappe alors de la double membrane qui l'entoure et qui provient de chacune des deux cellules impliquées.

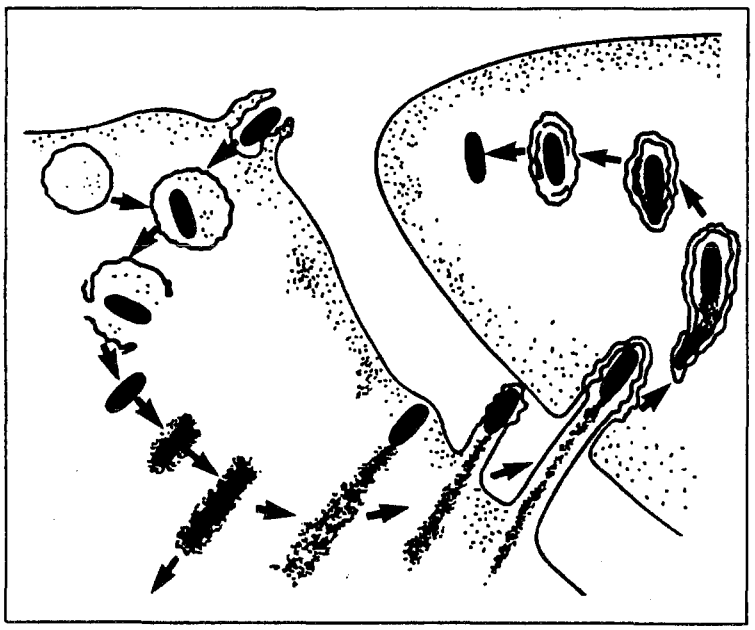
Et le cycle recommence...

Ce cycle est original grâce à la protéine bactérienne qui altère, par un mécanisme encore inconnu, le comportement de l'actine cellulaire.

La bactérie peut ainsi être propulsée à travers la cellule, poussée par la polymérisation progressive d'une traînée d'actine, semblable à la queue d'une comète (304).

La vidéomicroscopie a montré que la tête de cette comète ou bactérie se déplace aussi vite que la queue d'actine se forme.

Ce cycle est schématisé ainsi :



II. FACTEURS DE VIRULENCE. (336)

La virulence de Listeria monocytogenes est attribuée à la sécrétion de diverses substances extracellulaires comme l'hémolysine et les enzymes oxydatives comme la catalase, la peroxydase, la superoxyde dismutase, qui permettent l'entrée et la survie dans les macrophages et les cellules intestinales.

II. 1. HEMOLYSINE. (336)

Elle apparaît être le produit toxique majeur essentiel à la croissance et à la survie intracellulaires (316) de la bactérie à l'intérieur des cellules phagocytiques où elle participe à la lyse de la membrane phagolysosomale en formant des pores permettant ainsi l'accès de la bactérie libre invasive au cytoplasme hôte (114).

Listeria monocytogenes est β-hémolytique sur gélose au sang de cheval ou de mouton et le CAMP test décrit par CHRISTIE, ATKINS et MUNCH-PETERSEN (107) pour les Streptocoques B montre qu'il existe une accentuation très nette de l'hémolyse au point d'intersection des cultures en strie d'une souche de Staphylococcus aureus ou de Rhodococcus equi et de Listeria monocytogenes (469) (523).

Listeria ivanovii et Listeria seeligeri donnent également une hémolyse tandis que les autres Listeria ne sont pas hémolytiques (Tableau III).

Cette activité hémolytique de Listeria monocytogenes est due à la sécrétion d'une exotoxine thiol-dépendante (211) (212) (283) (284) (332) (391) (431) (514) récemment purifiée et dénommée listériolysine O codée par le gène lisA ou hlyA.

Elle est antigéniquement apparentée aux cytolysines thiol-dépendantes des Streptocoques A, des Bacillus spp. et des Clostridium spp. dont le prototype est la streptolysine O (389).

Elle ressemble donc aussi la tétanolysine, la perfringolysine O, la pneumolysine et l'alvéolysine (213).

C'est une protéine de poids moléculaire 58 kDa dont la séquence complète a pu être déterminée par clonage et séquençage (390) (563).

Elle est constituée de 504 acides aminés associés à une séquence signal nécessaire à la sécrétion de la protéine par la bactérie et comporte une unique cystéine (540) située près de la région C terminale qui serait indispensable à son activité lytique.

Elle agit uniquement à pH acide de 5,5 (211) qui est celui des phagosomes après fusion phagolysosomiale.

Elle est soluble, antigénique (216), oxygène labile et a l'activité d'une lécithinase ou d'une phospholipase.

Elle se fixe au cholestérol de la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes grâce au groupe thiol de son unique cystéine ; cette fixation se fait indépendamment de la température et ne peut avoir lieu que si la toxine n'est pas oxydée.

On pense que la toxine interfère avec le groupe hydroxyle du cholestérol et qu'elle s'enfouit dans la double couche lipidique par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes avec la chaîne aliphatique du cholestérol.

De ce fait, la membrane lipidique serait désorganisée, perdrait sa perméabilité, entraînant la mort cellulaire.

Chez l'animal, cette toxine est létale, entraînant des troubles de la conduction cardiaque et une lyse des macrophages et des hépatocytes.

Elle joue un rôle important dans la virulence puisqu'il existe une étroite association entre la capacité à produire une hémolysine et la virulence des souches ; en effet, toutes les souches pathogènes sont hémolytiques.

Les propriétés toxiques et létales sont les suivantes :

- elle agit sur les lysosomes isolés provoquant la libération d'hydrolases acides,

- elle déprime le système réticulo-endothélial,

- elle est létale chez la souris par voie intraveineuse,

- elle agit au niveau des hépatocytes, du tissu cardiaque et probablement des membranes cellulaires de divers organes.

Sa sécrétion est fortement stimulée par une carence en fer, condition réalisée dans les tissus.

Le taux d'hémolysine dépend de l'aération ; il augmente plus en culture statique qu'en culture aérée (34).

L'activité hémolytique est plus grande en culture statique qu'en culture aérée pour un même taux de fer.

L'activité hémolytique est augmentée dans un milieu contenant 2,5 % de NaCl mais diminuée en présence d'une concentration supérieure à 2,5 % (126).

KCl s'avère plus efficace que NaCl (406).

NaCl ou KCl permettent un transport de LLO plus efficace à travers la membrane.

L'expression de l'hémolysine est réprimée par un dissacharide, le cellobiose (430).

La production de listériolysine O et l'activité hémolytique sont réduites quand les cellules sont cultivées à 26°C en présence de 0,2 % de glucose ou à 37°C en présence de 1 % de glucose donc à des températures de croissance plus faibles (26°C) et à des concentrations en glucose plus élevées (≥ 0,3 %) (132).

Elles sont 64 fois plus faibles à 26°C et 128 fois plus faibles à 37°C en présence de 0,6 et 1 % de glucose qu'à 37°C avec 0,2 % de glucose.

Le glucose mais aussi l'α-méthyl glucoside (αMG) (analogue au glucose non métabolisable) peuvent réduire la production d'hémolysine et les effets du glucose et de l'αMG ne sont pas inversés par addition d'AMP cyclique (cAMP) avec et sans 3-isobutyl-1-méthyl xanthine (inhibiteur de cAMP phosphodiestérase).

L'activité hémolytique et la production de la listériolysine O sont considérablement réduites entre pH 5 et 6 et la production optimale est à pH 7 (366).

Donc, la production et l'expression de LLO dans Listeria monocytogenes sont contrôlées par le pH externe (366), par la température de croissance au niveau de la transcription et par des concentrations en glucose élevées dont l'effet peut être simplement dû à un abaissement du pH du milieu de croissance résultant du métabolisme de Listeria monocytogenes et non pas à l'augmentation d'osmolarité.

L'étude de l'influence du tellurite de potassium sur le phénotype hémolytique de Listeria spp. (189) montre que :

- le tellurite de potassium augmente les tailles des zones d'hémolyse manifestées par Listeria monocytogenes et cet effet semble être dû à une augmentation de l'effet cytolytique de la listériolysine O,

- le tellurite de potassium diminue l'hémolyse produite par Listeria ivanovii et cet effet semble être dû à une inhibition de la sphingomyélinase C produite par cette espèce.

Donc, l'addition de tellurite de potassium en milieux de culture sélectifs Listeria permet de différencier et d'énumérer les Listeria spp. hémolytiques de façon exacte.

II. 2. AUTRES FACTEURS. (336)

Des fractions toxiques de Listeria monocytogenes ont été préparées par rupture de la paroi bactérienne et extraction à l'aide de différents solvants organiques ; elles montrent un degré variable de toxicité.

On recense :

- la fraction lipidique isolée par STANLEY en 1940 (531) de la paroi bactérienne et provoquant une monocytose sanguine chez les rongeurs par injection intraveineuse ; elle est un facteur accessoire de virulence pour SEELIGER.

- le complexe EI de PATOCKA (378) (432) isolé de la surface des bactéries vivantes par une méthode voisine de celle utilisée pour extraire l'endotoxine des bactéries à Gram négatif.

Il renferme 60 % de protéines, 18 % de polysaccharides et 8 % de lipides.

MARA et coll. (379) ont défini les propriétés immunologiques de ce complexe ; il est amphiphile, antigénique, cause des transformations blastiques, une hypersensibilité (test sur peau), une splénomégalie, augmente l'effet du BCG expérimental (tuberculose) et la néoplasie chez la souris.

- une phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol codée par le gène pic ou plcA (208) (223) (224) (392).

La maturation de la pro-enzyme de 33 kDa à la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC) de 29 kDa de Listeria monocytogenes nécessite la production de la métalloprotéase à zinc codée par le gène mpl (448).

Ce gène est impliqué dans l'expression de la virulence de Listeria monocytogenes et l'activité PI-PLC est exprimée seulement chez les espèces pathogènes Listeria monocytogenes et Listeria ivanovii.

L'expression de PI-PLC est réprimée par un dissacharide, le cellobiose (430).

La virulence d'un mutant déficient en phospholipase peut être réduite par insertion d'un transposon Tn 1545 dans le gène mpl (461) ; en effet, il ne produit pas la PI-PLC de 29 kDa, une exoenzyme probablement impliquée dans la dissémination de cellule à cellule par hydrolyse du phosphatidylinositol ancré dans la membrane par le glycosyl ; cette hydrolyse est suivie de libération de diacyl glycérol.

Les souches mutantes déficientes en gène pic sont incapables de sortir de la vacuole à double membrane.

Elle n'a pas d'activité détectable sur le phosphatidylinositol-4-phosphate et le phosphatidylinositol-4,5 diphosphate impliquées dans la traduction du signal dans les cellules des mammifères.

La séquence d'acides aminés de cette PI-PLC est homologue à celle de Bacillus thuringiensis, de Bacillus cereus et de Clostridium perfringens.

Son activité est stimulée par NaCl et $ZnSO_4$.

- une métalloprotéase à zinc codée par le gène mpl impliqué dans la virulence de Listeria monocytogenes grâce à son action sur PI-PLC et associé au gène hlyA (144) (393),

- une superoxyde dismutase (578) située dans la paroi bactérienne et capable de détruire les ions superoxydes extracellulaires et les radicaux oxygénés libres.

- une catalase (307) dont le rôle dans la virulence n'a pas été encore prouvé.

Sa production et son activité sont induites par un milieu riche en fer et par l'aération.

La catalase et la superoxyde dismutase sont considérées comme des facteurs de virulence car elles participent à la détoxification des oxydants cytotoxiques (radical superoxyde (O_2^-), peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyl (OH) produits durant la bouffée oxydative dans les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (579).

Les activités catalase et superoxyde dismutase sont augmentées en milieu aéré et quand la culture a lieu en milieu contenant 2,5 % de NaCl alors qu'elles sont diminuées en présence de plus de 2,5 % de NaCl (126) (406).

- une phosphotase alcaline.

La virulence de Listeria monocytogenes est déterminée par une classe de 5 gènes dans l'ordre :

- plcA codant pour une PI-PLC,
- hlyA ou lisA codant pour la listériolysine,
- mpl codant pour une métalloprotéase,
- actA codant pour une protéine impliquée dans la polymérisation d'actine,
- plcB codant pour une lécithinase.

L'expression de ces gènes est régulée positivement par un activateur transcriptionnel (333) (334) (587) ou protéine de 27100 Da codé par le gène PrfA situé devant plcA.

PrfA régule donc les gènes nécessaires à la nucléation des filaments d'actine, la dissémination de cellule à cellule, l'invasion, la mobilité bactérienne intracellulaire ; il est nécessaire pour les évènements se produisant dans le cytoplasme aussi bien que dans la vacuole (103) (200) (201).

Une mutation du gène PrfA stoppe le gène lisA mais aussi abroge la production de la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol et de la métalloprotéase, deux produits des gènes de virulence exprimés seulement par les souches Listeria pathogènes.

Des mutations à l'intérieur de chacun de ces gènes réduisent considérablement la virulence et inhibent Listeria rendant les mutants incapables de se multiplier et/ou de disséminer dans les cellules infectées.

L'expression de tous les facteurs de virulence connus pour être régulés positivement par la protéine PrfA est réprimée à des températures de croissance plus faibles (335).

L'activité hémolytique et donc la production de listériolysine sont faibles ou pas détectées quand la croissance a lieu à 20 ou à 30°C alors qu'elles sont 8 à 16 fois plus élevées à 37°C bien que le produit du gène PrfA soit transcrit aussi bien à 20 qu'à 37°C et que son initiation se fasse au même nucléotide à ces deux températures.

La listériolysine est le seul produit de gène contrôlé par PrfA observé quand Listeria monocytogenes est cultivée à 37°C en milieu riche.

Les protéines dépendantes de PrfA supplémentaires (PdPs), actA (92 kDa), une protéine de 38 kDa de fonction inconnue et une protéine de 34 kDa qui représente probablement plcA et près de 5 PdPs non encore identifiées fonctionnellement, sont synthétisées préférentiellement sous conditions de croissance stressantes telles que le choc thermique ou les conditions de culture en phase stationnaire (529).

Toutes les PdPs sont soit sécrétées soit localisées à la surface cellulaire.

Par contre, la synthèse de catalase, de superoxyde dismutase, de lmaA et de p60 n'est pas sous le contrôle de prfA bien qu'elles soient associées à la virulence de Listeria monocytogenes.

Les souches de Listeria monocytogenes déficientes en gène PrfA régulateur produisent de la listériolysine en petites quantités, cependant détectables.

L'analyse transcriptionnelle révèle l'existence d'un promoteur indépendant de PrfA responsable de l'activité hémolytique donc de l'expression du gène listériolysine dans les souches déficientes en régulateur PrfA (145).

La transcription du gène PrfA se fait à partir d'un promoteur non identifié antérieurement (prfAp2) situé près du codon initiateur prfA (145).

Ce promoteur permet l'expression du gène PrfA donc la sortie de la vacuole des cellules hôtes mais pas l'induction de la polymérisation d'actine par les bactéries et la dissémination de cellule à cellule.

La transcription à partir des promoteurs prfAp1 et prfAp2 est augmentée en absence du gène fonctionnel PrfA, suggérant que la protéine prfA contribue à la régulation de sa propre expression.

L'utilisation du gène PrfA comme sonde ADN montre que ce gène est spécifique des espèces pathogènes de Listeria et aucune réaction n'est obtenue avec les souches des autres espèces de ce genre.

La sonde ADN est obtenue par amplification PCR d'un fragment de 1060 bp à partir d'un plasmide ADN d'environ 1 fg hébergeant le gène PrfA cloné.

Listeria ivanovii n'héberge pas de séquence homologue au gène PrfA ce qui suggère que l'expression de la virulence est régulée différemment.

III. REPONSE IMMUNITAIRE. (38)

Listeria monocytogenes déclenche une réponse immunitaire thymo-dépendante (à médiation cellulaire T), sans intervention des anticorps dans le processus de guérison.

Les lymphocytes T spécifiques semblent recruter et activer les monocytes sanguins d'origine médullaire dans les foyers infectieux par l'intermédiaire des lymphokines.

L'afflux de macrophages dans les tissus infectés aboutit à la constitution de granulomes inflammatoires où les bactéries sont détruites.

Les convalescents gardent une résistance acquise de longue durée due à la présence de cellules T-mémoire.

IV. POUVOIR PATHOGENE NATUREL.

IV. 1. CHEZ L'ANIMAL. (Tableaux IX et X)

Pratiquement toutes les espèces animales, qu'elles soient domestiques ou sauvages, peuvent être atteintes mais certaines sont plus sensibles que d'autres.

La listériose est une maladie qui affecte essentiellement les ovins (dans plus de 3 cas sur 5) et plus rarement les bovins et les caprins.

Dans l'espèce porcine, la listériose - maladie est exceptionnelle alors que le portage asymptomatique est fréquent.

La maladie peut revêtir trois aspects :

- une forme septicémique chez les sujets jeunes, les rongeurs, plus rarement les volailles,

- une forme nerveuse ou méningo-encéphalitique chez le mouton et les ruminants en général,

- une atteinte génitale avec avortement chez les ruminants et les rongeurs.

IV. 1. 1. BOVINS ADULTES.

La neurolistériose est une manifestation fréquente mais des avortements ont été décrits de même qu'un cas de mastite (556).

Quatre cas d'avortements ont été attribués à Listeria ivanovii entre 1988 et 1990 bien que celle-ci donne plus fréquemment des avortements chez le mouton (4).

Des vaches traitées par la dexaméthasone ont présenté un taux de Listeria monocytogenes 15 fois supérieur dans le lait (588).

IV. 1. 2. OVINS.

La listériose apparaît sous forme d'encéphalites, de méningites et d'avortements, ainsi que des mammites.

Chez le mouton, la forme la plus fréquente est la forme nerveuse ou méningo-encéphalitique, appelée "circling disease".

Des phases de torpeur entrecoupées de périodes d'excitation pendant lesquelles les animaux effectuent des mouvements incoordonnés ou répétitifs sont observés.

Les animaux "poussent au mur" ou tournent toujours dans le même sens d'où le nom de "circling disease" puis apparaissent rapidement des paralysies et de la dyspnée.

L'issue est fatale dans la plupart des cas avec ou sans traitement (97).

IV. 1. 3. PORCS. (58) (116) (157) (346) (458)

La listériose évolue généralement de manière discrète mais lorsqu'un inoculum de Listeria est ingéré par un organisme affaibli ou stressé, une infection peut se déclarer et revêtir diverses formes :

- une septicémie associant une forte fièvre et responsable d'une mortalité pouvant atteindre 100 % chez les porcelets (346) (458),

- des troubles de la gestation avec en particulier des avortements bien que l'état général de la truie ne soit souvent que peu affecté,

- des troubles du système nerveux dus à l'inflammation des méninges et de l'encéphale et caractérisés par de l'inappétence, des tremblements et des contractions musculaires, une rigidité des membres antérieurs et une paralysie des membres postérieurs.

Cette forme clinique, apparentée au tétanos, sévit chez les porcelets sous la mère.

Les porcs peuvent aussi présenter une nécrose hépatique.

Le diagnostic ne pourra être établi qu'après isolement des Listeria du contenu intestinal, du foie, de la rate, du cerveau et de la mœlle épinière.

La listériose est tout de même une maladie relativement rare chez le porc.

Le développement des élevages en claustration pourraient expliquer la faible incidence de cette maladie chez le porc qui est la conséquence soit d'une contamination depuis le réservoir hydrotellurique, soit d'une contagion entre espèces différentes, soit du réveil d'une infection latente.

Les cas de listériose se déclarent en général pendant les mois d'hiver et la transmission s'effectue par voie orale.

IV. 1. 4. RONGEURS.

Chez les lapins, les souris, les cobayes, la forme la plus fréquente est septicémique.

IV. 1. 5. OISEAUX.

On observe une forme septicémique mais aussi des lésions dégénératives au niveau du myocarde.

IV. 1. 6. CHEVAUX.

La maladie est rare.

IV. 1. 7. VOLAILLES.

La forme septicémique prédomine.

IV. 1. 8. LAMAS.

Un cas de listériose a été décrit chez un lama âgé de 3,5 mois qui a d'abord présenté des signes de désordre vestibulaire périphérique unilatéral et les jours suivants des signes progressifs d'encéphalite (558).

Le traitement avec des antibiotiques (flunixine méglumine) et des anticonvulsivants n'ont pas stoppé la maladie et le lama a été euthanasié.

L'examen post-mortem a révélé une otite médiane-interne et une méningo-encéphalomyélite suppurative diffuse ; de plus, Listeria monocytogenes a été isolée du LCR et du tissu cérébral.

Tableau IX : Espèces sensibles à Listeria monocytogenes.

GROUPE	ANIMAUX DOMESTIQUES		ANIMAUX SAUVAGES	
	ESPECES	FREQUENCE	ESPECES	FREQUENCE
Oiseaux	Poulet	−+−	Perdrix	−
	Oie	+	Faisan	−
	Canard	−		
	Dindon	+		
	Pigeon	+		
Ruminants	Mouton	−+	Chevreuil	−
	Chèvre	−	Daim	−
	Vache	+−		
	Buffle	+		
Monogastriques — Divers	Cheval	+	Rongeurs — Rats musqués	+
	Porc	+	Souris	−
	Lapin	+		
Monogastriques — Carnivores	Chien	−	Carnivores — Renard	−
	Chat	−	Chinchilla	+−
	Ecureuil	+	Vison	+

Cas sporadiques −
Endémies rares +−
Endémies fréquentes +−−

Tableau X : Symptomatologie de la listériose animale.

	GRANDS ANIMAUX		PETITS ANIMAUX		
	Ruminants (ovins, bovins, caprins)	Porcins	Carnivores	Rongeurs	Oiseaux
Forme nerveuse	+−−	+−−	−	−	−
Forme génitale	+−−	+	−	−	+
Forme septicémique	− (jeunes)	+ (jeunes)	+−−	+−+	+−−

+−− fréquente
− rare
−− non observée

Donc, tous les animaux peuvent être atteints mais Listeria touche plus particulièrement les poulets, les moutons et les vaches, principalement à la saison froide.

Listeria monocytogenes est presque exclusivement incriminée alors que Listeria ivanovii n'entraîne que des avortements.

La maladie varie en fonction de l'espèce, de la virulence de la bactérie et du mode de contamination.

IV. 2. CHEZ L'HOMME. (27) (42)

IV. 2. 1. SUJETS ET TERRAINS A RISQUE.

Les sujets à risque sont les suivants :

- les femmes enceintes essentiellement au cours du 3° trimestre,
- les nouveau-nés,
- les sujets âgés,
- les greffés rénaux,
- les hémodialysés,
- les sidéens,
- les individus atteints d'intoxications chroniques (alcool, drogue),
- les individus atteints de maladies ou d'infections intercurrentes, cancers pulmonaires, digestifs ou hématologiques, infections virales,

Les terrains à risque sont les suivants :

- les maladies néoplasiques et en particulier les lymphomes Hodgkiniens ou non,

- les thérapeutiques immunosuppressives suite à des greffes d'organes ou la corticothérapie ou la chimiothérapie anticancéreuse,

- l'hypoacidité gastrique,

- le diabète,

- les hépatopathies alcooliques ou non,

- les collagénoses,

- les néphropathies chroniques,

IV. 2. 2. LISTERIOSE DE L'ADULTE.

La listériose de l'adulte est exceptionnelle avant l'âge de 12 ans.

Au-delà, elle se manifeste essentiellement par une atteinte du système nerveux central ; méningite et méningo-encéphalite ou encore une septicémie.

Les formes extra-neurologiques non bactériémiques sont beaucoup plus rares.

Tout dépend du terrain.

IV. 2. 2. 1. Infection du système nerveux central ou atteinte neuro-méningée.

Elle concerne 30 à 50 % des listérioses de l'adulte et comprend principalement les méningites ou méningo-encéphalites et plus rarement les rhombencéphalites et les abcès cérébraux.

Une bactériémie est associée dans plus de la moitié des cas.

IV. 2. 2. 1. 1. Symptomalogie.

Le début est généralement franc avec une fièvre et des céphalées souvent intenses et précoces, précédant de plusieurs jours un syndrome méningé peu différent des autres méningites bactériennes.

Des signes méningés frustres et une fébricule à 38°C sont aussi observés.

Les signes neurologiques, maximaux au tronc cérébral, sont de pronostic sévère et apparaissent parfois après institution de l'antibiothérapie.

Les observations sont diverses, à savoir :

- des paralysies des nerfs crâniens intéressant une ou plusieurs paires et qui pourraient évoquer à tort une lésion focalisée :

. des paralysies oculo-motrices (3° paire (nerfs oculaires communs) et 6° paire (nerfs oculaires externes)) touchant principalement la musculature extrinsèque, un ou plusieurs nerfs pouvant constituer une ophtalmoplégie complète.

Le caractère partiel de certaines paralysies signe une atteinte nucléaire possible.

Une ophtalmoplégie internucléaire a également été rapportée.

Des paralysies de fonctions, paralysie dans le regard latéral, déviation des yeux, un nystagmus horizontal peuvent venir perturber la course oculaire.

. la paralysie de la 7° paire (nerfs faciaux) est fréquente, unilatérale ou bilatérale (40 % des cas) ; elle est à l'origine de paralysie faciale de type périphérique ou d'une hémi-anesthésie faciale.

. l'atteinte de la branche sensitive ou motrice du trijumeau (5° paire) peut aggraver les troubles de la déglutition alors que l'atteinte des nerfs glosso-pharyngiens (9° paire) et spinaux (11° paire) est responsable de l'impossibilité de fermeture de la glotte ce qui empêche la déglutition et constitue un risque majeur de fausse-route.

. l'atteinte du nerf hypoglosse (12° paire) contribue à la déviation de la langue.

. l'atteinte du nerf auditif (8° paire) est à l'origine d'un syndrome vestibulaire.

- un syndrome cérébelleux (26) statique et cinétique est fréquent (1 fois sur 5), souvent bilatéral, mais prédominant d'un côté est à l'origine de mouvements anormaux séquellaires intriqués avec des perturbations d'origine extra-pyramidale.

- des troubles du tonus et des mouvements anormaux extra-pyramidaux, à composante athétoïde, ou évoquant une dyskinésie volitionnelle d'attitude sont souvent observés, mais ils sont masqués les premiers jours par des troubles de la conscience et des paralysies démasquées progressivement au cours de l'évolution.

- les autres atteintes neurologiques sont moins suggestives de listériose mais sont tout aussi importantes :

. les troubles de la conscience vont de l'obnubilation au coma et peuvent s'aggraver sur plusieurs jours malgré l'institution d'une antibiothérapie adaptée ou survenir brutalement, en même temps que des crises convulsives principalement chez le sujet immunodéprimé.

Ils sont responsables de la mort ou d'importantes séquelles.

. les crises convulsives ou l'état de mal sont sévères.

. un déficit hémiplégique peut s'installer d'emblée, contemporain d'une forme méningo-encéphalitique avec ou sans trouble de la conscience.

La tomodensitométrie permet de rechercher un abcès en cours de formation.

- des désordres neuro-végétatifs ont été observés :

. dilatation gastro-intestinale aiguë nécessitant une aspiration digestive continue, un vomito negro, ulcères aigus duodénaux secondairement hémorragiques ou perforés (254),

. collapsus, anurie dont le rôle des immuns complexes n'est pas impossible (231).

Ces symptômes permettent de distinguer quatre principaux aspects cliniques :

- méningite à liquide trouble ou à liquide clair dont le diagnostic est identique à celui des méningites bactériennes et virales.

Une méningite à Listeria est fréquente chez le sujet immunodéprimé et une antibiothérapie doit être entreprise avant les résultats de l'hémoculture et du LCR.

- méningo-encéphalite associant un syndrome méningé et une atteinte neurologique disséminée et faisant penser à une tuberculose ou une affection virale.

- rhombencéphalite débutant par des céphalées intense, une fièvre à 38°C, suivis, 8 à 10 jours plus tard, sans trouble majeur de la conscience, de manière insidieuse et progressive, par des paralysies des paires crâniennes sans modification importante du LCR orientant vers une pathologie extra-infectieuse du tronc cérébral.

- déficit neurologique focalisé dans un contexte infectieux avec des signes d'abcès ou d'encéphalite pré-suppurative (329) (491).

Le LCR est stérile donc l'hémoculture et la ponction de l'abcès permettront de poser le diagnostic (573).

IV. 2. 2. 1. 2. Evolution.

Elle est sévère et ceci est fonction de l'atteinte neurologique et de l'éventuelle pathologie associée :

- les formes méningées pures ont une évolution favorable sauf les formes comateuses compliquant une hémopathie ou une autre pathologie immunodépressive.

- les abcès survenant principalement chez les sujets immunodéprimés ont une évolution défavorable.

- les méningo-encéphalites ont une évolution sévère.

IV. 2. 2. 2. Autres infections listériennes.

IV. 2. 2. 2. 1. Les septicémies.

Survenant habituellement sur un terrain immunodéprimé, elles prennent une allure pseudo-typhoïde et se compliquent parfois de multiples localisations : pneumonie, endocardite survenant principalement sur des lésions cardiaques préexistantes, valve native, prothèse mécanique ou bioprothèse, ostéomyélite, arthrite, cholécystite, péritonite, hépatite ou abcès hépatique.

La principale manifestation est la fièvre, à laquelle peuvent s'associer des signes non spécifiques comme une asthénie, un malaise, des troubles digestifs à type de nausée, crampes, vomissements, diarrhées.

IV. 2. 2. 2. 2. Les atteintes cardio-vasculaires.

Elles sont les suivantes :

- l'endocardite (24) (133) (446) siégeant sur le cœur gauche et dans la majorité des cas sur une lésion préexistante.

- la péricardite (268) dont la preuve bactériologique est apportée par l'hémoculture et dont le mécanisme pourrait être inflammatoire par réaction aux antigènes.

- la myocardite suppurée probablement par embolie septique pour Mc CUE (361), purulente et associée à une nécrose et un volumineux abcès du septum pour TICE (545).

Elle peut aussi être associée à une méningite sous la forme d'une hypokinésie ventriculaire gauche et une diminution de la fraction de raccourcissement à l'échographe, réversible en 15 jours et à l'origine d'un collapsus à pression veineuse centrale.

- un anévrysme mycotique (250) (321).

IV. 2. 2. 2. 3. L'hépatite.

La localisation hépatique de Listeria est bien connue puisque la constatation d'importants foyers de nécrose du foie sur l'animal a donné naissance à l'appellation Listeria hepatolytica.

On peut observer des abcès miliaires du foie au cours de septicémies mais aussi une atteinte hépatique prédominante (242) (612) survenant sur un foie antérieurement sain et s'accompagnant d'une nette élévation des transaminases comme dans le cas d'une hépatite virale.

La guérison est possible.

Une surcharge en fer au cours de l'hémochromatose favorise une hépatite.

IV. 2. 2. 2. 4. Autres troubles.

On a pu observer :

- des arthrites septiques à Listeria monocytogenes (598),

- des pneumopathies certainement dues à une contamination aérienne,

- des pleurésies purulentes,

- des lymphadénites cervicales ou sous-maxillaires,

- des conjonctivites ou kérato-conjonctivites par contact direct accidentel associées parfois à une tuméfaction des glandes parotides ou sous-maxillaires.

Une endophtalmie a été décrite chez un greffé rénal recevant de la ciclosporine et de la prednisone (5).

Le schéma clinique initial était une uvéite hypertensive aiguë avec un hypopion.

En dépit de la paracentèse et d'une antibiothérapie appropriée, l'énucléation s'est avérée nécessaire.

Une urétrite par contamination vénérienne et une angine ont été rapportées.

Des bactériémies isolées sans signe clinique ont été révélées surtout chez les sujets immunodéprimés ayant une pathologie digestive (colite ulcéreuse, cancer, cirrhoses) évoquant une porte d'entrée digestive.

Quelques observations de collapsus ou décès en quelques heures sans autres signes cliniques ni lésions anatomiques ou histologiques patentes suggèrent le rôle possible de toxines.

Le rôle des immuns complexes a été incriminé dans la survenue d'une insuffisance rénale aiguë (231).

IV. 2. 3. LISTERIOSES MATERNO-FŒTALES.

La fréquence en France est de l'ordre de 1/250 grossesses, ce qui représente environ 30 % de l'ensemble des listérioses.

IV. 2. 3. 1. Listériose de la femme enceinte.

Elle peut survenir à n'importe quel moment de la grossesse mais la fréquence est maximale au début du troisième trimestre, puis diminue pendant le huitième mois.

Au cours des deux premiers trimestres, la listériose est responsable de fausse couche alors que lorsqu'elle survient au cours du troisième trimestre, elle peut être la cause de mort in utero et surtout d'un accouchement prématuré et d'une infection néonatale.

L'infection listérienne est le plus souvent latente chez la mère ou réduite à un épisode fébrile, pseudogrippal ne correspondant pas à l'infestation microbienne proprement dite puisqu'il n'y a pas de corrélation entre les lésions histologiques constatées et la chronologie de l'accès fébrile, et à de volumineux abcès placentaires peut correspondre un accès fébrile contemporain de l'accouchement.

On peut penser que l'accès fébrile maternel corresponde à une réinfestation de la mère à partir de lésions endométriales ou placentaires constituées depuis un temps indéterminé ; ceci n'implique pas l'atteinte simultanée obligatoire du fœtus.

Cet épisode fébrile est noté dans plus de la moitié des cas mais ne justifie pas obligatoirement une antibiothérapie et ceci à tort.

Il survient un mois, une semaine avant l'accouchement ou en est contemporain.

Une antibiothérapie bien adaptée et rapidement instituée permet de mener à terme la grossesse et de donner naissance à un enfant normal.

Outre cet épisode fébrile, d'autres manifestations cliniques ont été observées :

- une infection urinaire (5 à 20 % des cas),

- un épisode pseudogrippal avec toux et fièvre,

- une diarrhée,

- une intervention pour appendicite ou volvulus, précédant de peu l'accouchement,

- un ictère ou subictère,

- des septicémies, des méningites ou méningo-encéphalites ; dans ce cas, l'évacuation du contenu utérin, le plus souvent spontané, est indispensable au contrôle de l'infection,

- un syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (A.D.R.S.) à la 33° semaine d'une grossesse normale jusque-là (67).

Une hémoculture et une analyse du liquide amniotique révèlent la présence de Listeria monocytogenes dans le cas d'une pneumopathie probablement listérienne associée à une insuffisance circulatoire aiguë, des signes biologiques de coagulation intravasculaire disséminée, une hypoxie sévère nécessitant une ventilation assistée.

La listériose de la femme enceinte se caractérise par :

- sa symptomatologie difficile à interpréter,

- son caractère bénin pour la mère,

- son retentissement grave pour le fœtus.

IV. 2. 3. 2. Transmission mère-fœtus. (477)

Elle peut se faire par plusieurs voies :

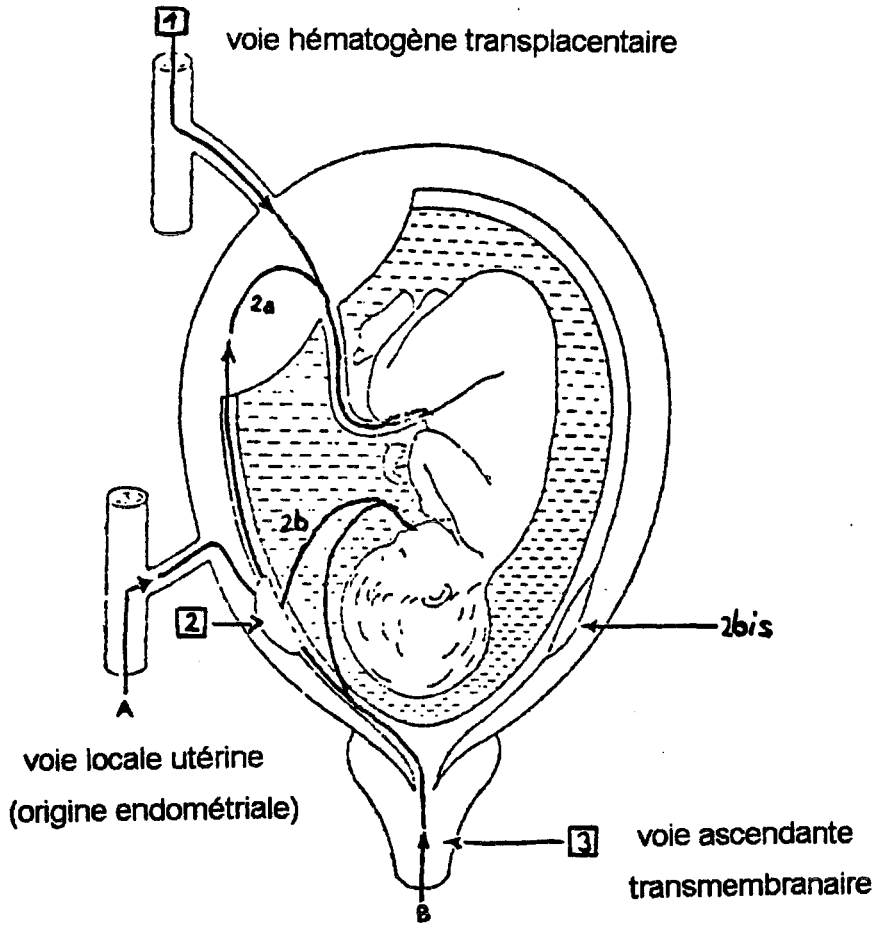
- une voie hématogène transplacentaire, voie sans doute la plus fréquente et se rencontrant au cours d'une bactériémie ou d'une septicémie maternelle,

- une voie locale utérine ; un foyer endométrial quiescent et réveillé par la grossesse ou constitué pendant celle-ci atteint le fœtus par contiguité, c'est-à-dire par le placenta ou au travers des membranes puis du liquide amniotique,

- une voie transmembraneuse à partir d'un portage vaginal,

- une contamination directe du fœtus ; lors de l'expulsion dans les voies génitales basses, le nouveau-né pourra être contaminé par inhalation, déglutition, par voie conjonctivale et ceci à partir d'un portage vaginal,

- une contamination à la pouponnière de l'hôpital est possible.



IV. 2. 3. 3. Listériose néonatale.

Sa fréquence est difficile à apprécier mais on admet un chiffre de 0,2 à 0,3 % des naissances, soit en France 1800 à 2500 cas annuels (493).

Une fois sur deux, il s'agit d'un mort-né et 2/3 des nouveau-nés infectés sont prématurés ce qui associe les risques de la maladie infectieuse et de la prématurité.

IV. 2. 3. 3. 1. Symptomalogie.

Les symptômes apparaissent immédiatement à la naissance ou après un délai de quelques jours, en général dans les 28 jours de vie.

On distingue :

- les infections précoces survenant dans les 5 premiers jours de vie correspondant à la forme septicémique et à la contamination transplacentaire,

- les infections tardives survenant au-delà et correspondant à la méningite et à la contamination par contage au passage des voies génitales maternelles infectées.

On observe aussi des formes respiratoires asymptomatiques.

IV. 2. 3. 3. 1. 1. La forme septicémique.

Les premières manifestations apparaissent immédiatement ou quelques heures après la naissance et sont celles de toute souffrance néonatale à savoir : hypothermie, troubles du rythme et encombrement respiratoire, cyanose, somnolence, coma.

Les réflexes archaïques sont diminués ou absents et l'enfant est hypotonique.

On peut observer des troubles digestifs, un ictère avec hépatosplénomégalie mais surtout des éruptions maculeuses, maculo-papuleuses ou des papules centrées par une vésicule ou une pustule voire une éruption fugace ne durant que quelques heures, des granulomes dans le pharynx jaunâtres et saillants, une conjonctivite purulente ; ces signes sont plus évocateurs et fréquents.

On lui donne le nom de granulomatose septique infantile ou granulomatosis infantiseptica.

L'évolution est le plus souvent mortelle en quelques jours.

IV. 2. 3. 3. 1. 2. La méningite.

Les premiers symptômes apparaissent après quelques jours et correspondent à des troubles digestifs, diarrhée, anorexie, de la fièvre ou de l'hypothermie, voire des convulsions ou un coma et justifiant la rachicentèse sans attendre le syndrome méningé.

Peuvent être associés des troubles respiratoires, toux, dyspnée, cyanose, quelquefois une conjonctivite et une anémie hémolytique.

IV. 2. 3. 3. 1. 3. Les formes respiratoires.

La symptomalogie se limite à une cyanose, un tirage, une polypnée entrecoupée d'apnée (316).

IV. 2. 3. 3. 1. 4. Autres formes.

On a pu observer une conjonctivite isolée, d'évolution bégnine et des formes asymptomatiques.

IV. 2. 3. 3. 2. Evolution.

Elle est sévère pour les formes septicémiques disséminées et les méningites avec environ 4 % de décès.

Listeria monocytogenes possède donc un triple tropisme préférentiel :

- le système nerveux : méninges et encéphale,

- les organes riches en tissu du système réticulo-endothélial : glandes salivaires, oculaires, ganglions, mésentère, foie, rate,

- les tissus du tractus génital féminin : tissus fœto-maternels.

V. POUVOIR PATHOGENE EXPERIMENTAL. (336)

De nombreuses espèces animales comme le lapin, la souris et le cobaye sont sensibles à l'infection listérienne expérimentale.

De ce fait, plusieurs voies d'inoculation ont été utilisées.

V. 1. VOIE CONJONCTIVALE.

Le test d'ANTON consiste à instiller une goutte d'une culture de 24 heures dans le sac conjonctival du lapin ; ceci provoque, en 36 à 48 heures, une conjonctivite purulente.

Dans le pus conjonctival, sont retrouvés des cellules épithéliales, des polynucléaires, des mononucléaires et des germes intracellulaires.

V. 2. VOIE INTRAVEINEUSE.

L'injection intraveineuse chez les animaux monogastriques provoque une septicémie rapidement mortelle.

L'autopsie permet d'observer la teinte verdâtre de la paroi abdominale, avec des foyers multiples de nécrose du foie et parfois du myocarde et des méninges.

La DL_{50} par cette voie est de 10^4-10^6 selon les races de souris et les souches bactériennes.

V. 3. VOIE SOUS-CUTANEE.

L'inoculation sous-cutanée de lapins produit une réaction inflammatoire locale puis une évolution comparable à celle de la voie intraveineuse, mais plus lente.

La monocytose sanguine apparaît en 3 à 7 jours.

V. 4. VOIE INTRAPERITONEALE.

L'issue est rapidement mortelle chez les lapins et les souris.

La DL_{50} chez la souris est de 3,9 à $4,5.10^6$ pour les souches hémolytiques et de $1,5.10^9$ pour les souches non hémolytiques.

V. 5. VOIE ORALE.

Cette voie a peu d'effet sur la plupart des animaux de laboratoire, mais GRAY (336) signale que l'infection par voie orale ou conjonctivale de lapines gravides se traduit par un avortement ou par la naissance de petits infectés.

V. 6. VOIE CEREBRALE.

Les souris peuvent être infectées avec 3 ou 5 bactéries mais la maladie résultante ne reproduit pas ce qui est observé dans les encéphalites ou les méningo-encéphalites des ruminants ou des rongeurs.

L'inoculation à l'œuf embryonné de poulet a été proposé comme modèle dans l'investigation du pouvoir pathogène des souches de Listeria.

On observe, après 48 heures, des lésions du foie, du myocarde et du système nerveux central.

Le mécanisme du pouvoir pathogène de Listeria monocytogenes peut être expliqué par une action toxique, le rôle des formes L, la virulence se manifestant par la capacité de Listeria monocytogenes envers l'action bactéricide des phagocytes, mais surtout par la présence intracellulaire.

En effet, RACZ, TENNER et MERO (452) ont montré, grâce à une étude au microscope photonique, la multiplication de Listeria monocytogenes dans les cellules épithéliales de la vessie après induction d'une cystite chez le cobaye par introduction de 10^9 bactéries dans la vessie.

L'oligosaccharide hydrosoluble, le N-acétyl-chitohexose protège la souris de l'infection par élévation de la fonction d'immunité cellulaire (550).

L'ampicilline libre est moins efficace que celle qui est enfermée dans un liposome pour le traitement d'une listériose expérimentale chez la souris (184).

5ème PARTIE :

DIAGNOSTIC

I. SIGNES DE SUSPICION. (27) (170) (Tableau XI)

Ils sont les suivants :

- signes cliniques :

  . les symptômes neurologiques, septicémiques chez l'adulte,

  . un syndrome pseudogrippal avec éventuellement une infection urinaire et/ou des troubles digestifs, une rupture prématurée des membranes, un accouchement prématuré et anormalement long, une élévation thermique au cours du travail chez la femme enceinte,

  . un syndrome septicémique, neurologique, une détresse respiratoire, une éruption cutanée précoce, une blépharo-conjonctivite unilatérale ou bilatérale chez l'enfant,

orientent le diagnostic vers la listériose.

- signes métaboliques : une acidose métabolique dès la naissance et une hypoglycémie,

- signes anatomopathologiques comme l'aspect spécifique des nodules listériens,

- signes biologiques et hématologiques :

  . le LCR peut être clair, trouble ou purulent, mais l'aspect cytologique de type panaché comprenant à la fois polynucléaires et lymphocytes est très évocateur d'une méningite à Listeria,

  . la protéinorachie est à 1 g/l,

  . la glycorachie est abaissée,

B.I.U. MÉD. GRENOBLE

. la lactacidorachie rapportée à la lactacidémie est élevée,

. l'ionogramme peut révéler une hyponatrémie par antidiurèse, facteur d'œdème cérébral dans les atteintes cérébro-méningées,

. l'hémogramme et surtout la formule d'ARNETH (répartition des globules blancs polynucléaires selon le nombre apparent de leurs noyaux ; elle renseigne sur la production et l'âge des polynucléaires) présentent des anomalies : monocytose rare, neutropénie brutale et brève, polynucléose modérée ou remplacée par une leucopénie et annoncée par la myélémie, thrombopénie souvent associée à une coagulation intravasculaire disséminée, anémie peu significative, élévation du taux de fibrinogène (> 3 g/l),

- signes immunologiques : augmentation des IgM, non modification du complément.

Tableau XI : Arguments diagnostiques devant une méningite à liquide clair.

	Cellularité	**Glycorachie (% de glycémie)**	**Examen direct (% positivité)**	**Autres**
Listériose	panachée (40-50 % neutrophiles)	≥ 40 %	Bacille Gram positif (< 40 %)	hémocultures
Tuberculose	90-100 %, lymphocytes	< 40 %	BAAR* (40 %)	autre localisation
Cryptococcose	90-100 %, lymphocytes	< 40 %	encre de Chine (50-80 %)	antigène cryptocoque (sang et LCR)
Herpès	90-100 %, lymphocytes	> 40 %	–	IFN** et antigène viral (LCR), EEG, scanner, RMN

* : Bacille acido-alcoolo-résistant (coloration de Ziehl) ; ** : interféron

II. DIAGNOSTIC DES DIFFERENTES LISTERIOSES. (27)

II. 1. LISTERIOSE DE L'ADULTE.

Le LCR est très variable dans son aspect et sa composition :

- l'aspect est trouble, clair ou parfois franchement purulent,

- la cytologie peut être faite exclusivement de polynucléaires (liquide purulent) ou de lymphocytes (liquide clair) ou panachée,

- le nombre d'éléments est variable : les polynucléaires sont innombrables dans les méningites purulentes, alors que dans les méningo-encéphalites, on dénombre moins de 20 à 30 éléments,

- la protéinorachie est supérieure à 1 g/l mais est normale dans les atteintes neurologiques prédominantes,

- la glycorachie est abaissée,

- la lactacidorachie rapportée à la lactacidémie est élevée,

- la culture n'est pas constamment positive.

L'hémoculture doit être systématique.

Les investigations neuroradiologiques orientent le diagnostic :

- la scintigraphie cérébrale au technétium 99 peut montrer un ou plusieurs foyers de fixation suggérant une vascularite avec effraction de la barrière sang/cerveau,

- la tomodensitométrie cérébrale montre des images hémisphériques hypodenses prenant ou non le contraste, compatibles avec une encéphalite présuppurative plus rarement avec un abcès,

- l'angiographe n'est en rien spécifique.

Les urines, les selles, l'ascite, le liquide pleural, la ponction articulaire mais aussi des prélèvements au niveau d'une adénopathie cervicale ou de l'appendice peuvent aider au diagnostic.

II. 2. LISTERIOSE DE LA FEMME ENCEINTE.

L'hémoculture est systématique devant toute fièvre et peut apporter à elle seule la preuve de l'infection.

L'uroculture est rarement positive.

Le prélèvement vaginal n'a pas d'intérêt car le vagin ne semble contaminé que lors de l'accouchement (337).

L'amniocentèse par voie transabdominale est d'un grand intérêt car elle permet d'instituer rapidement une antibiothérapie et de déclencher le plus tôt possible l'accouchement (441).

Au cours de l'accouchement, l'examen placentaire associe l'hémoculture et le prélèvement des lochies.

L'examen du placenta permet d'observer des lésions macroscopiques : petits nodules miliaires en grain de riz, bien limités, jaunâtres, ou abcès plus volumineux d'1 cm ou plus et plages nécrotiques ou infarctoïdes, visibles sur la face utérine.

Le frottis amniotique se fait par raclage de l'amnios à hauteur de la plaque choriale et étalement, recherche de polynucléaires et de germes, coloration de Gram, évaluation de la densité.

L'examen histologique confirme les lésions macroscopiques et apporte la preuve d'une contamination du placenta avec des abcès de tailles diverses et des zones de nécrose.

La topographie rétroplacentaire des gros abcès, l'importance et la constance de l'atteinte inflammatoire de la caduque membraneuse suggèrent une atteinte endométriale.

II. 3. LISTERIOSE DU NOUVEAU-NE.

L'isolement se fait par hémoculture à partir du LCR, du méconium (ou par écouvillonnage rectal), du liquide gastrique, des sécrétions nasales, pharyngées, du sébum (aisselle, aine, oreille), d'éventuelles pustules cutanées ou d'une conjonctivite.

Les examens se font parallèlement à ceux de la mère.

Le LCR est hypertendu, trouble ou purulent, parfois xanthochromique ou hémorragique, riche en albumine.

La radiographie pulmonaire montre des opacités micronodulaires, un aspect macroréticulé ou une image évocatrice de bronchopneumonie.

On observe aussi une hyperleucocytose avec polynucléose, rarement une mononucléose.

III. IDENTIFICATION. (170)

III. 1. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE.

III. 1. 1. EXAMEN DIRECT APRES COLORATION DE GRAM.

Il n'a de valeur que pour les prélèvements peu ou pas contaminés par une flore associée.

On observe un petit bacille ou coccobacille régulier à Gram positif.

Les cultures en milieux solides présentent des morphologies plus courtes que celles en milieux liquides ; de plus, les Listeria provenant de cultures âgées sont plus longues, plus filamenteuses et plus décolorées que celles issues de cultures jeunes.

III. 1. 2. MISE EN CULTURE ET IDENTIFICATION.

Les prélèvements sont enrichis puis isolés sur milieux sélectifs spécialement conçus pour Listeria.

L'identification repose sur la réalisation d'une hémolyse sur gélose au sang de mouton, d'une galerie API 20E constituée de 20 tests à savoir 10 hydrates de carbone et 10 enzymes et d'une hydrolyse de l'esculine.

Un point important est constitué par le diagnostic bactériologique différentiel ; ainsi, il ne faut pas confondre les formes filamenteuses et décolorées de Listeria monocytogenes avec un bacille Gram négatif comme Haemophilus, de même les formes courtes avec les formes allongées d'un Streptocoque ou d'un Entérocoque tous deux catalase négative.

La différenciation avec les Bacillus est aisée puisque les colonies ont une morphologie différente et ils sporulent, de même qu'elle est facile avec les Corynébactéries qui sont des bacilles Gram positif irréguliers et ne peuvent pas être simultanément mobiles et β-hémolytiques.

Parmi les bacilles Gram positif réguliers et non sporulés, certains comme Kurthia sont aérobies stricts ce qui les différencient des Listeria.

Erysipelothrix rhusiopathiae, bien qu'aéro-anaérobie est immobile, catalase négative mais produit de l'hydrogène sulfureux.

La plupart des confusions se fait avec les Lactobacillus qui sont pourtant immobiles et catalase négative.

Brochothrix est le genre le plus proche de Listeria mais est immobile et ne se développe pas à 37°C (Tableau II).

Le diagnostic différentiel doit aussi s'effectuer au sein du genre Listeria par l'intermédiaire de l'hémolyse (Listeria grayi, Listeria innocua, Listeria murrayi et Listeria welshimeri sont non hémolytiques) complétée par le CAMP-test avec Staphylococcus aureus (Listeria monocytogenes et Listeria seeligeri positif) et Rhodococcus equi (Listeria ivanovii positif) mais aussi par l'acidification du mannitol (Listeria grayi et Listeria murrayi positif) et du xylose (Listeria ivanovii, Listeria seeligeri, Listeria welshimeri positif) (Tableau III) (Figure 2) (Annexe I).

III. 1. 3. METHODES RAPIDES.

Elles sont utilisées après un enrichissement et font appel à :

- des réactions immunoenzymatiques ou d'immunofluorescence directe à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques,

- des sondes nucléiques marquées, complémentaires de séquences d'ARNr ou de gènes comme c'est le cas pour l'hémolysine ou le facteur d'hypersensibilité retardée,

- une amplification génique.

Les résultats sont disponibles en 2 à 3 jours au lieu de 7 avec les autres méthodes.

III. 2. CARACTERISATION.

III. 2. 1. METHODES PHENOTYPIQUES. (478)

Elles sont indispensables pour :

- la surveillance en routine,

- savoir s'il s'agit de l'apparition d'une souche unique ou de souches variées lors d'une augmentation du nombre de cas,

- typer un grand nombre de souches isolées d'aliments de manière à détecter l'aliment responsable.

III. 2. 1. 1. Sérotypie.

C'est le rôle du Centre National de Référence des Listeria situé à Nantes, créé en Septembre 1981 par arrêté ministériel (117).

Ce Centre a pour mission de collecter les souches de Listeria isolées en France tout au long de l'année dans des cas de listérioses humaines et d'établir ou de confirmer l'identité de la bactérie en contrôlant la pureté de la souche et en la soumettant à des tests bactériologiques afin de déterminer le genre Listeria et l'espèce.

Cette méthode ou combinaison antigénique de SEELIGER et HöHNE (506) consiste à immuniser des lapins afin d'obtenir des antisérums spécifiques, à purifier ces antisérums bruts polyclonaux et à les utiliser dans un test d'agglutination sur lame.

Les souches sont mises en contact avec les antisérums O pour le typage des antigènes somatiques O et H pour le typage des antigènes flagellaires H ; dans ce deuxième cas, le bouillon tryptone phosphate est supplémenté en formaline.

DONKER-VOET (147) et SEELIGER (505) (506) ont défini 18 sérovars pour Listeria monocytogenes, correspondant à différentes combinaisons des 5 antigènes flagellaires et 15 antigènes somatiques (Tableau IV).

Les trois sérovars 1/2a, 1/2b et 4b représentent 98 % des souches de Listeria monocytogenes impliquées en pathologie humaine avec 60 % pour le sérovar 4b, 28 % pour le sérovar 1/2a et 15 % pour le sérovar 1/2b, selon le Laboratoire National de la Santé.

C'est une méthode longue et fastidieuse dont les difficultés essentielles résident en la préparation d'antisérums spécifiques de qualité stricte et dans le manque de discrimination de la méthode.

III. 2. 1. 2. Lysotypie (426) (470) (474) (475).

Elle est réalisée au Centre National de Référence pour la lysotypie et le typage moléculaire des Listeria à l'Institut Pasteur à Paris.

En 1977, AUDURIER et coll. (12) (13) (14) ont mis au point un système de typage par les bactériophages spécifiques de genre mais non d'espèce et de sérovar (279) car la plupart des souches de Listeria monocytogenes sont lysogènes et, par conséquent, hébergent des prophages ; la lysotypie est donc une sensibilité aux bactériophages isolés de souches lysogènes sachant que certaines souches peuvent libérer plus d'un phage.

La sélection de 29 bactériophages isolés de souches de Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii et Listeria innocua a permis d'identifier des lysovars (370) (371) et de déterminer le phagovar de 54 % des souches de sérogroupe 1/2 et de 77 % des souches de sérogroupe 4.

Les suspensions de phages sont titrées afin de déterminer la dilution test (RTD ou plus grande dilution du phage produisant une lyse semi-confluente de la souche) par application sur les couches de bactéries en phase de croissance logarithmique étalées sur gélose tryptone.

La lecture est effectuée à l'aide d'une lentille manuelle et d'une lumière à transillumination oblique par détermination du nombre et du type de plaques développées sur gélose.

Les résultats sont exprimés ainsi :

- CL = lyse confluente,
- SC = > 200 plaques (lyse semi-confluente),
- ++ = $\geq$ 50 plaques,
- + = 20 à 49 plaques,
- $\pm$ = $\leq$ 19 plaques,
- 0 = < 1 plaque.

Cette procédure fait appel à une série de 12 phages pour le sérovar 1/2 et 15 phages pour le sérovar 4b.

Les phages obtenus à partir des souches de sérogroupe 1/2 typent seulement les souches de ce sérogroupe.

Cette méthode est limitée par le nombre élevé de souches non typables mais elle est fiable, standardisée et est un instrument utile pour tracer l'origine des souches dans les études épidémiologiques permettant ainsi de comprendre les épidémies humaines de listériose en établissant de fortes présomptions d'identité des souches impliquées dans les cas.

Un système danois de typage de Listeria monocytogenes par les phages (214) utilise des phages libérés par induction grâce à la mitomycine C à partir de souches de Listeria monocytogenes cliniques et alimentaires ; celle-ci s'avère être un inducteur plus puissant que les UV (345).

Ce système consiste en deux sous-systèmes : un pour le typage de souches de Listeria monocytogenes de sérogroupe 1 contenant 12 phages et un autre pour le typage des souches de Listeria monocytogenes de sérogroupe 4 contenant 14 autres phages.

La propagation des phages est effectuée à la surface des boîtes de gélose Levinthal (gélose BHIA supplémentée en sang de cheval défibriné) supplémentée en Ca^{2+} et préalablement recouverte de souches à tester.

La gélose Levinthal est la plus appropriée pour observer le contraste entre les plaques de lyse et la couche de croissance bactérienne environnante.

De toutes les conditions étudiées à savoir :

- temps d'incubation : 2, 4 et 6 h,
- dilution : 1/0°, 1/10°, 1/100° et 1/1000°,
- température d'incubation : 22°C, 30°C et 35°C,

seules les boîtes recouvertes avec des cultures en bouillon de 6 h dilué au 1/100° en solution saline à 30°C produisent des couches bactériennes reproductibles d'épaisseur convenable pour la lecture.

Plus de la moitié des phages isolés des souches de sérogroupe 1/2 réagissent avec des souches de sérogroupes 1/2 et 4.

La grande majorité des phages isolés des souches de sérogroupe 4 réagit avec seulement les souches de même sérogroupe.

Les résultats pour les deux sous-systèmes sont respectivement :

- reproductibilité : ≥ 90 % et ≥ 94 %,

- typabilité : 92 % et 87 %,

- pouvoir de discrimination : 80 % et 87 % ; il est estimé par l'index discriminatoire.

Le pouvoir discriminatoire de cette méthode est le plus élevé avec un index discriminatoire (DI) de 0,88 suivie des méthodes REA, MEE et ribotypage avec des valeurs DI de 0,87, 0,83 et 0,79 respectivement (420).

Les souches de sérotype 1/2 sont mieux discriminées par les méthodes de typage moléculaire, en particulier par la REA, avec un DI de 0,92 alors que les souches de sérotype 4 sont mieux discriminées par la méthode de typage par les phages, avec un DI de 0,78.

La combinaison de la REA et de la MEE est la plus discriminante.

Le typage par les phages est une méthode de typage rapide et peu coûteuse mais pas aussi reproductible que les méthodes de typage moléculaire.

Cette méthode est donc celle qui convient le mieux à un screening de masse alors que pour l'étude des relations entre quelques souches, les méthodes de typage moléculaire, REA et MEE seront préférées, en combinaison ou pas.

LOESSNER et coll. (343) (344) (345) ont mis au point une nouvelle méthode de typage ou procédure de typage inversée avec 21 bactériophages.

Les boîtes de typage prêtes à l'emploi sont préparées par pré-application de suspensions de phages sur gélose tryptone puis recouvertes de culture de Listeria en bouillon.

Les boîtes stériles séchées (aucune moisissure à la surface) sont préinoculées avec les suspensions de phages grâce à un applicateur multi-seringue de 4 à 6 µl ; de ce fait, 1 ml de chaque suspension de phage peut permettre de préparer près de 200 boîtes de typage d'où une efficacité deux fois meilleure par rapport à la méthode conventionnelle.

Le glycérol est ajouté aux préparations de phage ; de ce fait, les gouttes appliquées sont rapidement absorbées sur la gélose.

Les boîtes préparées peuvent être directement utilisées ou stockées à 4°C jusqu'à utilisation.

Aucune perte dans l'activité de phage n'est observée pendant un stockage de deux semaines.

Les boîtes sont évaluées sous lumière oblique.

Les particules de phages ne diffusent pas la lumière à travers la gélose ; elles restent dans l'aire circulaire coïncidant avec la goutte d'inoculation.

16 phages sont isolés par technique d'induction UV (A006, B051, B052, B053, B054, B055, B056, B101, B110, B111, A118, A153, D441, A538, B545 et B653) à partir de souches lysogéniques Listeria.

La combinaison de ces 16 phages avec les phages utilisés habituellement permet de réduire le nombre à 21 phages à savoir ; A511, A118, A502, A006, B653, B054, B051, B055, B025, D441, B545, B053, B056, B101, B110, C707, B024, B012, B035, A020, A500 spécifiques de genre pour Listeria monocytogenes, Listeria innocua, Listeria ivanovii, Listeria seeligeri et Listeria welshimeri.

Les phages A118, B110 et B653 sont capables de lyser les souches non typables avec le premier set de phages.

La procédure inversée offre un nombre d'avantages subtanciels.

L'avantage majeur de cette méthode est qu'il est possible de préparer les boîtes dans un laboratoire et de les utiliser dans un autre.

Ces boîtes préparées prêtes à l'emploi rend le clonage et la trituration des phages, difficultés majeures, non nécessaires.

L'évaluation des résultats de la procédure inversée est simplifiée par le fait que les réactions inhibitrices sont réduites.

Les réactions communes dans le typage par les phages sont dues à la présence de bactériocines ou autres substances inhibitrices et/ou protéines libérées par les cellules hôtes lysées.

La typabilité des souches est de 89,5 % avec 21 bactériophages.

Cette méthode, comparée à la méthode traditionnelle est plus fiable, plus efficace, plus facile à utiliser et demande moins de travail donc représente un intérêt pour le microbiologiste mais ces deux méthodes sont en accord puisque 97,6 % des souches typables montrent le même schéma par ces deux procédures (171).

III. 2. 2. METHODES DE TYPAGE MOLECULAIRE.

Elles permettent :

- de confirmer l'émergence d'un clone responsable de l'augmentation des cas humains,

- d'identifier avec plus de certitude l'aliment suspect,

- de caractériser la souche dans un but taxonomique.

Ces méthodes sont :

- l'analyse de la mobilité électrophorétique des enzymes constitutives (Multilocus Enzyme Electrophoresis) ou typage électrophorétique des enzymes,

- le ribotypage,

- l'analyse des profils de restriction d'ADN chromosomique après digestion avec des enzymes à très nombreux sites de coupure et électrophorèse conventionnelle ou après digestion avec des enzymes reconnaissant peu de sites de restriction et électrophorèse en champ pulsé,

- la technique de génération de polymorphisme par amplification au hasard de segments d'ADN (RAPD) constituant une alternative à la lysotypie (amplification génique aléatoire),

- les réactions immunoenzymatiques faisant appel à des anticorps monoclonaux,

- les profils plasmidiques mais on connaît encore peu de plasmides chez Listeria monocytogenes,

- la cytométrie en flux.

Ces méthodes ne sont employées que dans des situations épidémiques.

III. 3. DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE.

On recense :

- la séroagglutination : elle fait appel à des anticorps dirigés contre les antigènes O et H des types 1 et 4b, mais la présence d'anticorps est inconstante car certains sujets indemnes ont des titres élevés et d'autres ayant contracté l'infection ne produisent pas d'anticorps ; on ne prend en considération que les titres ≥ à 320 ou une montée significative du titre des anticorps à 15 jours d'intervalle.

Il existe des faux positifs du fait des communautés antigéniques avec les bactéries à Gram positif comme les Staphylocoques et les Entérocoques.

Le laboratoire OSIBIO propose une méthode utilisant des sérums anti-Listeria O types 1, 4 et Poly ou antiglobulines de lapin, de titre élevé, stables et déshydratées pour l'identification de Listeria monocytogenes par la technique d'agglutination sur lame et en tube (Annexe V).

Les sérums 1 et 4 sont spécifiques de ces sérotypes tandis que le Poly contient les agglutinines des sérotypes 1 et 4 de Listeria monocytogenes.

Les antigènes Listeria O types 1 et 4 sont des suspensions de Listeria monocytogenes de sérotypes correspondants, ajustées au pH et à la densité recommandés.

L'échantillon à tester est cultivé dans un bouillon ou sur une gélose tryptonée.

La lecture est effectuée après une incubation de 2 heures à 50°C pour la technique en tube alors qu'elle est immédiate pour celle sur lame.

L'agglutinotest Listeria ou Tetrakit du laboratoire OSI est constitué d'une suspension stabilisée de particules de latex de polystyrène sur lesquelles sont adsorbés les déterminants antigéniques les plus significatifs du genre Listeria c'est-à-dire les antigènes 1 et 4, O et H ; ce test se fait sur lame (Annexe VI).

Cette méthode est souvent pratiquée chez la femme enceinte mais le résultat étant aléatoire et tardif, elle est de plus en plus remplacée par un isolement de la bactérie par hémoculture lors de l'épisode fébrile.

Cette méthode peut aussi faire appel à des anticorps fluorescents Listeria Poly utilisés en technique directe d'immunofluorescence pour l'identification de Listeria monocytogenes de sérotypes 1 ou 4 (laboratoire OSIBIO) (Annexe V).

Ces anticorps fluorescents sont des antiglobulines Listeria de lapin, stables, déshydratées, de titre élevé et conjuguées à la fluorescéine.

Après frottis de l'échantillon sur lame ou dépôt de la culture mise en suspension dans un tampon, sont ajoutés les anticorps conjugués puis l'incubation est réalisée 30 minutes à température ambiante.

Il existe aussi un test ELISA par chimioluminescence dans lequel l'anticorps monoclonal anti-Listeria capture l'antigène du LCR ; celui-ci réagit avec l'isothiocyanate de fluorescéine conjuguée au même anticorps monoclonal anti Listeria (FITC-anti FITC) (492).

La présence d'antigène est détectée par un essai de chimioluminescence utilisant un luminomètre.

RUSSEL (485) a comparé le test d'anticorps immunofluorescents (IFAT) et le test ELISA pour la détection des anticorps et a montré que le test ELISA est moins spécifique que le test IFAT.

- les réactions de fixation du complément pour lesquelles le taux significatif est de 1/10°,

- les épreuves de détection de l'hypersensibilité retardée par réaction cutanée utilisant des extraits bactériens mais pas effectuées en pratique courante,

- la réaction dot-blot utilisant la listériolysine O comme antigène.

6ème PARTIE :

TRAITEMENT

I. BASE BACTERIOLOGIQUE ET PHARMACOCINETIQUE DU CHOIX DES ANTIBIOTIQUES. (55) (479) (566)

I. 1. ASPECT BACTERIOLOGIQUE OU SENSIBILITE.

Listeria monocytogenes est une bactérie très sensible et sa sensibilité reste stable.

Toutefois, des plasmides de résistance ont été démontrés pour le chloramphénicol, l'érythromycine, la streptomycine et les tétracyclines (175) mais pas pour les bêtalactamines bien que quelques souches résistantes à l'ampicilline (459) aient été décrites.

Le diagnostic doit être établi très vite de manière à instituer une thérapeutique précoce donc efficace.

Le choix thérapeutique est fondamental et repose sur l'antibiothérapie.

Le traitement doit être adapté, efficace et bien supporté donc l'utilisation d'un antibiotique actif contre le germe est de rigueur et la connaissance de son pouvoir de diffusion dans les tissus et principalement à travers la barrière méningée en vue de l'obtention d'un taux de concentration suffisant est nécessaire.

L'activité bactéricide et bactériostatique de l'antibiotique est déterminée par l'antibiogramme minimum standard qui comporte habituellement les antibiotiques suivants : pénicilline G, chloramphénicol, gentamycine, tétracycline, érythromycine, triméthoprime, sulfaméthoxazole et éventuellement clindamycine étant donné la résistance naturelle de Listeria monocytogenes vis-à-vis de ce dernier ; la lecture est effectuée après 18 heures d'incubation à 35°C.

La sensibilité peut être déterminée par la méthode de diffusion sur gélose MUELLER HINTON supplémentée avec 5 % de sang de mouton défibriné suivie d'une incubation de 20 heures à 35°C.

Une étude suite à l'épidémie Suisse (479) a permis de mesurer les CMI de 20 antibiotiques vis-à-vis de 74 souches de Listeria monocytogenes isolées lors de cette épidémie, par cette méthode.

Toutes les souches ont été sensibles entre autres aux pénicillines et à l'association triméthoprime - sulfaméthoxazole.

Par contre, elles ont été résistantes aux céphalosporines.

Aucun effet bactéricide n'a été obtenu avec les antibiotiques utilisés seuls mais les associations ampicilline - gentamycine, amoxicilline - gentamycine, imipénème - gentamycine et triméthoprime - sulfaméthoxazole ont été bactéricides.

L'association ampicilline - rifampicine est à peine antagoniste. (Tableau XII)

Tableau XII : Activité inhibitrice de 20 antibiotiques vis-à-vis de 74 souches cliniques de Listeria monocytogenes isolées en Suisse.

	Concentration Minimale Inhibitrice (µg/ml)		
Antibiotique	Valeurs limites	CMI 50 %	CMI 90 %
Pénicilline	0.06-0.5	0.25	0.5
Ampicilline	0.12-0.5	0.25	0.5
Amoxicilline	0.12-0.5	0.25	0.25
Amoxicilline + Ac. clavulanique	0.12/0.06-0.25/0.12	0.25/0.12	0.25/0.12
Pipéracilline	0.5-4	4	4
Céfalotine	1-4	4	4
Céfoxitine	8-64	64	64
Ceftriaxone	8-128	64	128
Imipeneme	0.03-0.25	0.12	0.12
Gentamicine	0.25-1	0.5	0.5
Chloramphénicol	4-8	8	8
Erythromycine	0.12-0.25	0.25	0.25
Roxithromycine	0.25-0.5	0.5	0.5
Sulfaméthoxazole	16-32	16	32
Triméthoprime	0.03-0.25	0.06	0.06
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	0.03/0.57-0.12/2.28	0.03/0.57	0.06/1.14
Ciprofloxacine	0.5-2	1	1
Rifampicine	0.03-0.25	0.12	0.12
Vancomycine	1-2	2	2
Teicoplanine	0.25-0.5	0.5	0.5

Listeria monocytogenes est inhibée "in vitro" par de nombreux antibiotiques incluant les pénicillines G et A (CMI 90 < 0,5 µg/ml), les cyclines (CMI 90 < 0,25 µg/ml), les macrolides (CMI 90 < 0,25 µg/ml), le chloramphénicol (CMI 90 = 8), les aminosides (CMI 90 <1), la vancomycine (CMI = 1), la triméthoprime et le cotrimoxazole.

En revanche, les céphalosporines ne sont généralement pas actives in vitro envers Listeria monocytogenes.

Ceci est tout à fait net avec les céphalosporines de deuxième et troisième générations (CMI 90 > 128 µg/ml).

Bien que certaines céphalosporines de première génération aient des CMI acceptables (2 à 4 µg/ml pour la céfaloridine et la céfazoline, 8 µg/ml pour la céfalotine), elles s'avèrent incapables de modifier le cours évolutif d'une listériose expérimentale (297).

Deux autres produits par ailleurs actifs sur les bactéries à Gram positif possèdent une remarquable activité in vitro envers Listeria monocytogenes ; il s'agit de la rifampicine (263) et de la coumermycine (CMI = 0,06) (264).

MOELLERING et coll. (398) puis BOISIVON (62) ont montré que la pénicilline et l'ampicilline étudiées à concentration thérapeutique n'exercent pas d'activité bactéricide envers Listeria monocytogenes.

Ceci est également observé pour les cyclines, le chloramphénicol et les macrolides.

En revanche, l'association ampicilline - gentamycine, de même que le cotrimoxazole exercent une synergie bactéricide "in vitro" tout à fait nette.

A l'inverse, les associations ampicilline - chloramphénicol (601) et ampicilline - rifampicine seraient régulièrement antagonistes envers Listeria monocytogenes.

En résumé, parmi les bêtalactamines, les molécules les plus actives sont les pénicillines A (amoxicilline et ampicilline) avec des CMI basses ; elles sont bactériostatiques dans les premières heures mais deviennent bactéricides après 24 h de contact pour des concentrations nettement supérieures à la CMI.

Les uréidopénicillines et les carboxypénicillines, l'imipénème et la pénicilline G sont actifs avec des CMI moins favorables que les précédentes.

Les céphalosporines de première et deuxième générations sont peu efficaces alors que celles de troisième génération doivent être proscrites du fait de leurs CMI élevées.

Les aminosides du groupe gentamycine, tobramycine sont très actifs (CMI basses) et présentent un effet bactéricide rapide ; ils sont synergiques avec les pénicillines A.

Les macrolides tels que l'érythromycine, de même que le chloramphénicol et les tétracyclines sont bactériostatiques et d'efficacité intermédiaire.

La fosfomycine et les fluoroquinolones sont peu actives, de même que les nouvelles quinolones (péfloxacine) et l'acide nalidixique, la polymyxine et la colimycine.

La rifampicine, d'excellente activité, n'est que bactériostatique.

L'association triméthoprime - sulfaméthoxazole bactéricide peut être utilisée en alternative aux pénicillines A, associée ou non aux aminosides.

La vancomycine a été utilisée dans quelques cas avec succès, mais un cas de méningite d'un sujet traité avec la vancomycine et la gentamycine pour une infection à Staphylococcus aureus à la suite d'un cathétérisme cardiaque a été rapporté.

On remarque aussi que parmi les antibiotiques actifs, aucun pris isolément n'a d'activité bactéricide in vitro.

Une bactéricidie est donc obtenue avec les associations amoxicilline - gentamycine, triméthoprime - sulfaméthoxazole, gentamycine - triméthoprime - sulfaméthoxazole, amoxicilline - triméthoprime - sulfaméthoxazole, rifampicine - triméthoprime - sulfaméthoxazole, imipénème - gentamycine avec un effet synergique.

Par contre, les associations rifampicine - ciprofloxacine et amoxicilline - ciprofloxacine sont bactéricides.

Les associations d'une bêtalactamine avec du chloramphénicol ou de la rifampicine ou de l'érythromycine ou une tétracycline sont antagonistes.

I. 2. ASPECT PHARMACOCINETIQUE.

L'antibiothérapie se heurte à trois difficultés :

- le site intracellulaire de Listeria monocytogenes,
- les localisations neurologiques rendant le franchissement de la barrière hémoméningée obligatoire,
- le terrain souvent immunodéprimé,

d'où le triple impératif de prescrire une antibiothérapie :

- ayant un taux de pénétration intracellulaire suffisant,
- franchissant bien la barrière hémoméningée,
- assurant une bactéricidie in vivo.

Cette exigence pharmacocinétique comporte deux versants :

- de façon générale, Listeria monocytogenes est source d'infection à localisations intra et extracellulaires.

L'antibiotique doit pouvoir éradiquer les bactéries non seulement dans les liquides interstitiels et les compartiments transcellulaires mais également dans les cellules macrophagiques.

De nombreuses études ont prouvé que les bactéries phagocytées par les polynucléaires sont protégées de l'action des bêtalactamines présentes dans le milieu extracellulaire.

Par contre, il a été démontré que la pénicilline peut tuer une souche virulente de Listeria monocytogenes dans les macrophages de la souris à condition que la concentration soit plus de trois fois la CMI.

La situation intracellulaire de Listeria monocytogenes ne semble donc pas être un obstacle à l'emploi des bêtalactamines ; de même, le cotrimoxazole, la rifampicine, les cyclines, les macrolides et le chloramphénicol pourront également être utilisés du fait de leur bonne pénétration intracellulaire.

- les listérioses neuroméningées sont des infections à la fois intraméningées et intracérébrales dont les séquelles et les évolutions fatales sont généralement dues à l'atteinte cérébrale.

Les antibiotiques employés doivent donc accéder à concentration suffisante et ceci pendant toute la durée du traitement au sein de ces deux structures, lesquelles ne possèdent pas un comportement identique face aux antibiotiques.

L'état inflammatoire du territoire méningé avec hypercytose et hyperprotéinorachie majore le passage des bêtalactamines surtout dans le LCR et des aminosides mais seulement en phase aiguë d'inflammation méningée pour ces derniers alors qu'il n'influence pas le passage du triméthoprime dans le LCR.

Au niveau cérébral, le passage des antibiotiques dépend de facteurs physico-chimiques comme le degré de liposolubilité qui intervient de façon plus importante que dans le cas du passage hémoméningé.

Le chloramphénicol est plus concentré dans le tissu cérébral que dans le LCR alors que la pénicilline G a une moins bonne concentration cérébrale que méningée.

Les concentrations intrathécales de triméthoprime et de sulfaméthoxazole représentent respectivement 40 % et 20 % de la concentration sérique.

Ainsi, la pénicilline, l'amoxicilline, le chloramphénicol, la rifampicine, l'imipénème, le triméthoprime et les quinolones ont un comportement pharmacocinétique favorable alors qu'il est défavorable pour les cyclines, les aminosides, les macrolides et la vancomycine.

Les diffusions placentaire et fœtale sont satisfaisantes pour l'amoxicilline.

II. TRAITEMENTS DES DIFFERENTES SITUATIONS CLINIQUES. (55)

L'usage est d'utiliser pour le traitement des formes sévères (neuroméningée, materno-fœtale) et/ou survenant chez l'immunodéprimé une association d'ampicilline ou d'amoxicilline et d'aminoside.

II. 1. LISTERIOSE NEUROMENINGEE.

C'est un traitement d'urgence reposant sur l'association amoxicilline (200 mg/kg/j) en six perfusions courtes et d'un aminoside type streptomycine, gentamycine, framycétine (6 mg/kg/j) par voie intraveineuse, générale et/ou intrathécale.

La durée n'est pas clairement codifiée mais, en général, elle est de 3 à 4 semaines pour éviter toute récidive éventuelle.

En cas d'allergie aux bêtalactamines ou de forme encéphalitique dominante, l'association chloramphénicol - aminoside peut être proposée.

Le cotrimoxazole (2 x 240 mg/j quelques jours puis 2 x 2 comprimés à 800 mg/j pendant 2 à 4 semaines) par voie intraveineuse est une alternative intéressante, de même que l'association amoxicilline - cotrimoxazole en intraveineuse ; cela reste préférable pour traiter les listérioses neuroméningées lorsque les signes d'inflammation méningée ont rétrocédé.

Exceptionnellement, on fera appel à la corticothérapie indiquée lors de décompensation cardiorespiratoire.

La rifampicine est un médicament potentiellement intéressant dans ce cas de figure mais il n'existe pas d'étude clinique documentant son efficacité.

De plus, les associations rifampicine - quinolone ou rifampicine - cotrimoxazole mériteraient une attention particulière en raison de leur excellent comportement pharmacocinétique et justifieraient des études bactériologiques expérimentales et cliniques faisant défaut actuellement.

II. 2. SEPTICEMIE A LISTERIA.

Pour certains, une monothérapie par amoxicilline serait suffisante dans de nombreux cas, l'addition d'un aminoside n'étant indiquée qu'en cas de facteurs de mauvais pronostic (âge > à 50 ans, maladie sous-jacente, greffe rénale, défaillance cardiaque, rénale ou respiratoire).

II. 3. LISTERIOSE NEONATALE.

Devant une infection précoce (premières 48 h), le traitement doit être débuté en urgence, après réalisation des divers prélèvements et faire appel à une amoxicilline ou une uréidopénicilline par voie intraveineuse.

On peut aussi proposer la triple association amoxicilline, céphalosporine de troisième génération et aminoside.

Le traitement de référence de la listériose systémique précoce et de la méningite néonatale est l'association amoxicilline (200 mg/kg/j) par voie parentérale (IM ou IV) et gentamycine (3 mg/kg/j) en deux injections par voie intramusculaire et la durée est de 10 jours en cas de septicémie et d'au moins 3 semaines devant une méningite.

On associe généralement un traitement symptomatique de la détresse respiratoire et des traitements généraux telle qu'une exsanguinotransfusion en cas d'ictère ou de syndrome hémorragique de manière à stimuler les moyens de défense de l'enfant en lui apportant des agents anti-infectieux ou des éléments figurés actifs.

L'antibiothérapie doit tenir compte de divers facteurs :

- absorption digestive plus lente,

- vitesse de diffusion des injections intramusculaires irrégulières,

- grandes variations du volume des liquides extracellulaires modifiant les concentrations sériques et tissulaires,

- hypoalbuminémie laissant une partie de l'antibiotique libre,

- immaturité enzymatique hépatique conduisant à un retard d'élimination,

- immaturité rénale avec risque d'accumulation.

II. 4. LISTERIOSE DE LA FEMME ENCEINTE (MENINGITE EXCLUE).

La prescription d'amoxicilline par voie orale pendant 10 jours et la pratique d'hémoculture doit être systématique devant toute fièvre isolée inexpliquée persistant plus de 5 jours ou devant tout état pseudogrippal (fièvre, frissons, courbatures) survenant chez une femme enceinte.

Dans le cas où les hémocultures sont positives, on associe amoxicilline (6 à 12 g/j) et gentamycine (4 mg/kg/j) par voie intraveineuse pendant 15 jours.

Certains préconisent une poursuite de l'amoxicilline (4 g/j) per os jusqu'à terme dans le cas où la listériose survient au cours du troisième trimestre de la grossesse.

Un macrolide sera utilisé en cas d'allergie à la pénicilline.

Les antibiotiques utilisés chez la femme enceinte doivent être :

- efficaces sur l'infection maternelle,

- diffusibles à travers la barrière placentaire,

- bactéricides,

- dépourvus de toxicité pour le fœtus (pas de tétracyclines en raison de leur action nocive sur les phanères et le squelette).

II. 5. LISTERIOSE DE L'IMMUNODEPRIME.

L'association amoxicilline - aminoside aux doses citées précédemment est de rigueur bien que le cotrimoxazole par voie intraveineuse semble être une alternative intéressante chez les patients immunodéprimés.

L'association ampicilline - aminoglycoside reste le traitement de référence.

En cas d'intolérance aux bêtalactamines, de résistance primaire à l'ampicilline ou d'échec secondaire à l'association ampicilline - gentamycine, le cotrimoxazole trouve une excellente indication bactériologique et pharmacocinétique en cas de listériose neuroméningée.

Le chloramphénicol associé aux aminosides reste une alternative envisageable pour les formes encéphalitiques graves.

Enfin, la rifampicine, en association avec les quinolones ou le cotrimoxazole, mériterait d'être évaluée.

7ème PARTIE :

PROPHYLAXIE

I. MEDICALE. (55)

I. 1. VACCINATION.

Des essais de vaccination ont été tentés chez la souris (226), pour l'instant sans succès.

Chez l'animal, la prophylaxie vaccinale est encore du domaine expérimental ; elle ne se justifie pas du fait du prix élevé des vaccins.

I. 2. IMMUNITE. ALLERGIE.

Listeria monocytogenes est un parasite intracellulaire facultatif ; il n'est pas détruit par les macrophages.

Cette résistance appelée "résistance cellulaire acquise" est proche de l'hypersensibilité retardée et du mécanisme de rejet des greffes d'où la fréquence plus élevée chez les sujets immunodéprimés.

Listeria monocytogenes est un germe peu antigénique n'entraînant pas de stimulation importante des mécanismes de défense immunologique ; l'immunité est essentiellement de type cellulaire ; elle est spécifique en empêchant toute réinfestation d'une souris immunisée et non spécifique en protégeant l'organisme des infections à Brucella, Mycobactéries et champignons à développement intracellulaire.

On a remarqué que la vaccination par le BCG aurait pour conséquence une protection contre Listeria.

I. 3. PREVENTION DE L'INFECTION GRAVIDIQUE.

Elle est primordiale du fait du retentissement infectieux sévère chez le fœtus et du dépistage systématique par prélèvement vaginal ou par sérologie decevant et peu rentable.

Elle repose sur l'amélioration du pronostic de la listériose néonatale par :

- un dépistage systématique et un traitement précoce de l'infection maternelle ; cela consiste en une hémoculture principalement mais aussi un examen cytobactériologique des urines, des prélèvements nasopharyngés, vaginaux (culs de sac et col) ainsi qu'une antibiothérapie par ampicilline systématique devant tout épisode fébrile de la femme enceinte.

- un examen anatomique et bactériologique (frottis et culture) systématique du placenta, des prélèvements effectués au niveau des muqueuses (buccale, anale, vulvaire, nasale) et des prélèvements de sang et de LCR dès l'accouchement en présence d'un prématuré fébrile ; la positivité de ces examens permettra d'instituer une thérapeutique précoce du nouveau-né et de la mère infectés ; cela constitue une prévention efficace.

On peut réaliser une antibiothérapie pendant le travail ou une immunisation de la mère au cours du troisième trimestre de la grossesse ; ceci est à l'étude.

L'antibiothérapie de trois semaines par l'ampicilline de la mère contrôlée par la négativation des prélèvements cervicaux permet d'éviter une nouvelle atteinte du fœtus lors d'une grossesse ultérieure dans le cas où le diagnostic n'est fait que pendant ou après l'accouchement.

Enfin, certains préconisent une antibiothérapie prophylactique mais elle est jugée dangereuse par d'autres (66) (543).

II. SANITAIRE. (55)

II. 1. MESURES PARTICULIERES.

Elles émanent du Laboratoire National de la Santé pour la France et du "Center for Disease Control" pour les Etats-Unis et touchent deux catégories de personnes.

Les mesures concernant toutes les personnes sont les suivantes :

- cuire soigneusement les aliments d'origine animale,

- laver soigneusement les légumes crus et les herbes,

- conserver séparément les viandes non cuites des légumes et des aliments cuits ou prêts à être consommés,

- éviter la consommation de lait cru ou d'aliments au lait cru,

- laver mains, couteaux et planches à découper après la manipulation d'aliments non cuits,

- nettoyer fréquemment (au moins deux fois par mois) et désinfecter ensuite avec de l'eau javellisée le réfrigérateur.

Les personnes à risque (femmes enceintes, immunodéprimés et personnes âgées) doivent en plus :

- ne pas consommer en l'état les produits de charcuterie cuite (jambon, épaules cuites tranchées sur les lieux de vente, pâté, produits en gelée) et leur préférer des produits préemballés,

- réchauffer jusqu'à ébullition avant consommation les restes alimentaires ou les aliments prêts à être consommés,

- ne pas consommer d'aliments ayant séjournés dans le réfrigérateur plus longtemps que la date limite de consommation,

- enlever la croûte des fromages,

- éviter les fromages à pâte molle et les bleus et leur préférer les fromages à pâte cuite ou fondue qui ont subi un traitement thermique détruisant les Listeria,

LES 24 FROMAGES MIS A L'INDEX

Fromages suisses à pâte molle retirés de la vente :
Munsterlinger Mönchen-Mutschli ; Coraul de Gruyère ; Vacherin fribourgeois ; Reblochon.
Fromages suisses à pâte dure ou midure encore dans le commerce :
Rutti Vacherin; Rutti raclette; Rutti Tilsiter.
Fromages français à pâte molle retirés de la vente en Suisse :
Touré de l'Aubier ; Munster Jerome Lisbeth ; Crème de Bleu Diapason ; Demi-Pont l'Evêque ; Pont d'Auge Pierre Levasseur ; Munster ermitage ; Brie la Renommée Xertigny ;
Marquis de Crémembert Saint Hubert ; Edelweiss de Cléron (petit vacherin) ; Brie Président.

Fromages français à pâte persillée, retirés de la vente en Suisse :
Léger Bresse Bleu Servas ; Bresse Bleu Servas ;
Fourme Bresse Bleu Servas ; Blubry's Bresse Bleu.
Fromage italien à pâte molle retiré de la vente en Suisse :
Gorgonzola Impérial.
Fromage autrichien à pâte molle retiré de la vente en Suisse :
Saint Paulin.
Fromages français interdits en Suède et en Allemagne :
Fourme de Bresse (listeria trouvées) ; Vacherin et Touré de l'Aubier (présomption de contamination). Le Lys Bleu, un moment suspecté par la Suède, a été, depuis, lavé de tout soupçon. ■

QUE CHOISIR ?
(Janvier 88)

Les femmes enceintes doivent également consulter un médecin tout de suite en cas de poussée de fièvre isolée sans cause évidente ou accompagnée de syndromes méningés.

Celui-ci fera effectuer une hémoculture et une recherche de germes au site infectieux en connaissant la faible rentabilité du prélèvement vaginal.

En milieu obstétrical, il convient d'être particulièrement vigilant à la désinfection de la salle d'accouchement, du matériel obstétrical et aux soins donnés aux nouveau-nés en nourricerie en raison du risque d'infection nosocomiale.

Effectivement, il est nécessaire d'instaurer des consignes d'hygiène rigoureuses en salle de travail et lors des soins aux nouveau-nés pour éviter tout risque de transmission à un stade où l'infection n'est souvent ni connue ni même suspectée ;

- hygiène des mains rigoureuse,

- utilisation de matériel à usage unique,

- nettoyage et désinfection corrects des surfaces et du matériel d'examen ou de soins à usages multiples,

- organisation des locaux de façon à pouvoir examiner les nouveau-nés dans leur chambre en évitant les contacts avec les autres.

II. 2. MESURES GENERALES.

La prophylaxie sanitaire comporte :

- le dépistage et le traitement des animaux malades ou porteurs de germes,

- la désinfection des locaux, des pâturages, du matériel,

- le contrôle des ensilages,

- l'assainissement des eaux potables et usées,

- la destruction des produits d'avortement,

- la lutte contre les rongeurs,

- le contrôle des engrais et des sols,

- la protection du personnel vétérinaire et du personnel des abattoirs et d'autres industries alimentaires,

- les enquêtes sérologiques et bactériologiques réalisées dans l'entourage des malades permettant de déceler les porteurs sains,

- la désinfection des locaux de l'hôpital et des crèches lors de la survenue d'une listériose,

- la prévention de l'infection gravidique,

- l'hygiène de l'habitat, des matériels de fabrication,

- le nettoyage et la désinfection des usines,

- la désinfection des caves d'affinage ; celle-ci est plus difficile que celle des autres lieux de fabrication car il faut conserver les "bonnes" bactéries et éliminer les "mauvaises" ; la cave sera ensuite réensemencée avec des bactéries nécessaires à l'affinage des fromages,

- le contrôle des denrées alimentaires ; l'éradication de Listeria des produits alimentaires est la base de la prévention ; elle repose sur l'application de traitements listéricides (chauffage ou irradiation) ou listériostatiques (acidification, congélation) en fonction du type d'aliments considérés.

Cette éradication s'exerce à différents niveaux :

- aux différentes étapes de la chaîne alimentaire qu'il s'agisse de la production (traite, élevage), de la transformation, de la logistique (transport, entrepôt), de la distribution (coupe) avec la mise en place d'un système global de prévention (assurance qualité),

- au niveau du consommateur comme nous l'avons vu précédemment.

Cette éradication sera traitée en détail dans la 8ème partie au § VII.

Nous pouvons également citer le rôle primordial du bactériologiste dans la surveillance épidémiologique des cas de listériose afin d'éviter la dispersion d'une épidémie.

Il doit, en effet :

- envoyer régulièrement toutes les souches de Listeria monocytogenes, isolées de patients, au Centre National de Référence,

- contacter la Direction Générale de la Santé et le Laboratoire National de la Santé lors d'une augmentation anormale du nombre de cas, afin d'éviter l'évolution vers une épidémie.

La prévention repose donc essentiellement sur des mesures individuelles pour la contamination directe et la surveillance de la qualité des denrées alimentaires, autant de mesures difficiles à observer en raison de la distribution de la bactérie dans la nature et de sa résistance.

8ème PARTIE :

LISTERIA DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

I. CONTAMINATION DES DENREES ALIMENTAIRES.

I. 1. ORIGINE DE LA CONTAMINATION. (97)

Listeria monocytogenes est un germe banal de l'environnement ainsi qu'un germe saprophyte que l'on peut isoler de la surface des sols humides, boueux, incultes ou en jachère, de la plupart des végétaux, principalement les feuilles fanées ou en voie de décomposition mais, de façon moins fréquente des sols cultivés.

La contamination des ensilages est donc fréquente et ceci d'autant plus que ces derniers auront été préparés sans précaution, seront souillés de terre ou insuffisamment tassés.

Elle peut atteindre 12000 à 100000 germes par gramme et peut persister des années.

On a également remarqué que des ensilages de bonne qualité mais dont le pH est inférieur à 4 peuvent contenir des Listeria, mais à des taux tout de même moindres.

Les effluents sont fréquemment contaminés (élevages, abattoirs, industries alimentaires diverses).

Les traitements d'épuration n'affectent que peu ou pas les Listeria donc elles sont retrouvées dans presque la totalité des eaux de surface, rivières, lacs et canaux.

La pérennité de la contamination du milieu extérieur est assurée par les apports constants issus des activités humaines et l'existence de réservoirs animaux domestiques ou sauvages.

Le portage sain s'effectue au niveau du tube digestif et de l'appareil respiratoire, et ceci aussi bien chez les hommes que chez les animaux.

Les matières premières des industries alimentaires peuvent également être contaminées :

- les viandes, le lait et les produits animaux, consommés en l'état, du fait des techniques de production comme le phénomène de bactériémie ou une erreur dans la technologie de production des denrées telles que la contamination de la surface des viandes par des matières fécales lors de l'éviscération ou le rinçage des rayons contaminés par le lait lors de la traite.

Listeria est aussi présente de façon inévitable dans les filières.

- les produits transformés crus, préparés à partir de matières premières variées, manipulés, stockés au froid, transportés, présentent un risque de contamination plus élevé ainsi qu'une intensité plus grande.

- les produits transformés cuits ayant subi un chauffage à cœur au moins équivalent à un traitement de pasteurisation sont en principe exempts de Listeria.

Cependant, les possibilités de recontamination après cuisson sont multiples :

- par les locaux et le matériel nettoyés selon un protocole inadéquat ou lorsque le même local héberge plusieurs types de fabrication (produits crus et produits cuits); c'est le cas des tapis roulants,

- par l'ambiance : eau (conduites d'eau, prises d'eau, condensations), air véhiculant des poussières ou des aérosols contaminés d'où l'importance de maîtriser les flux,

- par certains vecteurs animés comme l'homme vecteur actif (porteur sain) ou passif, transmettant une contamination d'un milieu à un autre, mais aussi les insectes et les rongeurs.

La maîtrise des Listeria dans ce type de produits est essentielle car les germes introduits accidentellement rencontrent un substrat nutritif et des conditions favorables pour leur développement (milieux riches, absence de flore compétitive, stockage long à température basse).

I. 2. FREQUENCE DES CONTAMINATIONS. (97)

I. 2. 1. PRODUITS CARNES.

L'isolement de Listeria à partir des carcasses est classique comme le montrent les chiffres suivants :

- jusqu'à 57 % des carcasses de volailles,

- de 6 à 30 % des carcasses de bovins,

- près de 5 % des carcasses de porcs,

Il semble qu'un prélèvement effectué par écouvillonnage de la surface d'une carcasse, peu de temps après l'abattage, ne permette pas d'isoler Listeria alors que le prélèvement de lambeaux superficiels après quelques heures de réfrigération le permet.

La contamination est soit d'origine fécale au moment de la préparation des carcasses sur la chaîne, soit due à l'environnement au cours de la réfrigération et du stockage du fait des manipulations, des contacts avec des carcasses ou d'autres surfaces polluées ou de l'entreposage dans une atmosphère contaminée (poussières et aérosols).

Des prélèvements ont été effectués dans deux abattoirs suisses pour bovins et porcins et examinés quant à la présence de Listeria monocytogenes et autres Listeria spp. (219) ; l'abattoir 1 est une exploitation importante et moderne tandis que l'abattoir 2 est plus petit et plus traditionnel (Figures 3, 4, 5) (Tableaux XIII, XIV).

931 échantillons de peaux, carcasses, organes et contenus intestinaux de bovins et de porcins et 247 échantillons de l'environnement (équipement, surfaces de travail, sol, parois) ont été collectés.

Tableau XIII : Contamination des bovins analysés.

Paramètre	n	Listeria spp. (%)	L. innocua	L. monocytogenes (%)
Contenu intestinal	24	2 (8.3%)	2	0
Rate	24	0	0	0
Poumons	24	2 (8.3%)	1	1 (4.2%)
Peau de l'animal vivant	32	5 (15.6%)	4	1 (3.1%)
Peau après saignée	56	24 (42.8%)	18	8 (14.3 %)
Carcasse après dépouillement	32	0	0	0
Carcasse au pesage	32	1 (3.1%)	1	0
Carcasse en local frigorifique	80	1 (1.2%)	1	0

Figure 3 : Contamination par Listeria spp. des carcasses bovines de l'abattoir 1.

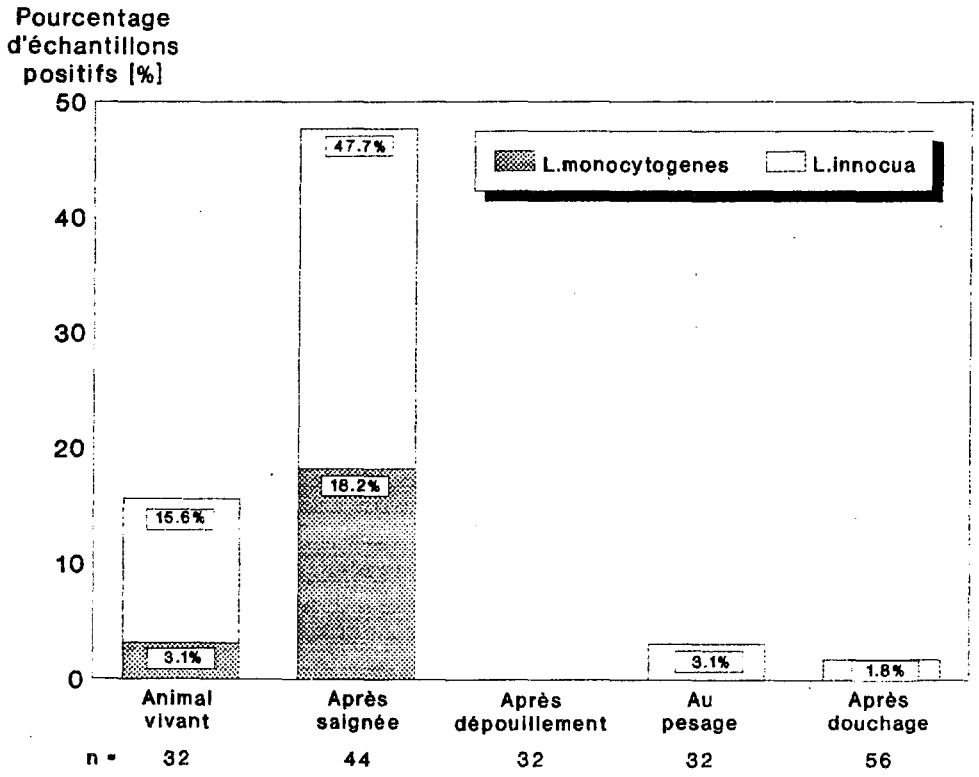


Tableau XIV : Contamination des porcins analysés.

Paramètre	n	Listeria spp. (%)	L. innocua	L. monocytogenes (%)
Contenu intestinal	30	2 (6.7%)	2	0
Rate	36	1 (2.8%)	1	0
Poumons	36	3 (8.3%)	3	0
Amygdales	17[1)]	1 (5.9%)	1	0
Musculature	36	0	0	0
Peau de l'animal vivant	56	13 (23.2%)	13	0
Peau après saignée	92	47 (51.1%)	41	9 (9.8%)
Peau après épilage	24	0	0	0
Peau après suspension	74	4[1)] (5.4%)	3	1 (1.3%)
Peau après flambage	42[2)]	0	0	0
Peau au pesage	56	1 (1.8%)	1	0
Peau en local frigorifique	92	8 (8.7%)	2	6 (6.5%)
Carcasse: face interne	36	1 (2.8%)	1	0

1) = uniquement de l'abattoir 2
2) = uniquement de l'abattoir 1

Figure 4 : Contamination par Listeria spp. des carcasses porcines de l'abattoir 1.

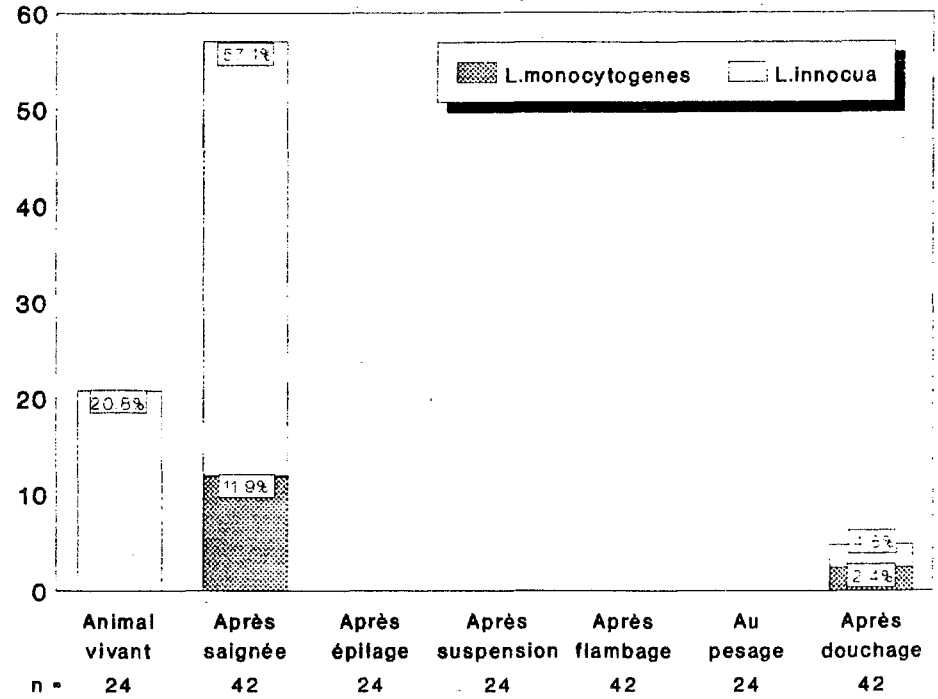
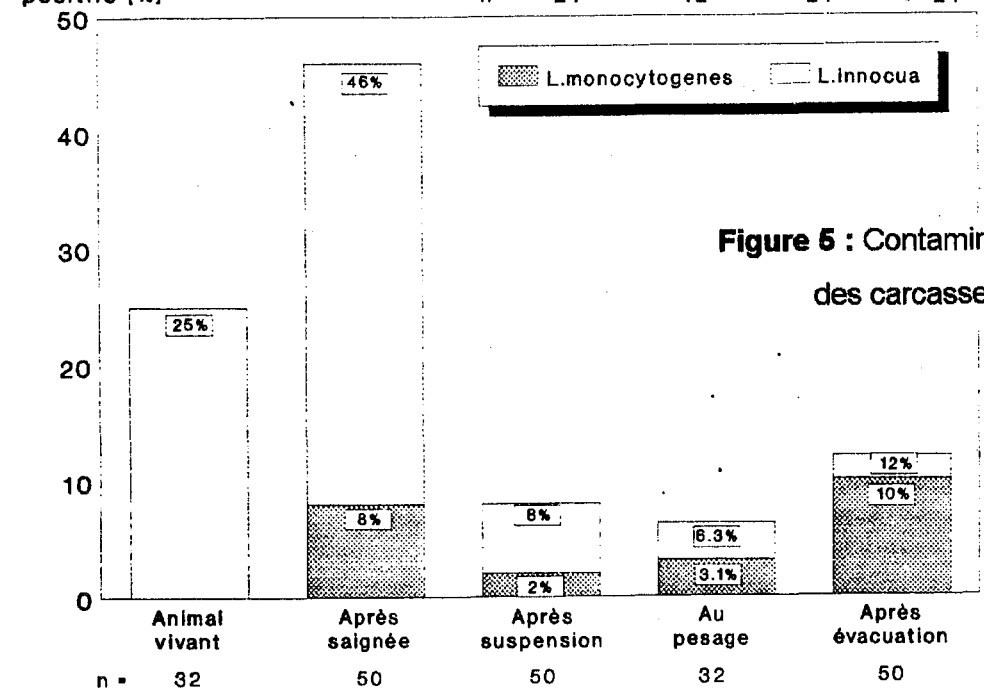


Figure 5 : Contamination par Listeria spp. des carcasses porcines de l'abattoir 2.



La peau se révéla être une source importante de contamination et une dissémination des germes, par contact direct ou indirect, lors de l'amenée, de l'étourdissement et de la saignée des animaux, a pu être démontrée, du fait de l'augmentation du pourcentage d'échantillons positifs de 20 à 50 %.

Le dépouillement des bovins, de même que l'échaudage et le flambage des porcs entraînent une diminution puisque 1,2 % des carcasses bovines et 8,7 % des carcasses porcines étaient encore positives en local frigorifique.

Quant aux postes de travail, le dépouillement des bovins, l'étourdissement et la suspension des porcs, l'évacuation des carcasses vers les locaux frigorifiques se sont révélés être fortement contaminés.

De ce fait, la séparation stricte du personnel travaillant dans la partie "sale" (amenée des animaux, étourdissement et saignée) de la partie "propre" est d'une très grande importance, de même que d'éviter tout contact entre des installations fixes (portes, murs, podiums de travail) et les carcasses.

La contamination de la viande de porc peut se faire à trois niveaux (8) :

- en élevage : elle est faible du fait des conditions modernes d'élevage (bâtiments fermés, alimentation granulée).

Le taux de Listeria monocytogenes dans les déjections est supérieure chez les porcs nourris avec des végétaux frais ou du maïs humide.

- à l'abattage : à ce niveau, la contamination, bien que faible, est due à :

. la technologie d'abattage : la chaîne comporte plusieurs points critiques :

- anesthésie-saignée car les électrodes des pinces d'anesthésie, le sol à ce niveau, le couteau de saignée sont fréquemment contaminés d'où la nécessité de désinfecter aussi souvent que possible le couteau de saignée et de limiter les mouvements du personnel chargé de l'anesthésie et de la saignée vers d'autres postes.

- échaudage : dans les bacs d'échaudage avec immersion, du fait des battements cardiaques ou d'inspirations réflexes, les germes peuvent pénétrer dans la plaie de saignée, la bouche et le tractus respiratoire d'où la contamination des poumons à ce niveau.

Listeria n'est pas détruite à la température de l'eau d'échaudage (61-63°C).

- épilage, flambage, polissage : la pression exercée par les racloirs lors de l'épilage extériorise les fèces ce qui peut souiller la peau.

La décontamination superficielle est effectuée au niveau du four à flamber mais les flagelleuses sont sources de nouvelles contaminations par l'eau.

- éviscération : si le tractus n'est pas correctement sectionné et prélevé, le contenu intestinal peut polluer la carcasse.

Le douchage des carcasses ne permet pas de décontaminer les surfaces, au contraire l'eau représente une source de contamination.

. l'hygiène du personnel : les mains, les vêtements et les instruments sont les sources les plus fréquentes de contamination mais l'homme en tant que porteur sain constitue aussi un réservoir.

. la réfrigération : les manipulations de carcasses par les opérateurs et les contacts entre carcasses favorisent les contaminations croisées du fait de l'aptitude des Listeria à se développer à basses températures.

. le nettoyage et la désinfection des locaux et matériels dont l'insuffisance ou l'absence permet la multiplication de Listeria et la contamination des carcasses.

- des produits finis : la contamination est beaucoup plus fréquente et le risque est augmenté par la longueur du process et le nombre d'interventions.

On distingue :

- les viandes fraîches pouvant être contaminées par l'environnement (sol, eaux, matériel de nettoyage et de découpe comme les scies, les couteaux et les tables de travail), par le personnel et par les contacts entre les morceaux ce qui favorise les contaminations croisées.

Le tranchage, le hâchage, le malaxage sont des opérations très contaminantes.

A ce niveau, la quantité de Listeria résulte de la qualité de la matière première et de l'hygiène de l'abattage et de la découpe.

- les produits cuits : 50 % des échantillons de pâté peuvent contenir des Listeria car de multiples recontaminations peuvent survenir après la cuisson, si l'hygiène n'est pas respectée.

La quantité de Listeria est ici le reflet de la qualité de l'environnement des denrées et de la maîtrise des process.

En général, quel que soit le type de viande, la contamination touche :

- 8 à 87 % des viandes hâchées ; elles sont donc un excellent milieu de culture,

- 25 % des viandes fraîches,

- 10 à 43 % des charcuteries crues,

- 5 % des charcuteries cuites,

- 12 à 37 % des produits à base de viande prêts à consommer,

- 47 % des volailles.

Une enquête menée, en 1991 par les Services Vétérinaires du Ministère de l'Agriculture, montre une contamination de :

- 14,8 % des produits de saucisserie fraîche, produits fumés et saucissons secs,

- 1,2 % des plats cuisinés à base de viande,

L'intensité de la contamination est variable : de 20 à 100/g du fait du phénomène de compétition de flore.

I. 2. 2. PRODUITS LAITIERS.

Les laits crus sont contaminés de façon variable et d'autant plus que l'alimentation de la femelle laitière comporte de l'ensilage.

Les chiffres, pour l'espèce bovine, sont les suivants :

- 5 % pour les laits crus de vache (10 à 1000/ml),

- 10 à 23 % pour les fromages à pâte molle (10000 à 10^7/g),

- parfois 20 % pour les laits pasteurisés, en cas de pasteurisation mal effectuée et de recontamination après traitement.

I. 2. 3. PRODUITS DE LA MER.

4 à 8 % des poissons, crustacés et coquillages sont contaminés (200/g) de façon discrète.

I. 2. 4. VEGETAUX.

Ils sont fréquemment et intensément contaminés (salade, chou, céleri, tomate) du fait de l'épandage de fumier, des lisiers, des boues de station d'épuration (10^7/g).

II. INCIDENCE ET CROISSANCE DANS LES DENREES ALIMENTAIRES.

II. 1. PRODUITS CARNES.

La contamination touche une grande variété de viandes avec une incidence (CFU/g) variant grandement du fait des différences des méthodes de détection comprenant des facteurs comme la méthode utilisée, la taille de l'échantillon, le nombre de colonies et la source de l'échantillon (commerce de détail ou grande surface).

Les contaminations se produisent, en général, en surface.

Listeria monocytogenes a récemment été trouvée dans le cœur des muscles de 5 des 110 échantillons de rôti de bœuf, de porc et d'agneau (288).

Ces organismes sont probablement présents dans le muscle au moment de l'abattage.

Le sérotype 1 est principalement trouvé dans les viandes courantes bien que dans le pâté responsable de l'épidémie survenue en Angleterre en 1989, le sérotype 4b ait été le plus fréquemment isolé (400).

Alors que la plupart des cas de maladies humaines semble être due au sérotype 4b, quelques auteurs affirment que la viande n'est pas impliquée dans les éruptions de listériose d'origine alimentaire.

Ceci n'est pas complètement vrai, puisqu'il y a eu plusieurs épisodes de listériose sporadique et épidémique impliquant le sérotype 1.

Mais il est évident que plusieurs produits de viande contaminés apparaissent contenir des taux plus bas que la plupart des fromages à pâte molle.

Le poulet semble être hautement contaminé ; les études montrent un taux de contamination de l'ordre de 10 à 60 % et le sérotype 1 comme sérotype dominant.

Les facteurs influençant la colonisation des poulets rôtis ont été examinés et il ressort de cette étude que les plus jeunes oiseaux sont plus sensibles que les plus âgés (16).

En effet, dans le cas des poulets âgés d'un jour, une moyenne de 10^2 à 10^6 germes apporte une colonisation de 20 % (3 des 15) et 73 % (11 des 15) des oiseaux infectés.

La volaille peut se contaminer dans l'environnement durant la production ou à partir des poulets porteurs sains durant le traitement (16) (210).

Certaines études montrent que Listeria monocytogenes est incapable de pousser dans la viande stockée à 4 ou à 25°C (287), d'autres démontrent le contraire (108) (218) (513).

L'étude menée dans la viande hâchée à 4°C a montré que le nombre de Listeria reste inchangé durant plus de 30 jours, ce qui confirme le comportement psychrotrophe des Listeria (513).

Le nombre de Listeria diminue d'environ 1 log CFU/g de viande de bœuf hâchée stérile stockée à 8°C puis demeure constant.

L'hypothèse la plus vraisemblable est que la viande manque d'un élément nutritif nécessaire à la croissance des Listeria et que la dégradation du muscle par les bactéries protéolytiques comme Pseudomonas fluorescens peut permettre à la croissance de Listeria de se produire, du fait de la libération d'éléments nutritifs directement assimilables (227).

Le lactate de sodium (1,8 %), l'érythorbate de sodium (0,1 %), le kappa-carraghénane (1 %) et les alginates liant la viande (l'alginate de sodium (0,4 %), l'acide lactique (0,6 %) et le carbonate de calcium (0,075 %)) n'ont pas d'effet sur le nombre de Listeria dans la viande de bœuf hâchée crue, stockée en aérobie à 4°C.

Par contre, les alginates et le kappa-carraghénane entraînent une faible destruction de Listeria monocytogenes dans la viande de bœuf hâchée cuite, stockée en aérobie à 4°C (243).

La croissance semble être fortement dépendante de la température et du pH de la viande, du type de tissu et du type et de la quantité de microflore secondaire.

En effet, à 7°C ou moins, Listeria monocytogenes est incapable de croître dans la viande avec une microflore de 10^5 CFU/g alors qu'à 25°C, aucune croissance n'est observée avec une microflore de 10^7 CFU/g.

La croissance dépend du type de produit et du pH, comme l'ont montré GLASS et DOYLE (218) ; en effet, elle s'effectue à pH ≤ 5 et la volaille la supporte mieux que les autres viandes comme le rôti de bœuf, les saucisses et les hot dogs pour lesquels les facteurs inhibiteurs sont le pH, la combinaison pH - activité de l'eau et la fumée liquide.

Les préparations de fumage liquide utilisée pour la fabrication des saucisses ont effectivement une activité antilisteria du fait de leur teneur en phénols (256).

La croissance est supérieure dans la viande grasse comparativement à la viande maigre, ce qui est probablement dû à une plus courte phase de latence (394).

D'autres ont trouvé une croissance similaire avec des phases de latence légèrement plus longues dans les tissus gras (143).

La congélation, la déshydratation en surface et la réfrigération simulant un spray ne semblent pas affecter la survie.

L'emballage sous vide est source de résultats contradictoires ; en effet, la croissance est aussi bonne dans le bœuf emballé sous vide que stocké à l'air mais meilleure que dans le blanc de poulet emballé sous vide (143) alors qu'elle est inférieure dans ce dernier comparativement à celui recouvert d'un film (100).

La croissance est meilleure à 0°C dans le bœuf emballé sous vide à pH 6 qu'à pH 5,6 (232).

La croissance est possible dans la viande emballée sous vide stockée à 0, 2, 5 et 10°C mais impossible dans le bœuf emballé sous 100 % de CO_2 à une température supérieure à 5°C et à pH élevé (215).

La survie de Listeria monocytogenes est mauvaise dans le poulet cru stocké en atmosphère anaérobie modifiée mais bonne en présence de 5 % d'O_2 (600).

Les effets de quatre conditions de l'environnement gazeux (100 % O_2, 30 % CO_2 + air, 30 % CO_2 + N_2, 100 % CO_2) et de la température sur le comportement de Listeria monocytogenes ont été étudiés dans le blanc de poulet (248).

A 1°C, l'organisme ne pousse dans aucune de ces conditions.

A 6°C, la croissance est meilleure en aérobie qu'en présence de CO_2.

A 15°C, la croissance se produit dans tous les cas.

La croissance en présence de CO_2 est expliquée par le fait que les atmosphères enrichies en CO_2 suppriment la microflore aérobie.

Donc, conserver la viande sous 100 % de CO_2 est le moyen le plus efficace d'en étendre la durée de vie.

Le niveau initial de Listeria monocytogenes dans les saucisses fermentées (553) est réduit de 100 fois durant la fabrication (217), sauf dans le cas des saucisses coupées préparées sans levain lactique et portées à 32,2°C pendant 6 h ; dans ces conditions, le nombre de Listeria est multiplié par 100.

Une faible diminution du nombre de Listeria est observée dans les saucisses "summer" fabriquées sans levain (41).

Listeria monocytogenes présente initialement à un taux supérieur à 1000 CFU/g de saucisses peut survivre durant la fermentation, le séchage et le stockage réfrigéré du salami dur fermenté (286).

Ces observations différentes résultent probablement de différences physiques et chimiques entre les saucisses comme le pH, l'activité de l'eau (Aw), les taux de sel et de nitrite et la flore secondaire.

Les Lactobacilles semblent être les organismes majeurs exerçant un effet antilisteria par production de bactériocine alors que les Pseudomonas favorisent la croissance comme nous l'avons vu précédemment.

Les différentes études concernant la compétition flore lactique - Listeria font appel aux souches suivantes :

- Carnobacterium piscicola (86) (87) (497) isolée de viande de bœuf hâchée inhibant Listeria monocytogenes à 5°C ou à 19°C mais surtout à 5°C par production d'une bactériocine thermostable à activité bactéricide,

- Lactobacillus sake libérant une bactériocine ou sakacine A (340) (496) (498) (528) possédant une activité bactériostatique plutôt que bactéricide envers des lactobacilles variés et plusieurs bactéries Gram (+) d'origine alimentaire comme Staphylococcus aureus et Listeria monocytogenes mais pas envers les bactéries Gram (-), sous conditions éliminant les effets de faible pH, de peroxyde d'hydrogène et de bactériophage lytique.

Dans les saucisses, Listeria monocytogenes est capable de pousser à pH 6,3 mais l'addition de Lactobacillus sake empêche la croissance des Listeria durant les premiers jours suivant la fabrication.

A pH normal (5-7), Listeria monocytogenes ne se multiplie pas et l'addition de Lactobacillus sake réduit le nombre de Listeria monocytogenes.

La sakacine A (265) purifiée par précipitation par du sulfate d'ammonium et chromatographie montre qu'elle est constituée de 41 résidus d'acides aminés et qu'elle a une masse moléculaire calculée de 4308,7, ce qui est en accord avec la valeur déterminée par spectrométrie de masse.

Le gène structural (sakA) code pour un produit primaire de 59 acides aminés qui est clivé entre les acides aminés 18 et 19 pour conduire à la sakacine A active.

Son effet antagoniste est éliminé par traitement avec les protéases mais elle est thermostable.

- Lactobacillus bavaricus (599) possédant une action antagoniste envers Listeria monocytogenes en viande emballée sous vide, traitée par la chaleur et stockée aux températures de réfrigération.

Cet effet a été examiné dans trois systèmes à savoir des cubes de bœuf, des cubes de bœuf en sauce et des cubes de bœuf en sauce contenant de glucose.

A 4°C, Listeria monocytogenes est inhibée ou tuée par Lactobacillus bavaricus ; cela dépend du taux initial de contamination.

A 10°C, on observe une réduction de 10 fois du pathogène sauf dans le bœuf sans sauce.

Ce système montre une inhibition transitoire du pathogène durant la première semaine de stockage puis une croissance.

Une bactériocine est détectée dans les échantillons donc l'inhibition ne peut pas être attribuée à l'acidification mais bien à la production de bactériocine.

L'addition de sauce contenant du glucose et un taux d'inoculation plus élevé sont très efficaces pour réduire les populations de Listeria monocytogenes.

Des températures de réfrigération plus faibles augmentent l'action antagoniste.

La nature protéinique de la bactériocine est confirmée par addition d'α-chymotrypsine (pancréase bovine type II).

Donc, non seulement Lactobacillus bavaricus pousse et produit une bactériocine à température de réfrigération mais aussi est efficace aux valeurs de pH non acides.

D'autres souches de Lactobacilles ont été étudiées à savoir Lactobacillus delbruekii spp. lactis, Lactobacilllus plantarum, Lactobacillus casei, Lactobacillus brevis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus lactis spp. lactis (340).

- Pediococcus acidilactici (50) (413) (499) produisant une bactériocine ou pédiocine à effet bactéricide sur Listeria monocytogenes mais aussi sur Lactobacillus spp. et Clostridium perfringens dans la viande fraîche et les saucisses (135) (197) (611).

La fermentation des saucisses sèches peut réduire les populations de Listeria monocytogenes (197).

L'inactivation efficace de Listeria monocytogènes est observée quand le pH de la partie fermentation du procédé est inférieur à 4,9 (197).

La pédiocine (260) est responsable pour une part de l'activité antilisteria durant la fermentation.

L'inhibition de Listeria monocytogenes durant le séchage est améliorée par la présence de pédiocine.

La production de pédiocine contribue donc à l'augmentation de l'inhibition durant la fermentation et le séchage de la fabrication des saucisses.

Les Listeria sont inactivées dans les exsudats portés à 4°C pendant 29 jours et poussent dans les exsudats portés à 25°C pendant 6 jours (611).

La pédiocine provoque une létalité rapide de Listeria monocytogenes dans les exsudats portés à 4°C mais ensuite l'inactivation est similaire à ce que l'on observe dans l'exsudat de contrôle (Listeria monocytogenes seule) ou l'exsudat contenant Listeria monocytogenes + Pediococcus acidilatici (611).

A 25°C, Listeria monocytogenes pousse en présence de Pediococcus acidilactici durant les premières 64 h d'incubation mais la population décroît ensuite de façon appréciable (611).

En présence de pédiocine, on observe une décroissance graduelle de Listeria monocytogenes durant toute la période de stockage à 25°C (611).

Donc, l'ajout d'additifs biologiques peut potentialiser et amplifier l'activité listériostatique et listéricide intrinsèque de l'exsudat de saucisse (611).

La pédiocine est bactéricide et est sensible aux enzymes protéolytiques.

Elle est stable entre pH 3 et 9 et apparemment plus stable dans une plus faible partie de cette étendue de pH.

A pH 3,6, la pédiocine est stable aux températures de traitement thermique de l'ordre de 65 à 121°C ; son activité diminue significativement quand elle est chauffée à pH 7.

L'activité inhibitrice de la pédiocine est perdue en présence d'alpha-amylase, suggérant qu'elle contient une moitié glucidique nécessaire à son action antibactérienne.

La pédiocine se présente sous la forme de monomères et d'aggrégats possédant des poids moléculaires de l'ordre de 80 à 150 kDa.

La pédiocine présente une meilleure activité lorsqu'elle est encapsulée dans des liposomes de phosphatidylcholine avant addition aux systèmes par rapport à la pédiocine libre et non encapsulée et ajoutée aux systèmes contenant un émulsifiant Tween 80 par rapport aux systèmes sans Tween 80 (136).

- Pediococcus damnosus et Pediococcus pentosaceus (340) (384) (525) à effet antibactérien sur Listeria monocytogenes en jus de viande hâchée incubé à 6°C et à 15°C,

- Leuconostoc gelidum (252) (253), bactérie lactique hétérofermentative isolée de viande emballée sous des taux de CO_2 élevés.

Elle pousse bien à température de réfrigération mais pas à 25°C.

Elle produit une substance inhibitrice, la leucocine (252), qui est inactivée par la trypsine mais pas par la catalase ou par chauffage à 62°C pendant 30 minutes.

Elle est produite assez tôt en cycle de croissance à 1, 5 et 25°C.

Cette substance inhibe un grand nombre de bactéries apparentées étroitement aux bactéries lactiques aussi bien qu'Enterococcus faecalis et Listeria monocytogenes.

- Leuconostoc mesenteroïdes (124) produisant une mésentérocine active contre Listeria monocytogenes mais sans effet sur plusieurs bactéries lactiques.

La substance antimicrobienne est une protéine ; son activité est complètement détruite par la pronase.

Elle est relativement stable à la chaleur (100°C, 30 minutes) et partiellement dénaturée par le chloroforme.

La SDS-PAGE a permis de déterminer le poids moléculaire apparent à environ 4,5 kDa.

D'autres souches de Leuconostoc ont été étudiées à savoir Leuconostoc cremoris et Leuconostoc blayaisense (340),

Un Enterococcus hirae (520) (521) isolé d'intestin bovin produit une bactériocine ou hiraecine S inhibant d'autres Enterococci, Listeria monocytogenes et d'autres Listeria spp. mais aucune autre bactérie Gram (+) et pas de bactérie Gram négative.

L'agent antimicrobien est inactivé par la pronase et la papaïne et est insensible à la catalase, à l'effet tampon, au chauffage à 100°C pendant 60 minutes et à la congélation-décongélation.

L'activité antimicrobienne n'est pas due au peroxyde d'hydrogène ou à la formation d'acide et elle n'est pas non plus une activité lysozyme ou muramidase.

II. 2. LAIT ET PRODUITS LAITIERS.

Les fromages sont les plus intensivement examinés en raison de leur association à la listériose d'origine alimentaire.

La contamination des fromages à pâte molle est essentiellement localisée à la surface (30) (296) ; ceci semble être dû au pH bien qu'un large gradient de pH se développe durant l'affinage ; la croissance se fait parallèlement à l'augmentation du pH durant l'affinage.

Ceci est aussi à associer à la protéolyse de surface due aux moisissures (15).

Le lait cru doit être considéré, par les producteurs laitiers, comme une source de contamination bien que celui-ci possède un système lactoperoxydase consistant en une enzyme : la lactoperoxydase, du thiocyanate et du peroxyde d'hydrogène possédant une activité antimicrobienne large et entre autre sur les Listeria (54) (139) (140) (165) (209) (292) (293) (518).

L'oxydation du thiocyanate SCN^-, catalysée par la lactoperoxydase et par H_2O_2, génère l'anion hypothiocyanite $OSCN^-$ qui est en équilibre avec l'acide hypothiocyaneux ; ces deux composés peuvent oxyder les groupes sulfhydryle (-SH) des enzymes métaboliques inhibant la croissance bactérienne.

Plusieurs mécanismes d'action ont été rapportés pour expliquer cette inhibition :

- extension de la phase de latence ou aucune croissance,
- consommation d'oxygène réduite,
- production de lactate par les organismes fermenteurs réduite,
- inhibition des enzymes métaboliques clés comme l'hexokinase, la glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase et la D-lactate deshydrogénase,
- inhibition de la consommation de glucose,
- altération de la membrane cytoplasmique avec fuite d'ions et de matériel absorbant dans l'UV,
- inhibition de la synthèse d'acides nucléiques et de protéines.

Le système lactoperoxydase (LPS) améliore la destruction thermique de Listeria monocytogenes et de Staphylococcus aureus.

En effet, l'activation de LPS suivie du traitement thermique entraîne une mort plus rapide des Listeria tout en respectant les pathogènes d'origine laitière.

L'inhibition de ce système est réversible par addition de composés contenant des groupes sulfhydryle comme la cystéine, le dithiothreitol et la glutathion aussi bien que des taux élevés de catalase ou par chauffage du lait aux températures de pasteurisation.

Le niveau de lactoperoxydase dans le lait cru décroît durant l'incubation de 7 jours mais la décroissance est plus prononcée à 8°C qu'à 4°C.

L'activation du système LPS est donc une procédure permettant de contrôler le développement de Listeria monocytogenes dans le lait cru aux températures de réfrigération.

Listeria monocytogenes peut survivre à la fabrication et à l'affinage de beaucoup de fromages, en particulier le Camembert (488), un peu moins le Cottage (486), le Parmesan (609), le Trappist (314), le Cheddar (487) et le Colby (606).

Listeria monocytogenes survit et se multiplie quand elle est inoculée directement dans le lait servant à la fabrication du Camenbert mais le taux de croissance est réduit à faibles températures de stockage (15).

Des taux de croissance plus élevés se produisent en surface comparativement au centre.

Listeria monocytogenes est concentrée dans le lait caillé et peu dans le petit lait dans lequel elle survit, de même que dans le beurre et le yaourt.

La croissance est lente mais pas totalement inhibée par les levains lactiques utilisés dans la fabrication du fromage.

Elle est bonne dans les produits laitiers de 4 à 35°C.

La présence de Pseudomonas dans le lait peut améliorer la croissance de Listeria monocytogenes (183) (380).

Listeria monocytogenes survit à la fermentation du lait écrémé par Streptococcus cremoris (585) ou Streptococcus lactis (99) et durant le stockage réfrigéré.

La fermentation avec la bactérie thermophile Lactobacillus bulgaricus est plus préjudiciable à la croissance et la survie que la fermentation avec des levains lactiques mésophiles (495).

La croissance dans le petit lait est meilleure que dans d'autres produits laitiers fluides ; ceci est dû au pH et à la présence ou l'absence de Penicillium camemberti ; la croissance est améliorée en présence de Penicillium camemberti et à pH élevé (489).

Listeria monocytogenes est capable de résister un certains nombre de jours dans les saumures et le lactosérum constituant des sources potentielles de contamination (23).

Une saumure contaminée peut infecter un grand nombre de fromages puisqu'elle sert à plusieurs fabrications.

De même, dans une unité de production, le sérum se retrouve fréquemment au niveau du sol et des Listeria peuvent persister dans le sérum stagnant dans des fissures du sol, ainsi qu'au niveau des regards d'égouts et d'autres orifices (396).

Donc, la recherche de Listeria monocytogenes dans ces produits doit être inclue dans les plans de contrôle préventifs en fromagerie et toutes les surfaces doivent être le plus rapidement possible nettoyées et désinfectées.

Un Leuconostoc mesenteroides spp. mesenteroides (257) isolé de lait de chèvre inhibe la croissance de Listeria monocytogenes par production d'un composé nommé mésentéricine.

Il s'agit d'une molécule protéique montrant un spectre inhibiteur étroit limité au genre Listeria.

Le poids moléculaire détecté par SDS-PAGE est de 2,5-3 kDa.

La bactériocine est purifiée par une simple procédure en trois étapes : un surnageant brut obtenu à partir d'une culture en phase stationnaire en milieu défini est soumis à une chromatographie d'affinité sur colonne d'agarose, suivie d'une ultra-filtration à travers une membrane de 5 kDa et finalement une CLHP en phase inverse sur colonne C4.

Le microséquençage de la bactériocine pure et des fragments tryptiques montre que la mésentéricine est un polypeptide de 36 acides aminés dont la structure primaire est proche de celle de la leucocine A-UAL 187 (252), laquelle contient un résidu supplémentaire à l'extrémité C.

A la différence de la leucocine A-UAL 187 (252), la mésentéricine montre un mode d'action bactéricide.

Les bactéries corynéformes (554) telles que Brevibacterium linens, Arthrobacter nicotianae et Arthrobacter nucleogenes isolées de fromage montrent des zones claires d'inhibition donc un effet antagoniste sur Listeria.

Arthrobacter nicotianae et Arthrobacter nucleogenes sont plus efficaces envers Listeria innocua et Listeria ivanovii qu'envers Listeria monocytogenes.

La nature des effets inhibiteurs demeure peu claire.

La caractérisation de la nature de l'antagonisme montre que les filtrats perdent leur activité inhibitrice par chauffage et la taille moléculaire des substances inhibitrices est plus élevée que 12-14 kDa.

Streptococcus lactis producteur de substance de type bactériocine est isolé du lait écrémé stérile et présente une activité inhibitrice sur Listeria monocytogenes (584).

Cet effet inhibiteur est mis en évidence pour une forte contamination en Streptococcus lactis.

L'acidification du milieu accentue l'effet inhibiteur sur la croissance.

II. 3. PRODUITS DE LA MER.

Ces produits sont beaucoup moins étudiés.

15 des 57 échantillons de crevettes, de chair de crabe, de queue de homard, de poisson ou fruits de mer à base de surimi étudiés se sont révélés positifs (574).

58 des 691 échantillons de poisson fumé ou mariné à chaud et 49 des 434 échantillons de poisson fumé à froid étudiés renferment des Listeria (281).

L'étude du comportement de Listeria monocytogenes au cours de la fabrication et du stockage du saumon fumé contaminé expérimentalement en surface, mariné, fumé à 26-30°C et stocké à 4°C ou à 10°C pendant 30 jours montre qu'aucune modification n'est observée au cours de la fabrication alors qu'au cours du stockage, le nombre de Listeria augmente ; de plus, si des Lactobacilles (flore des poissons fumés) prédominent au début du stockage, on observe une inhibition des Listeria (238).

Par ailleurs, l'étude du comportement de Listeria monocytogenes durant la fabrication et le stockage de la truite fumée à chaud contaminée expérimentalement en surface, marinée, fumée à chaud (65°C pendant 20 minutes) et stockée à 4 et 8-10°C pendant 20 jours montre qu'aucune Listeria n'est obtenue ; si la truite est inoculée après fumage, aucune modification n'est observée au cours du stockage à 4°C mais une augmentation a lieu au cours du stockage à 8-10°C d'où l'importance du maintien de la chaîne du froid (282).

Le poisson salé et séché ne semble pas renfermer de Listeria (202).

On note une augmentation d'environ 5 log en 14 jours du nombre de Listeria dans les crevettes, la chair de crabe, le surimi et le poisson blanc stockés à 7°C et stérilisés au préalable avant inoculation (351).

En Amérique du Nord, des crevettes cuites congelées, de la chair de crabe congelée en conserve, du saumon fumé, des coquilles Saint-Jacques, du homard congelé en conserve et du surimi ont été retirés du marché suite à la découverte d'une contamination.

Des Listeria monocytogenes viables ont été obtenues à partir de crevettes contaminées expérimentalement bouillies après restauration à 4°C (355).

Le fumage a un rôle antilisteria dans les filets de sardines (32).

II. 4. ŒUFS.

Listeria monocytogenes peut survivre dans les œufs crus réfrigérés pendant 22 jours (325), dans les œufs entiers, dans le jaune d'œuf déshydraté et dans les œufs liquides (68) et croître dans les œufs cuits (325).

La croissance s'effectue dans toutes les portions après traitement par la chaleur.

Les temps de génération à 5°C sont de 1,7 jours dans les jaunes d'œufs, de 1,9 jours dans les œufs entiers cuits, de 2,3 jours dans les jaunes cuits et de 2,4 jours dans les blancs cuits.

Dans l'albumen cru, le nombre de Listeria diminue de 5 log en 22 jours à 5°C (517).

L'effet antilisteria observé dans l'albumen cru est probablement attribué à une ou plusieurs de ses fractions, notamment l'avidine, le lysozyme et l'ovoflavoprotéine.

Pour certains, l'effet antibactérien de l'albumen est principalement dû au lysozyme et il est renforcé par l'ovomucoïde, la conalbumine ou un pH alcalin (567).

De plus, le préchauffage de l'albumen entraîne une réduction de son activité antibactérienne.

Cet effet antibactérien du lysozyme du blanc d'œuf est bactériostatique (98) (272) (527).

Le lysozyme du blanc d'œuf tue ou empêche la croissance de Listeria monocytogenes dans plusieurs aliments.

Il est plus actif dans les légumes que dans les denrées animales comme le saucisson de porc frais (bratwurst) et le Camembert.

Pour une activité maximale dans certains aliments, l'EDTA est nécessaire en addition au lysozyme.

Il peut donc être utilisé comme agent de conservation dans plusieurs aliments spécialement ceux préparés à partir de végétaux frais.

II. 5. VEGETAUX.

Les pommes de terre et les radis sont régulièrement contaminés (258), mais aussi les salades préemballées (522) (562).

Le sérotype 1 est prédominant.

Les sources de contamination sont le sol, l'eau, l'engrais animal, la végétation pourrie et les effluents des égouts.

La croissance est bonne dans le jus de laitue à 5°C (395) (532).

L'étude de la thermorésistance de Listeria monocytogenes dans le jus de chou montre qu'un chauffage à 58°C pendant 10 minutes peut inactiver 10^5 cellules/ml (46) (112).

De plus, à 30°C, la population augmente dans le jus de chou non clarifié stérile contenant 0 à 1,5 % de NaCl et diminue en présence de plus de 2 % de NaCl.

A 5°C, la population est réduite de 90 % en présence de plus de 5 % de NaCl après 70 jours.

La croissance à 30°C aboutit à une diminution du pH de 5,6 à 4,1.

La létalité se produit à 30°C quand le jus de chou est ajusté à pH $\leq$ 4,6 avec de l'acide lactique et aucune cellule viable n'est détectée après 3 jours à pH $\leq$ 4,2.

A 5°C, la vitesse de létalité à pH ≤ 4,8 est plus lente qu'à 30°C.

La croissance dans le jus de chou clarifié avec 2 % de NaCl à 30°C a lieu alors qu'une dose supérieure à 1,5 % de NaCl est létale dans le jus de chou non clarifié.

Par contre, à 4°C, Listeria monocytogenes survit dans le jus de chou pendant longtemps.

La croissance de Listeria monocytogenes dans la laitue hâchée à 5, 12 et 25°C après 14 jours a été étudiée ; elle est d'1 log à 5°C et 25°C et de 3 log à 12°C (532).

D'autres expériences montrent que l'organisme meurt après 14 jours.

Ces différences sont attribuées aux différences de pH et à la compétition de flore.

Listeria monocytogenes peut survivre et se multiplier durant le stockage au froid des salades préemballées pendant 4 jours.

La survie et la croissance dans la laitue est influencée par la hâchage, le traitement au chlore, l'atmosphère modifiée et la température (48).

L'étude de la croissance de Listeria monocytogenes à 15°C dans les végétaux frais stockés à l'air ou sous atmosphère contrôlée met en évidence une augmentation de 4 log en 6 jours dans les asperges, le broccoli et le chou-fleur alors qu'à 4°C, l'augmentation est de seulement 1 log après 14 jours dans les asperges et dans le broccoli et le chou-fleur, la diminution est de 0,5 log (40).

L'étude du comportement de Listeria monocytogenes inoculée dans les tomates crues et dans les produits à base de tomates (49) montre que les taux de létalité et de croissance dans les tomates crues en tranches ou entières stockées à 10 et 21°C ne sont pas influencés par le traitement antérieur des tomates avec du chlore ou l'emballage sous une atmosphère de 3 % d'O_2 et 97 % de N_2.

La croissance se produit dans les tomates entières à 21°C mais pas à 10°C tandis que la létalité se produit dans les tomates en tranches stockées à ces températures mais la vitesse de létalité est plus faible à 10°C qu'à 21°C en raison de la présence d'acide acétique.

Les populations de Listeria monocytogenes inoculées dans les jus et les sauces de tomates à 5°C demeurent constantes pendant 14 jours alors qu'à 21°C, on observe une décroissance graduelle.

Listeria monocytogenes meurt rapidement quand elle est mise en suspension dans le ketchup à 5 et 21°C du fait du faible pH.

Donc les tomates, contrairement à la laitue, au broccoli, aux asperges et au chou-fleur ne sont pas un bon substrat de croissance pour les Listeria.

Une étude portant sur le comportement des Listeria dans les carottes montre une diminution de la population listérienne dans les carottes crues entières et râpées mais pas dans les carottes cuites et une diminution du nombre de Listeria monocytogenes en suspension cellulaire dans laquelle sont plongées des carottes crues (47).

Le nombre de Listeria à 5°C augmente au bout de 7 jours.

Le traitement de coupe, le traitement au chlore et l'emballage sous atmosphère modifiée n'ont pas d'effet sur la survie et la croissance de Listeria monocytogenes.

La présence de jus de carottes crues dans un bouillon tryptone phosphate à la concentration de 1% réduit la population à 30°C.

Le stockage à 15°C provoque un effet létal plus rapide qu'à 5°C.

Il se peut que les carottes crues possèdent un composé inhibant la croissance des Listeria mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour caractériser à un niveau moléculaire le ou les composés présents dans les carottes crues qui sont toxiques pour les Listeria.

L'étude du mécanisme biochimique pour l'effet anti-levure de la phytoalexine 6-méthoxymelléine des carottes suggère que ce composé exerce ses effets toxiques en inter-agissant avec les membranes cellulaires et en modifiant les fonctions associées à la membrane mais on ne sait pas si ce composé est toxique pour les Listeria (7).

Le développement microbien des carottes emballées sous vide stockées à 4, 10 et 15°C est plus lent qu'en aérobie (91).

Dans les carottes stockées à 8°C, le nombre de Listeria diminue après 3 jours puis augmente après 7 jours à un taux similaire à celui présent initialement (409).

Les végétaux, particulièrement s'ils sont coupés ou abîmés, procurent un excellent milieu de culture.

Selon FARBER et coll. (180), il n'y a pas de Listeria dans les végétaux crus et selon PETRAN et coll. (440), il n'y en a pas dans les végétaux frais et congelés.

Aucune étude de contamination de fruit n'est recensée.

III. THERMORESISTANCE. (151)

III. 1. DANS LE LAIT.

Suite à l'épidémie de 1983 au Massachusets où un lait pasteurisé a été incriminé et où aucune évidence de pasteurisation mal faite n'a été prouvée, on a suggéré que la position intracellulaire de l'organisme procurait un milieu protecteur.

Les différentes études conduites sur la pasteurisation sont contradictoires.

L'étude de la thermorésistance de Listeria monocytogenes en suspension dans le lait cru et chauffé dans des tubes en verre scellés montre que l'organisme ne peut pas survivre à la pasteurisation HTST (71,7°C pendant 15 secondes) (69).

L'infection de quatre vaches suivie d'une pasteurisation du lait obtenu indique que les organismes intracellulaires situés dans les leucocytes polymorphonucléaires peuvent survivre aux conditions de la pasteurisation HTST (154).

Listeria monocytogenes a été isolée du lait pasteurisé à 71,7-73,9°C pendant 16,4 secondes mais pas à 76,4-77,8°C pendant 15,4 secondes.

De plus, les leucocytes sont dégradés dans le lait non pasteurisé après 3 jours de stockage à 4°C puis détériorés après 4 jours en débris cellulaires ce qui suggère que laisser le lait non pasteurisé à 4°C pendant 4 jours ou plus pourrait éliminer l'effet protecteur que les leucocytes procurent en augmentant la résistance à la chaleur.

On peut donc supposer que la capacité de Listeria monocytogenes à survivre à la pasteurisation est due à l'effet protecteur thermique procuré par la position intracellulaire dans les leucocytes polymorphonucléaires (154) (194).

Pour BUNNING et coll. (92), la position intracellulaire de l'organisme n'augmente pas significativement la thermorésistance et Listeria monocytogenes peut survivre à la pasteurisation industrielle HTST, qu'elle soit intra ou extracellulaire.

La différence entre ces deux dernières études vient du fait que BUNNING et coll. (92) soumettent le lait aux ultrasons tandis que DOYLE et coll. (154) non.

Les ultrasons permettent la libération de Listeria monocytogenes à partir des phagocytes et par conséquent Listeria monocytogenes est soumise à un environnement oxygéné toxique ; elle n'est donc plus obtenue sur milieux solides sélectifs.

Listeria monocytogenes a été isolée à partir de lait cru inoculé immédiatement avant traitement thermique de 69 à 73°C pendant 15 secondes et à partir de lait chauffé à 69-72°C après incubation de 2 jours à 3 semaines (187) (188).

L'étude de la survie de Listeria monocytogenes intra et extracellulaire dans le lait contaminé naturellement montre que bien que l'organisme soit obtenu à partir de lait chauffé à 60-66°C, aucune cellule viable n'est obtenue après traitement à 69°C pendant 16,2 secondes (179).

LOVETT et coll. (348) affirment que Listeria monocytogenes ne survit pas à la pasteurisation HTST alors que FERNANDEZ-GARAYZABAL et coll. (187) (188) ainsi que BEARNS et GIRARD (28) pensent le contraire ; ils furent d'ailleurs les premiers à rapporter que Listeria monocytogenes était capable de survivre à la pasteurisation.

Pour CRAWFORD et coll. (120), la présence de Listeria monocytogenes dans le lait pasteurisé HTST n'est que le résultat d'une contamination post-pasteurisation.

L'étude du choc thermique (48°C pendant 15 secondes) sur l'augmentation de la thermotolérance de Listeria monocytogenes soumise à la pasteurisation HTST (71,7°C pendant 15 secondes) (94) montre que cette dernière est augmentée soit par le choc thermique soit par la position intracellulaire.

Listeria monocytogenes exposée à des températures sous-létales de 44 à 48°C avant d'être soumise à une température finale acquière donc une thermotolérance.

Listeria monocytogenes cultivée à 43°C est plus thermotolérante que celle cultivée à température plus basse ou que celle endommagée par la chaleur à 43°C (307) ; ceci implique que Listeria monocytogenes dans un aliment réfrigéré peut acquérir une thermotolérance si cet aliment est endommagé par la chaleur (368) (369).

Après chauffage à 62,8°C en tubes scellés en bouillon trypticase-soja contenant de l'extrait de levure (TSBYE), l'obtention de cellules endommagées par la chaleur sur TSBYE est supérieure en anaérobie, du fait de la sensibilité à l'oxygène, plutôt qu'en aérobie.

De plus, l'addition exogène de catalase mais pas de superoxyde dismutase augmente légèrement l'obtention de cellules endommagées par la chaleur en aérobie (307).

D'autres ont démontré qu'il n'y avait pas de corrélation entre les taux intracellulaires de catalase et de superoxyde dismutase et la thermotolérance ; en effet, lors du chauffage, on observe une inactivation de ces enzymes donc le développement de produits oxygénés toxiques comme O_2^- et H_2O_2 puis un radical hydroxyl ; cette inactivation convertit Listeria monocytogenes en un micro-organisme anaérobie tué rapidement en présence d'oxygène moléculaire (125) (126).

Ces différentes observations laissent trois questions en suspens :

- quelles sont les conditions anaérobies de chauffage pour lesquelles on peut trouver Listeria monocytogenes ?

- est-ce que les organismes maintenus à 39°C environ dans la mamelle ne se multiplient pas pour acquérir une thermotolérance ; et, si cela est vrai, combien de temps dure t-elle ?

- est-ce que les conditions ou les composés comme l'eau oxygénée dans les phagocytes induisent une thermotolérance supplémentaire ?

III. 2. DANS LA VIANDE.

L'addition de graisse de bœuf n'améliore pas la thermorésistance alors qu'elle est augmentée par la présence de sel.

Le phénomène de choc thermique est à prendre en compte quand les viandes sont chauffées lentement jusqu'à une température finale interne.

La croissance à hautes températures ainsi que le choc létal aboutit à la production de membranes thermostables (45) et la synthèse de protéines (604) dont la listériolysine lesquelles entraînent une augmentation de la thermorésistance.

La thermorésistance de Listeria monocytogenes augmente après un choc thermique sous-létal (93).

Les cellules endommagées par la chaleur et placées à 4°C maintiennent leur thermotolérance pendant près de 24 h après le choc thermique (181).

Les cellules cultivées à 43°C ont une thermorésistance plus grande que celles qui sont cultivées à 37°C et endommagées à 43°C (307).

Une dose de 100 cellules/ml de bouillon trypticase-soja non endommagées est nécessaire pour la pathogénicité alors qu'une dose de 10000 cellules endommagées par la chaleur est considérablement moins pathogène (356).

La perte de l'activité hémolytique accompagne la diminution de la virulence.

De plus, les cellules endommagées par la chaleur et restaurées sont aussi pathogènes que les cellules non endommagées.

Il apparaît que Listeria innocua possède une thermorésistance similaire à Listeria monocytogenes et que le sérotype 1/2a est plus thermorésistant que le sérotype 4.

Une période optimale de restauration des cellules endommagées par la chaleur semble être de 6 à 9 h en milieu non sélectif.

De plus, les sucres, les sels, les polyols comme le glycérol ou le mannitol diminuent l'endommagement par la chaleur alors que le fructose et le chlorure d'ammonium augmente la létalité (526).

L'ajout de catalase ou de pyruvate aux milieux sélectifs ne semble pas améliorer la restauration des cellules endommagées par la chaleur (382) (526).

Listeria innocua M1 est développée comme un indicateur biologique non pathogène pour évaluer l'inactivation thermique pour Listeria monocytogenes par sélection d'un mutant résistant à la rifampicine et à la streptomycine (176).

IV. CONGELATION.

La congélation entraîne un pourcentage élevé de létalité et d'endommagement (160).

La comparaison de la congélation de Listeria monocytogenes à -18°C 30 minutes et dans l'azote liquide à -198°C 10 minutes montre que :

- la solidification nécessite 15 minutes à -18°C et environ 1 minute à -198°C,

- la congélation et le stockage 1 mois en tampon phosphate (PB) à -18°C provoque 87 % de létalité et 79 % d'endommagement et 54 et 45 % respectivement en bouillon tryptose (TB) à -18°C,

- la congélation et le stockage 1 mois dans l'azote liquide en tampon PB ne provoque pas de mort ou d'endommagement et un peu de mort et d'endommagement dans TB,

- la congélation à -198°C suivie du stockage 1 mois à -18°C aboutit à 60 % de létalité et 36 % d'endommagement dans PB alors qu'en TB on observe 61 % de létalité et 44,2 % d'endommagement,

- des congélations - décongélations répétées produisent plus de létalité et d'endommagement qu'un cycle unique de congélation - décongélation.

La congélation et le stockage à -18°C de Listeria monocytogenes en tampon phosphate avec ou sans glycérol, matière grasse du lait, lactose, caséine (159) montrent que :

- 2 ou 4 % de glycérol protège Listeria monocytogenes de la mort et de l'endommagement pendant près de 6 mois à -18°C,

- 2 % de lactose, de matière grasse du lait et de caséine procure une meilleure protection que le glycérol (2 %) donc les composés du lait protège Listeria monocytogenes de la mort et de l'endommagement mais moins que le glycérol,

- la protection du lactose et de la matière grasse du lait contre la mort durant le stockage à -18°C est observé durant 4 semaines et contre l'endommagement durant 5 mois et 4 semaines respectivement,

- la protection de la caséine contre la mort et l'endommagement se produit durant le stockage à -18°C pendant près de 6 mois,

- le petit lait n'apporte aucune protection durant la congélation et le stockage,

- l'augmentation de concentration en matière grasse du lait de 2 à 4 % ne modifie pas la mort de Listeria monocytogenes mais diminue l'endommagement seulement durant les premières 24 h de stockage,

- un changement similaire de la concentration en lactose aboutit à une diminution de la létalité de Listeria monocytogenes durant le stockage pendant près de 6 mois et à une diminution de l'endommagement seulement durant les premières 24 h de stockage.

V. CONTROLE DE LA CROISSANCE ET EFFETS ANTILISTERIA.

Listeria monocytogenes peut se multiplier à des pH compris entre 5 et 9 et peut persister plus longtemps à faible pH, à faible température plutôt qu'à 30°C.

Listeria monocytogenes tolère NaCl.

En effet, Listeria pousse dans une solution à 6 %, son nombre demeure inchangé dans une solution à 16 % et diminue dans une solution à 26 % (271) (512).

Le nitrite de sodium ($NaNO_2$) ne peut pas inhiber Listeria monocytogenes mais une combinaison de 100 ppm de nitrite, 3 % de NaCl et un pH de 5,5 en bouillon trypticase-soja peut inhiber la croissance à 5°C alors que 25000 ppm de nitrite seul ne peut pas empêcher la croissance à pH 7,4 (290) (511).

De faibles température et pH augmentent l'efficacité des acides benzoïque et sorbique (162) (167) (168).

Exposer Listeria monocytogenes à une solution de propionate de sodium à 8 % pendant 60 minutes cause 87 % d'endommagement (77).

Le propyl de parahydroxybenzoate est efficace pour inhiber la croissance (433).

Les échantillons trempés dans la fumée liquide et ensuite emballés sous vide et réfrigérés montrent une réduction du nombre de Listeria après 72 h alors que le nombre des échantillons non traités reste inchangé (394).

L'activité antilisteria est attribuée à un contenu élevé en phénols polaires dans la fumée liquide.

Le clou de girofle et l'origan sont les plus inhibitrices des épices et herbes testées suivies de la sauge, du romarin, de la muscade alors que le poivre noir, le chili, la cannelle, l'ail, la moutarde, le paprika, le persil et le poivre rouge n'inhibent pas la croissance (172).

L'effet inhibiteur de certains acides gras et monoglycérides sur la croissance des Listeria a été étudié (568).

L'acide laurique, l'acide linolénique et le glycérylmonolaurate ont la plus forte activité bactéricide à la concentration de 10 à 20 µg/ml alors que les acides linoléiques conjugués au potassium et l'acide linoléique sont bactéricides à la concentration de 50 à 200 µg/ml.

Par contre, l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique, le glycérylmonomyristate et le glycérylmonopalmitate ne sont pas inhibiteurs à la dose de 200 µg/ml.

La nisine a un effet inhibiteur (35) (276) (289) (377) (399) mais ce dernier est moindre en présence d'une forte concentration en matière grasse et d'émulsifiant non ionique comme le Tween 80 alors que la lécithine (émulsifiant anionique) n'a pas d'effet.

La sensibilité à la nisine est augmentée par l'addition de 2 % de NaCl ou par l'abaissement du pH du milieu de 6,5 à 5,5 avec les acides lactique ou chlorhydrique (245).

La présence d'acide gluconique utilisé dans la préparation du Cottage peut limiter la croissance de Listeria monocytogenes.

Aucun survivant n'est détecté dans le lait caillé et le petit lait du lait coagulé par l'acide gluconique alors qu'un faible nombre apparaît dans le lait caillé mais pas dans le petit lait du lait coagulé par l'acide chlorhydrique (166).

L'addition de poudre de cacao (2 et 10 %) au bouillon de culture inactive Listeria monocytogenes et cet effet est plus rapide lors de culture agitée ; de plus, l'apport de caséine (1,5 ou 3 %) contrecarre l'inactivation (434).

Ce sont les méthylxanthines : la caféine et la théobromine, constituants principaux de la poudre de cacao, qui sont inhibitrices (435).

Le degré d'inhibition des acides acétique, citrique et lactique augmente quand la température diminue et l'acide acétique est le plus préjudiciable suivi de l'acide lactique et de l'acide citrique ; ceci coïncide avec leur degré d'indissociation à savoir que l'acide acétique qui a la constante de dissociation la moins élevée est le plus nuisible (1) (428).

L'acide acétique provoque la plus grande inactivation mais l'acide citrique cause le plus grand degré d'endommagement suivi de l'acide lactique et de l'acide acétique (2).

Bien que le taux de croissance soit plus faible à 25°C qu'à 37°C, l'inhibition due au pH et aux acides est identique à ces deux températures (605).

Alors que les valeurs de pH initial diminuent et/ou les concentrations en acides augmentent, les taux de croissance de Listeria monocytogenes diminuent (605).

A concentrations équimolaires d'acides, le pH intracellulaire est le moins modifié par l'acide citrique et le plus par l'acide acétique (605).

Les bactéries lactiques (3) (41) (50) (86) (87) (124) (135) (136) (197) (244) (252) (253) (269) (340) (384) (413) (451) (480) (495) (496) (497) (498) (525) (528) (599) (611) ont un effet inhibiteur dans la viande et la salaison, de même que les bactéries corynéformes, bactéries lactiques atypiques, comme Brevibacterium linens, Arthrobacter nicotianae et Arthrobacter nucleogenes dans les fromages où elles peuvent être utilisées comme ferments (554).

Enterococcus faecalis possède aussi un effet inhibiteur sur Listeria monocytogenes mais son activité est limitée par l'absence de substrats peptidiques dans le milieu (10) (364).

Les carnobactéries (497) inhibent Listeria monocytogenes par sécrétion de bactériocines mais cette activité inhibitrice est éliminée par la trypsine mais pas par le traitement thermique.

VI. METHODES D'ISOLEMENT ET DE DETECTION.

La détection des Listeria dans les denrées alimentaires rencontre plusieurs difficultés à savoir :

- leur faible nombre,

- la présence d'une flore annexe importante,

- les altérations subies lors des process alimentaires.

d'où le développement de méthodes plus rapides faisant appel à l'immunologie ou à la biologie moléculaire.

VI. 1. METHODES CONVENTIONNELLES.

Ces méthodes font intervenir trois étapes :

- une ou deux phases d'ENRICHISSEMENT en milieux liquides sélectifs ou non sélectifs ; la deuxième phase permet d'augmenter l'efficacité de cette première étape,

- un ISOLEMENT en milieux solides sélectifs,

- une CONFIRMATION/IDENTIFICATION.

Ces méthodes sont officielles.

VI. 1. 1. ENRICHISSEMENT.

Quelle que soit la technique utilisée, l'enrichissement consiste en une incubation d'un échantillon alimentaire, clinique ou de l'environnement homogénéisé en présence d'un bouillon d'enrichissement sélectif ou non sélectif, à diverses températures pendant des temps variés.

Un certain nombre de bouillons ont déjà été décrits (90) (95) (381).

Les plus utilisés sont :

- le bouillon EB, dans la méthode FDA de LOVETT (acriflavine, acide nalidixique, cycloheximide) (347) (348) (349) (350),

- les bouillons primaire et secondaire de DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, modifiés par DONNELLY et BAIGENT ou LEB I et LEB II modifiés (acide nalidixique, acriflavine) ou UVM I et UVM II, dans la méthode USDA de McCLAIN et LEE (357) (358),

- le bouillon FRASER (199) ou bouillon LEB II de McCLAIN et LEE, modifié par addition de chlorure de lithium, de citrate ferrique ammoniacal et d'esculine, dans les méthodes FDA et USDA modifiées et dans la méthode officielle actuellement en vigueur en France dans laquelle l'enrichissement primaire est effectué en bouillon FRASER-DEMI où les quantités d'acide nalidixique et d'acriflavine sont réduites de moitié.

Ce bouillon est actuellement le plus utilisé car le plus sélectif du fait de la présence d'esculine et de citrate ferrique ammoniacal rendant le diagnostic aisé.

VI. 1. 2. ISOLEMENT.

L'isolement est réalisé à partir du bouillon d'enrichissement sur milieu gélosé sélectif renfermant un mélange d'antibiotiques ne permettant que la croissance des Listeria, de gélose et/ou peptone ou tryptone, d'extrait de levure et d'autres produits nutritifs.

Les différentes géloses sont incubées entre 30 et 37 °C, 24 à 48 h.

Les fonctions des principaux composés sont les suivantes :

- les peptones (polypeptone, peptone de soja), la tryptone et les extraits (levure et viande) fournissent une diversité d'éléments nutritifs nécessaires à la croissance des Listeria ; en particulier, l'extrait de levure est une source de complexe vitaminique B,

- le glucose et l'amidon représentent les sources énergétiques du développement,

- le chlorure de sodium améliore la sélectivité en assurant l'équilibre osmotique,

- les phosphates agissent en tant que substances tampons pour le maintien du pH,

- l'actidione ou cycloheximide inhibe le développement des moisissures saprophytes contaminantes et des levures et supprime la croissance de la microflore secondaire Gram (+),

- l'acriflavine est un agent sélectif possédant des propriétés bactériostatiques pour la plupart des bactéries à Gram positif et est faiblement antifongique,

- l'acide nalidixique inhibe la croissance de la flore à Gram négatif en bloquant la réplication de l'ADN des germes qui lui sont sensibles,

- le phényléthanol inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif,

- la glycine anhydre inhibe la croissance de la flore à Gram négatif et positif,

- le chlorure de lithium inhibe les Entérocoques (Streptocoques du groupe D) susceptibles d'hydrolyser l'esculine,

- la ceftazidime inhibe la microflore secondaire,

- l'esculine est un glucoside produisant du glucose et de l'esculétine laquelle réagit avec le citrate ferrique ammoniacal pour donner un complexe brun foncé à noir dans et autour des colonies.

Listeria monocytogenes est exigeante dans ses besoins nutritifs et nécessite un sucre, neuf acides aminés (leucine, isoleucine, valine, méthionine, arginine, cystéine, glutamine, histidine et tryptophane), quatre vitamines (riboflavine, thiamine, biotine et acide thioctique) et une source convenable de fer pour sa croissance (118) (449) (515) (516) (581).

De nombreuses géloses ont été décrites (6) (11) (19) (29) (81) (82) (84) (102) (142) (146) (148) (149) (153) (178) (204) (221) (222) (239) (241) (255) (294) (308) (317) (342) (354) (444) (449) (453) (454) (455) (530) (538) (541) (549) (607).

Les plus utilisées sont :

- la gélose McBRIDE modifiée en quantités d'agents sélectifs (chlorure de lithium, cycloheximide, acide nalidixique) ou gélose MMA ou MMLA ou MBGA (331), dans la méthode FDA et la méthode USDA modifiée,

- la gélose LPM ou Lithium chloride-Phenylethanol-Moxalactam, dans la méthode USDA et la méthode FDA modifiée.

La gélose LPM est une gélose sélective combinant les caractéristiques des géloses BAIRD-PARKER (17) et McBRIDE et du moxalactam lequel possède un très large spectre d'activité contre la plupart des bactéries Gram (+) et Gram (-) incluant Staphylococcus, Proteus, Bacillus et Pseudomonas spp.

- la gélose OXFORD de CURTIS (chlorure de lithium, colistine, céfotétane, acriflavine, esculine, fosfomycine) (121), dans les méthodes FDA et USDA modifiées et la méthode officielle française.

Cette gélose est un bon milieu sauf pour Listeria seeligeri et Listeria welshimeri en raison de la présence de fosfomycine.

- la gélose PALCAM ou Polymyxin, Acriflavin, Lithium chloride, Aesculin, Mannitol élaborée par VAN NETTEN et coll. (559) (560) contenant de la polymyxine, de l'acriflavine, du chlorure de lithium et de la ceftazidime.

L'incorporation d'esculine, de sels ferriques, de mannitol et de rouge de phénol font de cette gélose un milieu sélectif et différentiel.

Les Listeria hydrolysent l'esculine en glucose et esculétine laquelle forme avec les sels ferriques un complexe noir.

Elles ne fermentent pas le mannitol donc ne font pas virer le rouge de phénol.

Les colonies de Listeria sont donc gris-vertes avec une dépression centrale plus foncée voire noire, sont légèrement incrustées dans la gélose et sont entourées d'un halo noir.

Les souches d'Entérocoques ou de Staphylocoques donnent des colonies grises avec un halo brun-vert ou des colonies jaunes avec un halo jaune d'où le diagnostic aisé.

Les géloses PALCAM et OXFORD permettent une réduction élevée du développement de la microflore contaminante et une lecture moins fastidieuse donc sont actuellement les plus utilisées.

VI. 1. 3. CONFIRMATION DU GENRE ET IDENTIFICATION DE L'ESPECE.

Elles se font en deux étapes.

VI. 1. 3. 1. Caractérisation biochimique et morphologique.

Elle fait appel à deux types de méthodes.

VI. 1. 3. 1. 1. Méthodes classiques.

- Tests de confirmation du genre.

La méthode conventionnelle d'identification décrite dans le "Bacteriological Analytical Manual" (BAM) fait appel aux tests suivants :

- la coloration de Gram avec dans l'ordre les réactifs suivants : cristal violet (coloration), lugol (fixation), alcool-acétone (différenciation Gram (+)-Gram (-)) et safranine (recoloration) ; les Listeria sont des petits bacilles Gram (+).

- la recherche de la catalase ; les Listeria sont catalase (+).

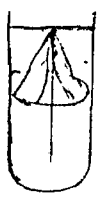
- la mobilité à température ambiante (20-25°C) ou à l'état frais avec une suspension dans NaCl 0,85 % sur lame recouverte d'une lamelle et examen au microscope en contraste de phase avec un objectif à immersion ; les Listeria sont des bacilles minces, courts, animés de légers mouvements rotatifs ou d'une mobilité en pirouette.

- l'hydrolyse de l'esculine, en bouillon au pourpre de bromocrésol supplémenté en esculine 24 à 48 h à 37°C ; l'hydrolyse de l'esculine est visualisée par le virage de l'indicateur au jaune-gris.

- la production d'acétoïne grâce au test de VOGES-PROSKAUER en présence de potasse et d'α-naphtol ; le virage au rouge vif indique que la réaction est positive.

mais aussi :

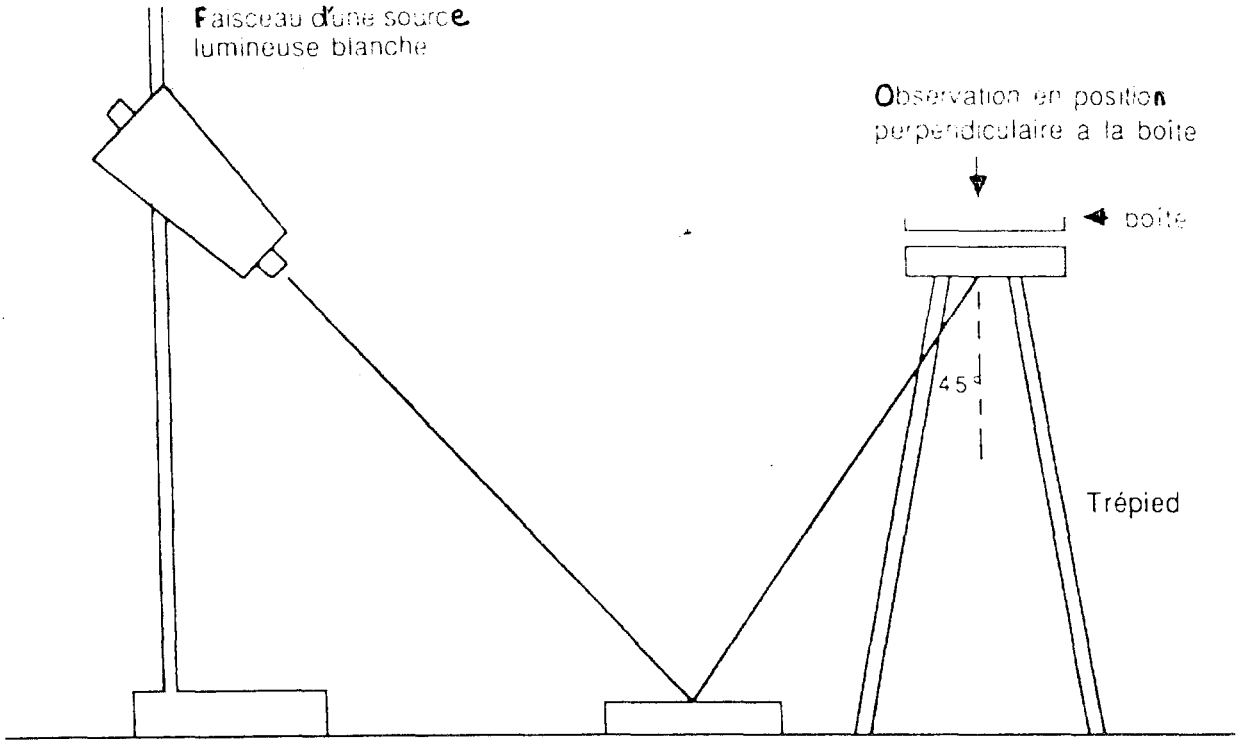
- la mobilité en milieu SIM, par ensemencement en piqûre centrale et examen après incubation 48 h à 30°C de la croissance autour de la piqûre ; les Listeria poussent autour de la piqûre et présentent le plus souvent une mobilité typique dite en ombrelle ou en parapluie.



- la recherche de l'oxydase ; test complémentaire pour distinguer les Pseudomonas.

- l'examen en transillumination oblique à 45° selon la technique de HENRY ; le faisceau doit être suffisamment puissant pour illuminer convenablement la boîte en la dirigeant de manière à atteindre le fond de la boîte sous un angle de 45° ; les Listeria présentent des surfaces bleues-grises et granuleuses.

EXAMEN DES BOITES POUR LE REPERAGE DES COLONIES SUSPECTES



- Tests d'identification de l'espèce.

Ils sont les suivants :

- hémolyse par inoculation à la surface d'une gélose au sang ou test à l'aide des hématies.

- la fermentation du D-xylose, du L-rhamnose, de l'α-méthyl-D-mannoside et du mannitol en bouillon tryptone contenant du bleu de bromothymol comme indicateur ou en milieu liquide au pourpre de bromocrésol (7 jours à 37°C) ; la production d'acide par les Listeria fait virer l'indicateur au jaune.

- le CAMP-test (107) sur gélose trypticase soja contenant du sang de mouton avec des ensemencements verticaux de Staphylococcus aureus et de Rhodococcus equi et horizontaux et parallèles (stries en échelle) entre les stries verticales des souches à tester.

Les ensemencements doivent être espacés d'environ 1 cm entre les stries horizontales et d'environ 1 à 2 mm entre chaque strie horizontale et les stries verticales de Staphylococcus aureus et Rhodococcus equi.

Staphylococcus aureus possède un zone d'hémolyse importante et Rhodococcus equi exalte la β-hémolyse de Listeria ivanovii et la fait apparaître sous un aspect caractéristique en forme de pelle.

Les hémolyses de Listeria monocytogenes et de Listeria seeligeri sont exaltées à proximité de la strie de Staphylococcus aureus (plus faiblement pour Listeria seeligeri).

Les autres espèces sont non hémolytiques.

Un nouveau test CAMP fait appel à une réaction hémolytique synergique entre Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus et Corynebacterium equi sur gélose au sang (367).

Une lyse synergique des cellules de sang de mouton est observée avec Listeria monocytogenes et soit Staphylococcus aureus soit Corynebacterium equi.

L'intéraction entre Listeria monocytogenes et Corynebacterium equi n'implique pas apparemment une étape de pré-sensibilisation ; une exposition simultanée aux cellules de sang de mouton aux deux extraits est nécessaire.

- la réduction des nitrates, en bouillon nitrate de potassium 5 jours à 37 °C puis ajout des réactifs nitrate 1 (acide sulfanilique - acide acétique) et 2 (alpha-naphtylamine - acide acétique) et si nécessaire de la poudre de zinc.

Ce test est à réalisé si la souche est mannitol (+).

- la production d'uréase,

- la production d'H_2S,

- l'étude de pathogénécité sur souris.

VI. 1. 3. 1. 2. Méthodes rapides.

- *Galerie API 50CH* (bioMérieux) (Annexe VII).

Cette méthode consiste en 5 bandes plastiques contenant chacune 10 cupules de substrat deshydraté reconstitué lors de l'inoculation de la suspension de micro-organisme.

La fermentation des substrats d'hydrates de carbone est déterminée par changement de couleur de l'indicateur de pH (rouge de phénol).

- *Système MAST-ID.*

Il s'agit d'une méthode de fermentation des hydrates de carbone basée sur l'incorporation de substrats d'hydrates de carbone variées autoclavables et d'un indicateur de pH (bleu de bromothymol) dans une gélose de base tryptone.

Les tests de fermentation sont positifs si la colonie et la gélose autour passent du bleu au jaune après 24h d'incubation.

L'utilisation d'une technique d'inoculation en plusieurs points permet l'identification et la détermination d'espèces d'un grand nombre d'organismes identifiés comme étant des Listeria spp. avec des quantités minimales de matériel et de travail.

De plus, elle peut être adaptée pour déterminer la production d'acétoïne et l'hydrolyse de l'esculine.

L'hydrolyse de l'esculine est indiquée par le noircissement de la gélose environnante.

Un test Voges-Proskauer positif est obtenu si les colonies virent au rouge après addition de KOH et d'α-naphtol.

Les résultats pour les souches dont les espèces sont déterminées par le système MAST-ID sont en accord avec ceux obtenus avec le système API 50CH (299).

Le système MAST-ID est peu coûteux et, utilisant une technique d'inoculation en plusieurs points, permet le criblage en boîte de Petri de 9 cm.

Le système API 50CH est plus cher et plus long ; il convient donc seulement à l'examen de petits nombres de souches.

Les deux méthodes MAST-ID et API 50CH permettent l'obtention de résultats en 24h d'incubation à l'opposé des tests de fermentation d'hydrates de carbone conventionnels qui nécessitent 5 jours.

- *Galerie API Listeria* (bioMérieux) (56) (Annexe VIII).

La galerie API Listeria, nouvellement apparue, permet de remplacer certains tests et de faire un diagnostic différentiel rapide au sein de l'espèce Listeria.

Il s'agit d'une nouvelle bande de 10 tests pour l'identification biochimique en 24 h des isolats de Listeria sans test complémentaire.

Un nouveau test différencie Listeria monocytogenes de Listeria innocua sur la base de l'absence d'arylamidase pour la première.

Ce système consiste donc en 10 tests :

- différenciation entre Listeria innocua et Listeria monocytogenes basée sur la présence ou l'absence d'arylamidase (DIM test),

- hydrolyse de l'esculine,

- présence d'α-mannosidase,

- production d'acide à partir de D-arabitol, D-xylose, L-rhamnose, α-méthyl-D-glucoside, D-ribose, glucose-1-phosphate et D-tagatose.

Trois caractéristiques biochimiques sont positives pour toutes les espèces : hydrolyse de l'esculine et production d'acide à partir de D-arabitol et d'α-méthyl-D-glucoside.

On observe une production d'acide à partir de glucose-1-phosphate pour Listeria ivanovii et à partir de D-tagatose pour Listeria welshimeri.

Ce test fournit trois nouveaux marqueurs :

- fermentation de D-tagatose pour Listeria welshimeri,

- fermentation de glucose-1-phosphate pour Listeria ivanovii,

remplaçant le CAMP-test avec Rhodococcus equi,

- DIM évitant le CAMP-test avec Staphylococcus aureus ; c'est un nouveau test basé sur la détection d'arylamidase présente dans les souches de Listeria innocua et dans la majorité des autres souches non monocytogenes.

Les changements de couleur des tests sont notés et permettent d'établir un profil numérique à 4 chiffres.

Le système API Listeria est facile à utiliser (seulement une bande), les tests ne sont pas nombreux (dix) et sont simples à interpréter ; il apparaît donc être un outil particulièrement prometteur en routine dans de nombreux laboratoires.

En raison de ses nombreux avantages, la galerie API Listeria est le moyen d'identification de Listeria utilisé dans les laboratoires d'analyse microbiologique.

Mais, il est nécessaire de réaliser une hémolyse en raison de la difficulté à lire le test DIM.

- *MICRO-ID Listeria* (laboratoire AES) (20) (466) (Annexe IX).

Ce test a été adopté par l'AOAC International comme alternative aux méthodes biochimiques approuvées par la FDA (262).

Ce test contient des disques de papier filtre imprégnés de substrats/réactifs chimiques spécifiques des enzymes endogènes de Listeria spp. qui sont convertis en produits finaux métaboliques visualisés par des changements de couleur.

Ce système incluant plusieurs tests conventionnels permet une identification d'espèces en 24 h au lieu de 7 jours avec la méthode biochimique conventionnelle (262), mais il doit être utilisé en combinaison avec le CAMP-test pour différencier, en particulier Listeria monocytogenes CAMP-test (+) de Listeria innocua non hémolytique et n'acidifiant pas le rhamnose d'une part mais aussi Listeria seeligeri et Listeria ivanovii hémolytiques de Listeria welshimeri non hémolytique et n'acidifiant pas le rhamnose.

Le kit des 15 tests est facile à utiliser et simple à interpréter mais 8 des 15 tests (PD, H_2S, I, OD, LD, M, U, ONPG) sont considérés superflus pour la différenciation de Listeria spp.

La lecture permet d'établir un code à 8 chiffres en ajoutant les valeurs numériques pour chaque groupe de 3 tests et en tenant compte aussi de la réaction hémolytique.

- *AutoMicrobic* (bioMérieux) (246) (Annexe X).

Il a été adopté par l'AOAC International pour la caractérisation biochimique de Listeria spp.

C'est un système d'identification microbien automatisé in vitro faisant appel à une chambre d'incubation avec un lecteur optique, une unité de remplissage et de scellage pour l'inoculation et un ordinateur ; chacune des deux fiches d'identification contient 30 tests biochimiques.

Les kits sont inoculés avec la même culture pure de chaque organisme et incubés en microaérophilie pour la fiche GPI (Gram (+)) et une partie des tests de la fiche GNI (Gram (-)) et en anaérobie pour la deuxième partie des tests de la fiche GNI.

Le lecteur optique mesure les changements de couleur et/ou turbidité et les transmet à l'ordinateur qui les analyse et les interprète afin de classer l'organisme en genre et/ou espèce.

Les 11 tests de la fiche GPI à savoir bacitracine, opticine, NaCl 6 %, bile 10 %, bile 40 %, esculine, rouge de tétrazolium, glucose, salicine, tréhalose et cellobiose et deux réactions de la fiche GNI (rhamnose et xylose) permettent de déterminer l'espèce.

Le CAMP-test, la β-hémolyse sur gélose au sang de mouton et/ou les tests de réduction des nitrates sont nécessaires pour différencier les espèces en trois groupes donc pour la confirmation finale.

Les organismes sont classés en différentes catégories à savoir :

- Listeria monocytogenes et Listeria innocua en catégorie LM,

- Listeria ivanovii et Listeria seeligeri en catégorie LI,

- Listeria welshimeri en catégorie LW,

- Listeria grayi et Listeria murrayi en catégorie LG,

- non Listeria en catégorie 0.

Les cultures classées Listeria monocytogenes/Listeria innocua sont confirmées Listeria monocytogenes si la culture démontre une hémolyse β et une hémolyse exaltée avec Staphylococcus aureus ou Listeria innocua si elle ne démontre pas d'hémolyse β et une hémolyse inhibée avec Staphylococcus aureus et Rhodococcus equi.

Les cultures classées Listeria ivanovii/Listeria seeligeri sont confirmées Listeria ivanovii si la culture démontre une hémolyse β et une hémolyse exaltée avec Rhodococcus equi ou Listeria seeligeri si elle démontre une hémolyse β et une hémolyse exaltée avec Staphylococcus aureus et inhibée avec Rhodococcus equi.

Les cultures classées Listeria welshimeri sont identifiées Listeria welshimeri.

Les cultures classées Listeria grayi/Listeria murrayi sont confirmées Listeria grayi si la culture est incapable de réduire les nitrates ou Listeria murrayi si la culture est capable de réduire les nitrates.

Le système AutoMicrobic peut être considéré comme une alternative objective et rapide aux tests biochimiques conventionnels décrits dans la méthode BAM ; en effet, la précision de la méthode des deux fiches GPI et GNI est comparable à celle de la méthode conventionnelle pour la caractérisation biochimique des espèces Listeria.

- *RAP-ID.*

Ce système a été décrit par LACHICA (319).

Il s'agit d'une identification rapide de Listeria monocytogenes et d'autres espèces Listeria en moins de 8 h après la formation de colonies sur gélose LCA et faisant intervenir :

- une détermination rapide de l'activité hémolytique,

- une acidification du rhamnose et du xylose,

- des tests supplémentaires complétant l'identification rapide et consistant en :

. une microscopie à contraste de phase pour étudier la morphologie cellulaire et la mobilité,

. le test de production de catalase,

. le test de viscosité KOH remplaçant la coloration de Gram.

Les souches sont donc cultivées sur gélose LCA ou gélose chlorure de lithium-ceftazidime (317) consistant en une gélose BHIA supplémentée en agents sélectifs à savoir chlorure de lithium, glycine anhydre et ceftazidime pentahydratée.

Des colonies bien isolées, blanches, finement texturées, denses, en forme de coupole et atteignant un diamètre de 2,5 mm ou 2 mm pour Listeria ivanovii sont obtenues après 40 h à 30°C.

La gélose LCA joue un rôle critique dans le RAP-ID en permettant sélectivement la croissance des Listeria sous forme de grandes colonies possédant une activité catalase élevée ; LCA inhibe les bactéries Gram (-).

La reconnaissance des colonies sur gélose LCA fait appel à la technique SHOT ou technique de transillumination oblique de HENRY simplifiée (318) ; les colonies apparaissent bleutées.

RAP-ID consiste donc à soumettre ces colonies bleutées par la technique SHOT à une batterie de tests sans étape de purification préalable.

Les tests utilisés sont :

- le test d'activité hémolytique consistant à disposer un disque stérile de β lysine au centre d'une gélose au sang (7 h à 35 °C).

Les colonies de Listeria monocytogenes et Listeria seeligeri (CAMP-test avec Staphylococcus aureus (+)) donnent un éclaircissement à proximité du disque de β lysine sur la gélose au sang.

Listeria ivanovii (CAMP-test avec Rhodococcus equi (+)) montre une hémolyse rapide sans potentialisation par le disque de la β lysine staphylococcique.

Les autres Listeria ne montrent pas d'hémolyse.

- l'acidification rapide des sucres par production d'acide à partir de rhamnose et de xylose sur gélose colorée en violet supplémentée en sucre à étudier jusqu'à une concentration finale en hydrate de carbone du milieu de 1 %.

En 6 h, les colonies de Listeria monocytogenes virent au jaune sur gélose violette supplémentée en rhamnose mais pas sur gélose violette supplémentée en xylose.

On observe l'inverse avec Listeria seeligeri.

Seules les colonies de Listeria seeligeri, Listeria welshimeri et Listeria ivanovii deviennent jaunes sur gélose xylose.

- la microscopie à contraste de phase par remise en suspension des colonies sur lame dans de l'eau distillée ; la lame est recouverte d'une lamelle et examinée avec un microscope à contraste de phase pour la morphologie cellulaire et la mobilité.

- le test de la catalase par ajout à la suspension cellulaire précédemment préparée d'une goutte d'eau oxygénée d'un côté de la lamelle et observation d'une effervescence immédiate d'un bout à l'autre de la lamelle,

- le test de viscosité KOH par réalisation d'une suspension dans une goutte de KOH sur lame et observation d'une masse visqueuse avec les bactéries Gram (-) alors que les bactéries Gram (+) comme Listeria sont imperméables à l'action lytique de l'alcalin ; Listeria est donc négative au test de viscosité KOH.

Des tests supplémentaires comme la fermentation du mannitol et la réduction des nitrates sont nécessaires pour différencier les souches rhamnose (-) de Listeria innocua de Listeria grayi, Listeria murrayi et Jonesia denitrificans.

L'omission des tests de fermentation du mannitol, le CAMP-test avec Rhodococcus equi et la mobilité en parapluie n'a pas d'effet sur l'efficacité du RAP-ID dans l'identification des souches diverses de Listeria monocytogenes.

RAP-ID est une procédure rapide pouvant être effectuée par une seule personne travaillant en conditions aseptiques et elle ne nécessite pas un équipement spécial ni des réactifs instables.

Les souches sont ensuite caractérisées phénotypiquement.

VI. 1. 3. 2. Caractérisation phénotypique.

VI. 1. 3. 2. 1. Sérotypage.

Il est effectué au Centre National de Référence de NANTES et repose sur une agglutination sur lame avec des antisérums ; il s'agit d'une combinaison antigénique.

VI. 1. 3. 2. 2. Lysotypage.

Il est effectué au Centre National de Référence pour la Lysotypie et le Typage Moléculaire à l'Institut Pasteur à PARIS et repose sur une sensibilité à un certain nombre de bactériophages.

VI. 1. 4. METHODES REFERENCEES.

Ces méthodes sont diverses à savoir :

- le procédé d'enrichissement à froid sélectif (CE),

- la méthode FDA,

- la méthode USDA,

- les méthodes faisant l'objet de notes de service de la part de Ministère de l'Agriculture.

VI. 1. 4. 1. Procédé à froid (CE ou Cold Enrichment).

Ce procédé ou méthode traditionnelle fait appel à une réfrigération de l'échantillon après dilution en bouillon non sélectif comme le bouillon tryptone ou en bouillon nutritif généralement en bouillon tryptone phosphate (TPB) et incubation à 4°C plusieurs semaines voire des mois.

L'enrichissement en bouillon nutritif peut être suivi après 1, 4 et 8 semaines d'un enrichissement en bouillon sélectif consistant en un bouillon nutritif supplémenté en acide nalidixique et en thiocyanate de potassium.

L'enrichissement est suivi d'un isolement à 24h sur gélose sélective, par exemple MMA ou LPM + AC puis une fois par semaine (au bout de 1, 2, 4, 6, 10 et 12 semaines).

Les géloses sont incubées à 35°C.

L'inconvénient majeur de ce procédé est sa longueur ; en effet, la détection peut prendre 3 mois.

L'avantage de ce procédé réside en sa sélectivité puisque l'incubation à 4°C supprime la croissance de la plupart des micro-organismes mais les Listeria se multiplient lentement avec un temps de génération de 1,5 jours.

Plusieurs théories expliquent le succès de cette procédure.

La première théorie est que cette méthode met à profit la nature psychrotrophique des Listeria, permettant aux organismes de prendre le dessus sur les contaminants qui sont capables de pousser sous conditions de stockage réfrigéré et peuvent même mourir pendant un temps prolongé sous stockage à froid.

La deuxième théorie est que Listeria dans les échantillons cliniques peuvent exister dans un stade intracellulaire à l'intérieur des monocytes, macrophages ou d'autres cellules phagocytiques donc un stockage à froid prolongé facilite la libération de Listeria à partir de cette position intracellulaire.

Les premières modifications importantes apportées à ce procédé sont :

- l'utilisation de l'illumination oblique décrite par HENRY (261) et réalisée par réflexion d'une source lumineuse blanche à partir d'un miroir de telle façon que la lumière touche le fond de la boîte de Petri avec un angle de 45°.

Par examen avec soit une lentille grossissante soit un microscope en utilisant la lumière transmise obliquement, Listeria apparaît légèrement surélevée, petite, lisse, bleue à bleue-verte.

- le développement d'une gélose sélective par McBRIDE et GIRARD (354) utilisant la production d'une étroite zone de bêta-hémolyse par les colonies poussant sur gélose au sang et l'aptitude de Listeria à résister au phényléthanol, à la glycine anhydre et au chlorure de lithium, les agents différentiels/sélectifs clés de la gélose.

Sur gélose McBRIDE, Listeria apparaît comme une goutte de rosée entourée par une faible zone d'hémolyse, ce qui permet leur différenciation des contaminants produisant des hémolyses prononcées.

- l'utilisation d'agents sélectifs comme l'acide nalidixique et la trypaflavine en combinaison en milieux sélectifs.

BEERENS et TALLON-CASTEL (31) ont démontré que l'incorporation d'acide nalidixique en milieu d'enrichissement sélectif est utile pour supprimer la croissance des contaminants Gram (-).

RALOVICH et coll. (455) ont démontré que l'incorporation d'acriflavine en milieu d'enrichissement sélectif supprime la croissance des contaminants Gram (+), procurant un milieu hautement sélectif qui facilite la sélection des Listeria des contaminants environnants.

VI. 1. 4. 2. Méthode FDA de LOVETT (347) (348) (349) (350).

La méthode FDA ou "US Food and Drug Administration" de LOVETT s'applique à tous les aliments sauf la viande rouge et la volaille.

Cette méthode a probablement subi plus de vérifications que n'importe quelle nouvelle méthode et certains changements ont été réalisés depuis sa première utilisation.

Elle fait appel à un enrichissement en bouillon EB à 30°C puis à un isolement sur gélose MMA à 1, 2 et 7 jours d'enrichissement.

MMA est incubée 48h à 35°C.

Les colonies sont examinées avec une lumière oblique ; les colonies suspectes sont transférées sur TSA et soumises aux analyses biochimiques.

La méthode FDA modifiée fait appel à un enrichissement en bouillon EB puis à un isolement sur trois géloses différentes, à savoir MMA, OXFORD et LPM à 1, 2, 4 et 7 jours d'enrichissement.

Elle s'applique à tous les aliments.

La méthode FDA modifiée avec bouillon FRASER fait appel à un enrichissement primaire en bouillon EB, à un enrichissement secondaire en bouillon FRASER puis à un isolement sur MMA, OXFORD et LPM à 1, 2, 4 et 7 jours d'enrichissement.

Elle s'applique à tous les aliments.

Certaines précautions sont nécessaires à savoir :

- prendre des colonies blanches aussi bien que des colonies bleues à bleues-grises.

- ne pas augmenter la concentration en cycloheximide.

Des taux élevés de ce composé peuvent réduire la détection des Listeria.

- incuber les boîtes McBRIDE modifiée jusqu'à 72h.

Les colonies Listeria peuvent être mieux observées à 48 et 72h.

- réfrigérer la solution acriflavine - cycloheximide et l'utiliser dans les 10 jours de sa préparation,

- analyser le bouillon d'enrichissement à 3-4 jours en plus de 1 et 7 jours ; en effet, les essais après 48-96h d'incubation peuvent donner de meilleurs résultats que ceux après 24h d'incubation.

VI. 1. 4. 3. Méthode USDA de McCLAIN et LEE (357) (358).

La méthode USDA ou "US Department of Agriculture" de McCLAIN et LEE s'applique à toutes les viandes rouges et les volailles.

Elle fait appel à un enrichissement en deux étapes, à savoir primaire en bouillon LEB I ou UVM I à 30°C puis secondaire en bouillon LEB II ou UVM II à 24 h à 30°C, suivi d'un isolement sur gélose LPM à 24 h d'enrichissement.

LPM est incubée 48h à 35°C.

Les colonies sont examinées avec une lumière oblique ; les colonies suspectes sont transférées sur TSA et soumises aux analyses biochimiques.

La méthode USDA modifiée fait appel à un enrichissement primaire en bouillon LEB I et secondaire en bouillon LEB II à 1 et 7 jours suivi d'un isolement sur trois géloses différentes, à savoir LPM, MMA et OXFORD à 1 et 7 jours d'enrichissement.

Elle s'applique à tous les aliments.

La méthode USDA modifiée avec le bouillon FRASER fait appel à un enrichissement primaire en bouillon LEB I et secondaire en bouillon FRASER à 1 et 7 jours suivi d'un isolement sur LPM, MMA et OXFORD à 1 et 7 jours d'enrichissement.

Elle s'applique à tous les aliments.

VI. 1. 4. 4. Comparaison des méthodes FDA et USDA (538) (572).

(Tableau XV)

La sélectivité est améliorée dans le cas de la méthode FDA par l'utilisation du bouillon FRASER et des géloses LPM et OXFORD.

La méthode USDA modifiée est aussi efficace que la méthode USDA modifiée avec bouillon FRASER.

Le procédé d'enrichissement en deux étapes améliore la détection de Listeria spp. dans les aliments en inhibant la croissance des autres micro-organismes durant l'enrichissement.

Listeria monocytogenes est isolée de façon plus efficace sur gélose OXFORD que sur géloses MMA et LPM.

La méthode USDA est légèrement plus efficace que la méthode FDA.

Tableau XV : Méthodes FDA et USDA

	METHODE FDA			METHODE USDA		
	Méthode FDA	**Méthode FDA modifiée**	**Méthode FDA modifiée avec FB**	**Méthode USDA**	**Méthode USDA modifiée**	**Méthode USDA modifiée avec FB**
ECHANTILLONS	Tous les aliments (sauf les viandes rouges et la volaille) et les échantillons de l'environnement	Tous les aliments incluant les viandes rouges et la volaille et les échantillons de l'environnement	Tous les aliments incluant les viandes rouges et la volaille et les échantillons de l'environnement	Tous les viandes rouges et les échantillons de l'environnement	Tous les aliments et les échantillons de l'environnement	Tous les aliments et les échantillons de l'environnement
BOUILLONS D'ENRICHISSEMENT	25 g + 225 ml EB	25 g + 225 ml EB	25 g + 225 ml EB	25 g + 225 ml LEB I	25 g + 225 ml LEB I	25 g + 225 ml LEB I
TEMPS D'INCUBATION A 30°C	1, 2 et 7 jours	1, 2, 4 et 7 jours	1, 2, 4 et 7 jours	24 h	1 et 7 jours	1 et 7 jours
ENRICHISSEMENT SECONDAIRE			0,1 ml dans FB 24-48 h à 35°C	0,1 ml dans LEB II 24 h à 30°C	0,1 ml dans LEB II 24 h à 30°C	0,1 ml dans FB 24-48 h à 35°C
MILIEUX DE CULTURE	MMA 24-48 h à 35°C	MMA, LPM et OXFORD 24-48 h à 30°C	MMA, LPM et OXFORD 24-48 h à 30°C	LPM	LPM, MMA et OXFORD	LPM, MMA et OXFORD
TESTS DE CONFIRMATION	Catalase Hémolyse Mobilité Coloration de Gram Sucres CAMP-test MR-VP Sérologie après purification sur TSA-YE	Catalase Hémolyse Mobilité Coloration de Gram Sucres CAMP-test MR-VP Sérologie après purification sur TSA-YE	Catalase Hémolyse Mobilité Coloration de Gram Sucres CAMP-test MR-VP Sérologie après purification sur TSA-YE	Catalase Hémolyse Mobilité Coloration de Gram Sucres CAMP-test MR-VP Sérologie après purification sur TSA-YE	Catalase Hémolyse Mobilité Coloration de Gram Sucres CAMP-test MR-VP Sérologie après purification sur TSA-YE	Catalase Hémolyse Mobilité Coloration de Gram Sucres CAMP-test MR-VP Sérologie après purification sur TSA-YE

VI. 1. 4. 5. Comparaison des méthodes FDA et USDA avec le procédé CE.

- FDA et CE (444) :

La comparaison des procédés CE (TPB et MMA) et FDA (EB et MMA) montre que la méthode FDA est plus efficace que la méthode CE pour le poulet mais pas pour le fromage.

- USDA et CE (256) :

La comparaison des procédés CE (TPB puis bouillon sélectif et LPM + AC) et USDA (LEB I, LEB II et LPM) montre que :

- les deux méthodes combinées sont significativement meilleures qu'une seule méthode.

- la méthode USDA est plus efficace et plus sensible que la méthode CE pour isoler Listeria monocytogenes à partir de la viande, de la volaille et des végétaux.

- les deux méthodes sont aussi efficaces l'une que l'autre pour isoler Listeria monocytogenes à partir des produits laitiers.

- FDA, USDA et CE (120) :

La comparaison de ces trois procédés montre que la méthode USDA s'avère être la meilleure pour isoler Listeria monocytogenes à partir d'une grande variété d'aliments.

VI. 1. 4. 6. Etude comparative de trois protocoles de recherche de Listeria spp. et de Listeria monocytogenes (462). (Figure 6)

Cette étude a été réalisée par le laboratoire inter-régional de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes de MONTPELLIER.

Elle consiste à comparer trois protocoles de recherche de Listeria spp. et Listeria monocytogenes dans des produits alimentaires à savoir des produits laitiers (fromages au lait cru), des produits végétaux (salades, herbes aromatiques) et des produits de la pêche (crevettes crues et cuites).

Les trois méthodes comparées sont :

- la méthode FRASER utilisant le milieu d'enrichissement liquide de FRASER,

- la méthode MLEB utilisant le milieu d'enrichissement liquide MLEB ou Modified Enrichment Broth (bouillon trypticase soja supplémenté en extrait de levure, chlorhydrate d'acriflavine, acide nalidixique, cycloheximide),

- la méthode UVM utilisant les milieux d'enrichissement primaire UVM I et secondaire UVM II.

Tous les isolements sont effectués sur milieux d'isolement sélectifs PALCAM, OXFORD et MOX.

Pour ces trois méthodes, la recherche fait appel à trois étapes :

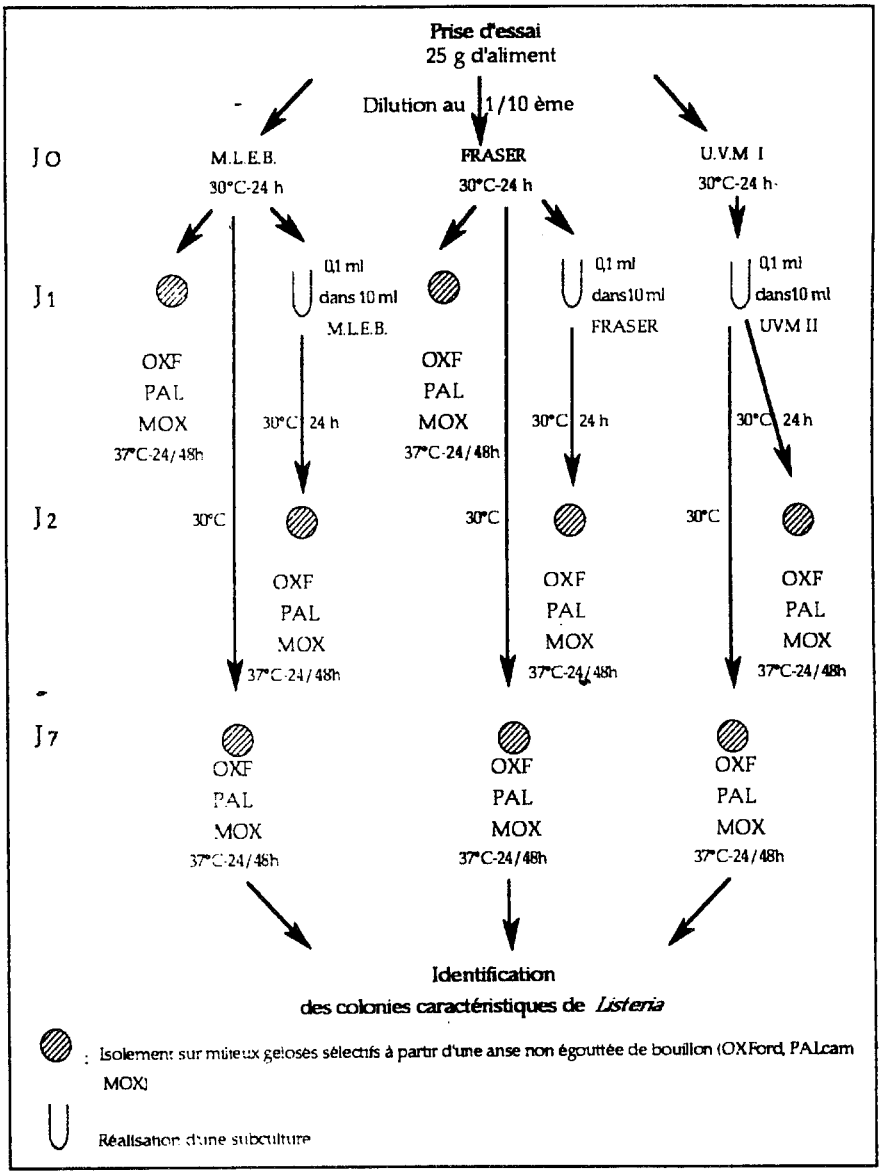
- un enrichissement en bouillon sélectif (FRASER, MLEB, UVM I et UVM II),

- un isolement sur milieu sélectif après 24 h (sauf pour UVM I), 48 h et 7 jours d'incubation.

L'isolement à 48 h est effectué à partir d'une subculture du bouillon d'enrichissement incubé 24 h à 30°C.

L'incubation est poursuivie 7 jours seulement si les isolements à 24 h et 48 h sont négatifs.

Figure 6 : Méthodes de recherche de Listeria monocytogenes.



- une identification/confirmation des colonies caractéristiques avec les tests suivants, après isolement de 5 colonies caractéristiques de Listeria spp. obtenues sur chaque milieu sélectif sur gélose TSAYE :

  . la transillumination oblique de HENRY avec une lampe à faisceau de lumière blanche ; les colonies du genre Listeria ont un reflet bleuté, une surface finement granuleuse et légèrement convexe,

  . une recherche de la catalase avec de l'eau oxygénée ; le genre Listeria est catalase (+),

  . un test d'utilisation du D(+)-xylose et du α-L-rhamnose,

  . une hémolyse sur gélose au sang,

  . un CAMP-test avec Staphylococcus aureus et Rhodococcus equi sur gélose au sang (activité hémolytique) faisant appel à un ensemencement des souches en stries horizontales parallèles tracées entre deux stries verticales d'ensemencement de Staphylococcus aureus et de Rhodococcus equi ; Listeria monocytogenes présente une hémolyse exaltée du côté de la culture de Staphylococcus aureus,

  . une coloration de Gram ; les bactéries du genre Listeria sont de petits bacilles Gram (+), fins, disposés en palissades.

Les résultats montrent que :

- la méthode FRASER est supérieure à la méthode MLEB,

- la méthode UVM donne des résultats pratiquement identiques à la méthode FRASER mais les résultats positifs après un enrichissement de 7 jours sont plus nombreux avec la méthode UVM et la méthode FRASER donne des résultats positifs plus rapidement pour quelques échantillons,

- les différences d'efficacité observées peuvent être expliquées par la composition des bouillons d'enrichissement :

. le bouillon MLEB contient trois antibiotiques : l'acriflavine, l'acide nalidixique inhibant la croissance de la microflore secondaire Gram (+) et Gram (-) et le cycloheximide possédant une action antifongique,

. le bouillon FRASER renferme du chlorure de lithium au lieu du cycloheximide ; le chlorure de lithium inhibe la plupart des Entérocoques,

. le bouillon FRASER possède un pouvoir tampon élevé, réduisant les variations de pH, alors que le bouillon MLEB n'est pas tamponné (la subculture a pour rôle de remonter le pH vers la neutralité),

. le bouillon FRASER doit donc son efficacité à sa maîtrise du pH et à sa composition en agents inhibiteurs, favorables à une meilleure récupération des cellules lésées,

. le bouillon MLEB renferme du glucose pouvant affecter la récupération des cellules lésées car la flore contaminante peut utiliser ce glucose et ainsi acidifier le milieu.

Il ressort donc de cette étude comparative que la méthode FRASER utilisant le milieu d'enrichissement liquide de FRASER est la méthode la plus efficace et la plus rapide pour la recherche des Listeria puisque la plupart des résultats sont obtenus après un enrichissement de 24 h et de 48 h.

VI. 1. 4. 7. Méthodes référencées en FRANCE. (Tableau XVI)

En France, le Ministère de l'Agriculture a émis des notes de service concernant la détection de Listeria monocytogenes suivant les aliments.

Elles sont au nombre de 3.

- une note de service concernant les produits carnés (Annexe XI).

Elle fait appel à un enrichissement primaire en bouillon UVM I puis un enrichissement secondaire en bouilon FRASER à 24 h suivi d'un isolement sur gélose OXFORD à 24 h.

- la note de service du 17 Juillet 1992 concernant les produits laitiers (Annexe XII).

Elle fait appel à un enrichissement en bouillon EB puis un isolement sur géloses OX, PALCAM et MOX.

- la note de service du 24 Juin 1993 concernant tous les produits (Annexe XIII).

Elle fait appel à un enrichissement primaire en bouillon FRASER-DEMI suivi d'un isolement sur géloses OXFORD ou PALCAM et d'un enrichissement secondaire en bouillon FRASER et enfin à un isolement sur géloses OXFORD ou PALCAM.

Cette méthode est actuellement celle qui est employée dans les laboratoires de microbiologie, du fait de sa spécificité élevée (3 isolements).

Dans la plupart des cas, les laboratoires font appel à un isolement sur gélose PALCAM et à une identification au moyen d'une galerie API Listeria associée à un CAMP-test avec Staphylococcus aureus et Rhodococcus equi après purification des colonies obtenues sur gélose PALCAM sur gélose PCA.

L'article 2 de l'arrêté du 13 Mai 1992 concerne la méthode de dénombrement de Listeria monocytogenes dans les produits végétaux ou d'origine végétale destinés à la consommation humaine par comptage des colonies à 37°C (Annexe XIV).

Elle fait appel à un enrichissement et à un isolement sur géloses OXFORD, MOX et PALCAM puis à un repérage des colonies caractéristiques.

Ces colonies sont isolées en stries à la surface de la gélose TSAYE.

ECHANTILLONS	Produits carnés	Produits laitiers	Tous les produits
ENRICHISSEMENT	25 g + 225 ml UVM	25 g + 225 ml EB	25 g + 225 ml FRASER-DEMI
TEMPS D'INCUBATION	24h à 30°C	48 h à 30°C 24-48 h à 30°C (lait cru) 48 h et 7 jours à 30°C (fromages)	18-24 h à 30°C
ENRICHISSEMENT SECONDAIRE	0,1 ml + 10 ml FRASER 24h à 30°C		0,1 ml + 10 ml FRASER 48h à 37°C
MILIEUX DE CULTURE	OXFORD 24-48 h à 37°C	OX PALCAM MOX	à 18-24 h et à 42-48 h OXFORD ou PALCAM
TESTS DE CONFIRMATION	Coloration de Gram Catalase Mobilité à l'état frais et en milieu SIM Epreuve de CAMP Réduction des nitrates Fermentation des hydrates de carbone Hydrolyse de l'esculine après repiquage des colonies sur gélose TSAYE pour purification	Coloration de Gram Catalase Mobilité à l'état frais et en milieu SIM Epreuve de CAMP Réduction des nitrates Fermentation des hydrates de carbone Hydrolyse de l'esculine après repiquage des colonies sur gélose TSAYE pour purification	Coloration de Gram Catalase Mobilité à l'état frais et en milieu SIM Epreuve de CAMP Réduction des nitrates Fermentation des hydrates de carbone Hydrolyse de l'esculine après repiquage des colonies sur gélose TSAYE pour purification

Tableau XVI : Méthodes référencées en France

Les boîtes de gélose sont examinées et les colonies suspectes sont repérées à l'aide d'un faisceau lumineux blanc sous un angle de 45°.

Les colonies typiques sont soumises à l'épreuve de la catalase, à la coloration de Gram, au test de fermentation du xylose et du rhamnose, à l'épreuve du CAMP et à la mobilité à l'état frais au microscope à contraste de phase avec un objectif à immersion et sur gélose mobilité (milieu SIM) par ensemencement en piqûre (mobilité en parapluie).

VI. 2. METHODES RAPIDES.

Elles ont été mises en place du fait des nombreux inconvénients des techniques classiques comme :

- la lourdeur de la mise en œuvre,

- les nombreuses manipulations,

- la nécessité de personnel spécialisé,

- les longs délais de réponse.

Mais, elles ne permettent pas de faire des dénombrements et par conséquent sont utilisées actuellement uniquement en routine dans les deux Centres de Référence.

VI. 2. 1. METHODES IMMUNOLOGIQUES OU IMMUNOENZYMATIQUES.

Ces méthodes sont basées sur l'intéraction entre un anticorps monoclonal (51) (96) (177) (195) (259) (372) (385) (407) (408) (519) (551) (614) ou polyclonal (425) et un antigène.

Elles nécessitent au préalable un enrichissement de 24 à 48 h.

VI. 2. 1. 1. Kits ELISA.

- Kit Listeria Tek (ORGANON TEKNICA CORP) (Annexe XV).

Il s'agit d'une procédure en une étape utilisant deux anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de Listeria spp. selon une technique Sandwich dans un essai ELISA.

L'échantillon est incubé simultanément avec l'anticorps monoclonal de capture ou anticorps de couverture détectant un épitope spécifique de l'antigène des Listeria et avec l'anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase de raifort ou anticorps détecteur détectant un second épitope spécifique sur le même antigène déjà détecté par l'anticorps monoclonal de capture.

Le conjugué composé d'anticorps monoclonal marqué par une enzyme reconnaît selon une réaction de type Sandwich l'antigène du complexe immunologique antigène présent dans l'échantillon - anticorps monoclonal lié à la plaque.

L'enzyme du conjugué réagit avec le substrat TMB ou 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine en solution dans du peroxyde d'hydrogène en développant une coloration bleue directement proportionnelle au taux d'antigène.

La réaction est stoppée par addition d'acide fort (H_2SO_4 2N) et vire du bleu au jaune.

L'absorption est mesurée au spectrophotomètre à 450 nm.

Ce test est :

- très sensible et spécifique puisque deux anticorps monoclonaux différents sont utilisés ; un pour la capture de l'antigène et un autre pour la conjugaison enzymatique,

- rapide puisque les résultats sont obtenus en 2 h,

- simple à réaliser,

- facile à interpréter,

- aussi sensible et précis que les meilleures méthodes de culture,

- sans danger car il ne fait pas appel à des cultures vivantes, à de la radioactivité ou à des phages et demande peu de place.

Il peut être appliqué aux produits laitiers, aux denrées animales et aux échantillons environnementaux.

- Kit Listeria Tecra (3M) (Annexe XVI).

Il utilise des anticorps polyclonaux.

Les deux kits ELISA (Listeria-Tek et Listeria-Tecra) ne présentent pas de différence significative par rapport à la méthode de culture décrite dans le Manuel Analytique Bactériologique (BAM) ou méthode FDA officiellement reconnue comme méthode AOAC pour détecter Listeria spp. mais le kit Listeria-Tecra est légèrement plus sensible que le kit Listeria-Tek.

Ces deux méthodes ELISA (kits Tek et Tecra) sont donc recommandées comme alternatives à la méthode BAM (416).

VI. 2. 1. 2. TRANSIA (Annexe XVII).

Ce test est :

- rapide car les résultats sont obtenus 1h30 après enrichissement,

- simple car il s'effectue en cinq étapes sur une partie aliquote stérilisée du milieu liquide d'enrichissement de 48 h,

- précis du fait de l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques du genre Listeria,

- fiable, du moins autant que la méthode officiellement recommandée,

- sans danger car les échantillons sont stérilisés à 100°C,

- économique, son coût étant moins élevé que celui des méthodes conventionnelles.

Les cinq étapes de ce test sont les suivantes :

1 - répartition de l'échantillon enrichi dans un puits sensibilisé par un anticorps monoclonal fixé sur les parois,

2 - réaction immunologique par ajout d'anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase et incubation à 37°C,

3 - lavage des puits,

4 - ajout de substrat enzymatique TMB dans les puits et incubation à 20°C,

5 - ajout de solution d'arrêt dans les puits.

Le résultat est obtenu par lecture de l'absorbance des puits à 450 nm à l'aide d'un lecteur colorimétrique EIA de microplaques.

VI. 2. 1. 3. VIDAS Listeria (LIS) (bioMérieux) (Annexe XVIII).

Le test VIDAS Listeria LIS automatisé permet la détection des antigènes de Listeria dans les produits alimentaires et les échantillons d'environnement selon une technique Sandwich en moins d'1h après pré-enrichissement et enrichissement par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) assurant d'excellentes sensibilité et spécificité.

Il s'agit d'un test unitaire original puisque libre de toutes les contraintes liées à la distribution des réactifs (aucune aiguille de prélèvement, pas de seringue, pas de tubulure, pas de contact entre les réactifs et les instruments).

Le cône à usage unique sert de phase solide et de système de pipetage.

Sa surface intérieure est recouverte d'anticorps anti-Listeria adsorbés et les autres réactifs prêts à l'emploi sont pré-répartis dans la cartouche.

Une aliquote de bouillon d'enrichissement est placée dans la cartouche et subit un cycle d'aspiration/refoulement.

Les antigènes se fixent sur les anticorps monoclonaux anti-Listeria adsorbés sur la surface interne du cône.

Les anticorps conjugués marqués à la phosphatase alcaline sont aspirés et refoulés dans le cône puis se fixent sur les antigènes de Listeria fixés eux-mêmes sur les anticorps de la paroi du cône.

Le conjugué non fixé est éliminé par lavage.

Le substrat 4-méthyl-ombelliférylphosphate en solution dans l'azoture de sodium est introduit.

L'enzyme restant sur les parois du cône catalyse la transformation du substrat en un produit fluorescent ; la 4-méthylombelliférone dont l'intensité est mesurée à 450 nm.

Les résultats sont analysés automatiquement par l'ordinateur.

VI. 2. 2. METHODES DE TYPAGE MOLECULAIRE.

VI. 2. 2. 1. Méthodes basées sur l'ADN.

VI. 2. 2. 1. 1. Tests d'hybridation (401) (589).

Ces tests utilisent des sondes nucléiques d'ADN ou d'ARN naturelles ou synthétiques marquées ou non et sont basés sur l'unique capacité d'une molécule d'ADN ou d'ARN à s'hybrider de façon spécifique avec une séquence complémentaire.

L'avantage majeur des sondes d'acides nucléiques est leur capacité d'information à savoir la connaissance des séquences d'ADN génomique obtenues à partir de gènes clonés.

Les sondes naturelles (105) (127) (128) (131) (169) (494) (602) sont basées sur des gènes ou portions de gènes tels que hlyA codant pour la β-hémolysine (61) (130), lmaA codant pour un facteur d'hypersensibilité retardé DTH-18 (9) (422) et iap (msp) codant pour une protéine extracelluleire de 60 kDa associée à l'invasion des cellules phagocytiques non professionnelles (193) (301) (310) clonés dans un plasmide.

L'ADN plasmidique est extrait par un mélange détergent - lysozyme puis purifié par centrifugation en gradient de densité au chlorure de césium - bromure d'éthidium.

Le fragment du gène est obtenu par traitement de cet ADN avec des enzymes de restriction.

Les fragments résultants sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose et obtenus par électroélution à partir du gel.

Les sondes sont marquées au ^{32}P, à la peroxydase de raifort en présence de glutaraldéhyde ou à la digoxigénine-11-dUTP.

L'utilisation de sondes synthétiques (oligonucléotides) (129) comme sondes montre de nombreux avantages ; les sondes sont plus courtes (10 à 50 bases) d'où leur meilleure spécificité et l'hybridation de l'ADN cible est plus rapide qu'avec les sondes clonées naturelles (200 bases ou plus).

Il s'agit de sondes d'ARN synthétisées à partir de fragment de gènes tels que hlyA ou msp (300) obtenu à partir d'un plasmide amplifié par du chloramphénicol et purifié par centrifugation en gradient de densité au chlorure de césium et bromure d'éthidium puis digéré par des enzymes de restriction, purifié par électroélution, cloné dans les vecteurs de bactériophage et séquencé.

Les oligomers sont marqués au ^{32}P, à la digoxigénine ou à la phosphatase alcaline.

Certaines sondes basées sur l'ARNr (137) (569) (570) (571) sont utilisées pour hybrider l'ARNr 16S (71).

La méthode conventionnelle fait appel à plusieurs étapes à savoir :

1 - une lyse des cellules déposées sur papier filtre ou sur membrane en nylon ou cellulose par les micro-ondes en présence d'un mélange lysant ou par la vapeur alcaline,

2 - une neutralisation,

3 - une fixation des acides nucléiques dénaturés par séchage ou irradiation,

4 - une hybridation précédée ou non d'une préhybridation,

5 - une détection :

. par autoradiographie,

. immunologique avec des anticorps anti-digoxigénine conjugués à la phosphatase alcaline.

Les substrats pour la phosphatase alcaline sont : le nitrobleu de tétrazolium et le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate de toluidine.

D'autres méthodes peuvent être utilisées comme :

- la méthode soustractive (104) (365) faisant appel à un ADN marqué radioactivement et enrichi spécifiquement en séquences d'ADN spécifiques d'un organisme par élimination de ces séquences présentes chez d'autres espèces (hybridation par croisement) et servant de sonde soustractive.

- le dosage de protection homogène en chimioluminescence (HPA) (424).

HPA est un type unique de dosage de la sonde ADN dans lequel la séparation de la sonde non hybridée en excès avant la détection du complexe sonde - cible n'est pas nécessaire.

HPA implique un marquage chimique direct de l'ADN sonde avec l'ester d'acridine durant la synthèse d'ADN de telle façon que l'ester d'acridine est positionné précisément en situation intérieure sur la sonde pour la protéger sélectivement au moment de l'hybridation entre la sonde et la cible.

L'hybridation se fait en solution donc l'efficacité est très élevée.

Après hybridation de la sonde ADN avec sa cible ARNr, le marquage chimioluminescent (acridine) de la sonde non hybridée est sélectivement inactivé par hydrolyse chimique différentielle ; ainsi, il y a une perte rapide de chimioluminescence associée à la sonde non hybridée alors que la chimiolumiscence associée à la sonde hybridée n'est pas affectée.

La formation d'un hybride entre la sonde et la cible est détectée au luminomètre après addition du réactif de détection.

La sonde montre une sensibilité de 100 % et une spécificité de 100 % pour Listeria monocytogenes.

La limite inférieure de détection est de 10^4-10^5 cellules.

Les sondes marquées avec des radio-isotopes offrent une grande sensibilité mais présentent des problèmes de sécurité.

Les dérivés de l'ester d'acridine peuvent facilement être incorporés dans les oligonucléotides grâce au premier groupe aminé aliphatique du nucléotide (575).

Les autres avantages des sondes d'ADN marquées à l'ester d'acridine sont la longue demi-vie du réactif, le court temps du dosage, la haute sensibilité de la détection, la compatibilité avec le système de mesure de la lumière et la soumission aux procédures automatiques (575).

HPA est donc une méthode prometteuse pour la confirmation des colonies et peut être une alternative intéressante aux tests de confirmation couramment utilisés.

HPA est une méthode sensible, spécifique, facile à réaliser et rapide (30 à 40 minutes).

- l'hybridation directe des colonies sur filtres hydrophobes (HGMF) (Hydrophobic grid-membrane filter) après marquage avec une peroxydase de raifort (438) (439).

Après le développement de couleur du chromogène, un compteur commmercial (HGMF Interpreter) est capable de détecter et de compter les organismes électroniquement.

Cette méthode d'hybridation colorimétrique ou technique d'hybridation directe des colonies sur HGMF avec détection électronique et comptage automatique ne montre aucune différence avec la technique classique d'hybridation.

Elle peut donc être utilisée en microbiologie alimentaire.

- l'essai Gene-Trak (302) (303) (305) (306).

Il basé sur la détection de séquences uniques d'ARNr 16S de Listeria en utilisant une sonde ADN synthétique complémentaire marquée au ^{32}P ou à la fluorescéine.

La détection peut être non-isotopique ou colorimétrique avec un anticorps anti-fluorescéine marqué à la peroxydase de raifort puis une visualisation au moyen d'un substrat ; elle implique alors deux sondes : une sonde détectrice contenant un ligand, la fluorescéine, pour la détection enzymatique postérieure et une sonde capture contenant un domaine polydésoxyadénylate (dA) qui sert à lier le complexe cible - sonde dans des tubes plastiques recouverts de polydésoxythymidine ; ces deux sondes hybrident les régions adjacentes de la cible ARNr 16S Listeria.

Mais, elle peut aussi être isotopique avec une sonde marquée au ^{32}P par comptage de l'activité ^{32}P sur chaque filtre grâce à un détecteur Gene-Trak ou un compteur à scintillation sans fluide.

L'essai Listeria Gene-Trak est un test rapide, sensible et spécifique de Listeria monocytogenes.

- le test Gen-Probe (414) (510).

Il est basé sur une réaction d'hybridation entre une sonde d'ADN simple marquée par chimioluminescence et une séquence unique complémentaire dans la région ARNr 16S de Listeria monocytogenes

Ce test peut se faire selon deux méthodes avec une sonde fournie par le kit :

1 - mise en contact de la sonde avec le bouillon d'enrichissement en tube test "AccuProbe",

2 - centrifugation d'une aliquote du bouillon d'enrichissement, décantation du surnageant, remise en suspension du culot dans un tampon phosphate puis application de la méthode 1 à la solution concentrée 5 fois.

Une réaction d'hybridation se produit en phase liquide entre une sonde non-isotopique d'ADN spécifique de Listeria monocytogenes marquée à l'ester d'acridium et l'ARNr cible des cellules lysées.

Après hybridation, le marquage chimioluminescent des sondes non hybridées est inactivé de façon sélective par une étape d'hydrolyse différentielle.

L'addition de solution alcaline de peroxyde d'hydrogène permet de détecter une légère émission à 430 nm au luminomètre due à l'ester d'acridium lié à l'hybride ADN-ARNr.

Ce test s'avère moins sensible, moins spécifique et plus long que la PCR (412).

La sonde est à 100 % sensible et à 100 % spécifique pour les colonies isolées.

La limite de détection minimale en solution saline physiologique est établie à près de 10^5 CFU Listeria monocytogenes.

- le test ELISA-HNA (169).

Il s'agit d'une hybridation entre de simples brins d'ADN (ADN préparé à partir d'ARN total de Listeria monocytogenes) marqué au ^{32}P et leurs brins complémentaires.

La sonde d'ADN est hybridée en phase aqueuse avec les molécules d'ARN cible ; les hybrides HNA spécifiques sont capturés par des anticorps spécifiques de HNA.

Les molécules HNA capturées sont révélées avec un conjugué enzymatique de streptavidine (immunodétection).

Une hybridation en phase aqueuse offre l'avantage d'augmenter la vitesse des réactions d'hybridation, elle assure l'accessibilité complète des séquences cibles et le faible niveau d'interférence avec le matériel extérieur en fluides biologiques permet la quantification par essai direct de l'échantillon avec des marquages non-isotopiques.

- l'hybridation ADN-ADN "optique" (249).

Il s'agit d'une méthode d'appariement ADN-ADN étudiant le degré d'homologie ADN-ADN entre les ADN de différentes espèces de Listeria.

Listeria grayi et Listeria murrayi sont facilement séparées par l'œil et apparaissent distinctes des autres espèces.

Les souches de Listeria ivanovii sont regroupées.

Les espèces Listeria, surtout Listeria monocytogenes, Listeria innocua, Listeria welshimeri et Listeria seeligeri sont étroitement apparentées.

VI. 2. 2. 1. 2. Analyse de restriction enzymatique (REA ou Restriction Enzyme Analysis) (174) (185) (417) (418) (590) (591).

L'ADN est digéré par des endonucléases de restriction et la détection est réalisée par électrophorèse et hybridation avec une sonde.

Deux sortes d'endonucléases de restriction sont utilisées à savoir :

- des enzymes de restriction produisant un nombre suffisant de bandes distinguables par électrophorèse comme *Hha*I, *Hind*III, *Hae*III, *Eco*RI, *Pst*I, *Bam*HI ; dans ce cas, la digestion est suivie d'une électrophorèse en gel conventionnelle (101),

- des enzymes de restriction caractérisées par de rares séquences de reconnaissance (à faible fréquence de clivage : low-frequency cleavage) : *Apa*I, *Sma*I, *Not*I, *Asc*I.

Les Listeria étant caractérisées par un faible contenu ADN G+C, on choisit des enzymes de restriction ayant des séquences de reconnaissance contenant seulement les nucléotides G et C en présence de tampon de clivage contenant de la sérum albumine de bovin.

Dans ce cas, la digestion est suivie d'une électrophorèse en champ pulsé (PFGE) (72) (73) (88) (89) (270) (320) et l'utilisation de sondes à ADN marquées radioactivement n'est pas nécessaire car un petit nombre de fragments sont visualisés.

La REA se fait en plusieurs étapes :

1 - une extraction de l'ADN par lyse des cellules par centrifugation,

2 - une digestion enzymatique,

3 - une séparation des fragments d'ADN par électrophorèse,

4 - une possible hybridation Southern blot (18),

5 - une détection par coloration du gel d'agarose avec du bromure d'éthidium,

6 - une visualisation des résultats avec une lampe UV à ondes courtes à travers un filtre rouge (visualisation par fluorescence) et photographie du gel.

VI. 2. 2. 1. 3. Polymorphisme d'ADN ou PCR.

- *PCR simple* (43) (65) (138) (192) (225) (365) (403) (411) (481) (544) (580) (586) (602).

La PCR ou Polymerase Chain Reaction permet une amplification exponentielle grâce à une polymérase (Taq-polymérase) d'une séquence cible d'ADN suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose (détermination de la taille des produits amplifiés) pour la plupart ou hybridation.

La PCR a été utilisée pour amplifier les gènes ou portions de gènes tels que hlyA (203), ImaA et iap (78) ou les régions comprises entre les loci génétiques des gènes 16S et 23S d'ARNr procaryote (285) (570) (571) (577).

La PCR se fait en plusieurs étapes :

1 - une lyse par centrifugation permettant de récupérer l'ADN,

2 - une amplification en tampon contenant des amorces et la Taq ADN polymérase (490) en plusieurs cycles,

3 - une détection des produits amplifiés ou produits PCR par :

. électrophorèse en gel d'agarose ou bis-acrylamide puis coloration du gel avec du bromure d'éthidium.

Mais la visualisation de l'ADN par coloration au bromure d'éthidium peut rendre l'interprétation des résultats difficile du fait de la production d'amplifications non spécifiques et de la sensibilité limitée de cette technique.

. hybridation avec une sonde ADN pour améliorer la sensibilité et la spécificité des analyses PCR (365).

Mais de telles méthodes impliquent des procédures d'hybridation ADN-ADN intenses et nécessitent l'utilisation de sonde marquée d'où le prix élevé du test.

Une PCR suivie d'une hybridation avec une sonde ADN synthétique inversée a été rapportée ; en effet, les produits PCR marqués à la digoxigénine-11-dUTP sont déposés sur la sonde liée à la membrane (75).

. hybridation avec une sonde ARN (57) non marquée formant un hybride ARN-ADN avec l'ADN cible immobilisé sur une membrane donc après électrophorèse ; l'hybride peut être détecté par un essai immunoenzymatique (Ac reconnaissant l'hybride).

Les avantages de la sonde ARN sont les suivants :

- les hybrides ARN-ADN sont plus stables que les hybrides ADN-ADN,

- les Ac reconnaissent les hélices de l'hybride ARN-ADN d'où la non-nécessité d'introduire des marqueurs chimiques sur la sonde.

- *PCR immunomagnétique ou essai MIPA (magnetic immuno-polymerase chain reaction (PCR) assay)* (196) (592).

La PCR immunomagnétique (MIPA) combine une séparation immunomagnétique à la PCR c'est-à-dire une séparation magnétique des Listeria par des particules magnétiques recouvertes d'anticorps monoclonaux spécifiques des Listeria suivie d'une amplification de la séquence ADN de Listeria monocytogenes par PCR.

Les anticorps monoclonaux seuls ne font pas la discrimination entre Listeria monocytogenes et les autres Listeria spp. ; cet inconvénient est remédié par la PCR après la séparation magnétique.

La combinaison de la capture immunologique et de la détection ultérieure de Listeria monocytogenes séparée par la PCR surmonte les désavantages majeurs des deux méthodes utilisées seules.

- *PCR dans laquelle une des amorces est biotinylée et la digoxigénine-11-dUTP est incorporée durant l'élongation* (267).

Les produits PCR biotinylés sont capturés sur supports solides recouverts de streptavidine et la phosphatase alcaline conjuguée à l'anticorps anti-digoxigénine est liée ensuite à la digoxigénine incorporée.

La détection peut être obtenue avec des substrats colorimétriques, fluorescents ou luminescents pour la phosphatase alcaline.

Elle se fait en deux étapes :

1 - une capture des produits PCR en microplaques ou avec des billes recouvertes de streptavidine,

2 - une génération de signal grâce à 3 substrats différents donnant des signaux fluorescents, colorimétriques et luminescents après ajout aux puits ou aux billes recouverts de streptavidine et incubation à l'obscurité :

. 4-méthylombelliféryl phosphate (4-MUP) en tampon diéthanolamine pH 9,6 et mesure de la fluorescence au fluorimètre,

. paranitrophénylphosphate (PNPP) en tampon 2-amino-2-méthyl-1-propanol pH 10,3 puis ajout de soude et mesure de l'absorbance à 405 nm au spectrophotomètre,

. 3-(2'-spiroadamantane)-4-méthoxy-4-(3"-phosphoryloxy)-phényl-1, 2-dioxétane (AMPPD) en tampon diéthylamine pH 10 puis ajout de $MgCl_2$ et exposition aux RX.

Les billes magnétiques sont plus sensibles car leur capacité de liaison est supérieure à celle des puits.

- *PCR + LCR* (22) (593) (594).

La LCR est une méthode sensible et spécifique basée sur une différence de paires de bases uniques dans la région V9 ou V2 du gène ARNr 16S (ADNr 16S).

Le principe repose sur la liaison de deux amorces oligonucléotides synthétiques adjacentes qui hybrident seulement un brin de l'ADN cible.

Le produit lié est séparé à partir des amorces par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant et détecté par autoradiographie.

L'absence de produit lié indique un changement de paire de bases unique dans la séquence cible.

Une amplification PCR primaire de l'ADNr 16S est combinée avec une amplification LCR secondaire avec une ligase thermostable (21) pour produire une méthode sensible et spécifique.

L'amplification primaire par PCR permet d'augmenter la sensibilité de cette méthode.

La détection est isotopique ou non avec un substrat chromogénique ou paranitrophénylphosphate (pNPP) à 450 nm (détection colorimétrique) ou avec un substrat luminogénique Lumi-Phos 530 à 450 nm (détection chimioluminescente).

La détection luminogénique non-isotopique avec Lumi-Phos 530 est plus rapide que la détection chromogénique non-isotopique avec la pNPP (3h/12h) ; elle permet d'accomplir la LCR couplée à la PCR en 10h alors que la méthode de détection isotopique le fait en 24h.

- *PCR + REA appliquée aux RFLP* (338) (564).

Cette méthode consiste à étudier le polymorphisme des fragments de restriction en fonction de leur longueur donc à déterminer les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) dans les séquences nucléotidiques des gènes associés à la virulence et amplifiés par PCR.

Elle consiste à amplifier l'ADN ou les gènes tels que hly A (61), iap, mpl ou prfA par PCR avant de les soumettre à des endonucléases de restriction et à une électrophorèse puis à une coloration avec du bromure d'éthidium et à une visualisation sous lumière UV à 302 nm.

La PCR de même que la MEE montrent un schéma de restriction pour les souches de sérovars 1/2b, 3b et 4a et un autre pour les souches de sérovars 1/2a, 1/2c et 3a donc une parfaite corrélation est observée entre MEE et RFLP bien que ces deux méthodes détectent différents types de variations dans le chromosome.

En effet, MEE détecte des variations dans les séquences de codage altérant la charge et donc la mobilité électrophorétique des enzymes constitutives alors que RFLP détecte des changements de séquences de nucléotides résultant en un gain ou une perte de sites de reconnaissance d'enzymes de restriction.

Les diversités structurales dans Listeria monocytogenes se produisent à la même vitesse que les changements dans les gènes codant pour les enzymes cytoplasmiques essentielles et les antigènes de surface immunogéniques utilisés dans le sérotypage.

Les différences structurales observées dans les gènes codant pour la virulence peuvent être des mutations silencieuses c'est-à-dire non reliées à la virulence ou modulant le mécanisme de pathogénèse.

L'analyse RFLP apparaît être utile pour la caractérisation de Listeria monocytogenes.

Un des problèmes de l'analyse RFLP est le nombre élevé de bandes (100 à 1000) obtenues par restriction de l'ADN génomique avec les enzymes de restriction ayant des séquences de reconnaissance de 4 ou 6 bases.

Ceci la rend difficile à appliquer à une grande série de souches afin de déterminer le degré d'inter-relation.

- *PCR + RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)* (123) (324) (362) (387) (388) (597).

La PCR permet d'obtenir des profils d'ADN polymorphique amplifié au hasard qui sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

L'analyse RAPD est une variante de la PCR dans laquelle une seule amorce est utilisée.

Cette méthode de typage RAPD peut se faire après lyse ou à partir de cellules entières. Dans ce dernier cas, elle ne nécessite pas d'extraction d'ADN au préalable ; les cellules entières sont incubées dans le mélange de réaction.

Cette méthode est simple et rapide comparée à REA et MEE.

Cette analyse des profils RAPD obtenus par PCR est en complète corrélation avec le typage par les bactériophages.

Donc, l'analyse des profils RAPD est proposée comme une alternative à la lysotypie car l'amorce unique génère des profils permettant une discrimination entre les souches de même sérotype.

VI. 2. 2. 1. 4. Typage des plasmides (312) (328) (437).

Il s'agit d'une méthode de typage de l'ADN plasmidique ou de l'ADN extrachromosomique.

Ce typage nécessite une extraction de l'ADN extrachromosomique, une restriction par des endonucléases et une électrophorèse en gel d'agarose.

L'analyse de restriction, l'essai d'hybridation et la MEE montrent un degré élevé d'homologie entre les différents plasmides (191) (313).

Bien que Listeria spp. hébergent des plasmides, les profils plasmidiques ont une valeur limitée du fait de l'instabilité des plasmides, du faible nombre de souches en contenant et de l'identité de la plupart des schémas de restriction.

VI. 2. 2. 2. Ribotypage (Ribosomal DNA fingerprinting) (110) (277) (278) (537) (565).

Il s'agit d'une nouvelle méthode de caractérisation au même titre que la sérotypie et la lysotypie ou technique d'empreintes d'ADN ribosomique non-isotopique afin de caractériser Listeria monocytogenes en utilisant l'ARNr 16S et 23S ; elle permet d'obtenir des ribovars.

Il s'agit d'un polymorphisme de restriction des régions des gènes d'ARN faisant appel à une digestion par les endonucléases de restriction, une hybridation de l'ADN chromosomique avec une sonde d'ARNr clonée, incluant le gène ARNr 16S ou 23S et marquée avec de la dUTP-11-digoxigénine (18) (233) ou au ^{32}P et une autoradiographie ou une détection immunologique.

Le typage d'ARNr a été décrit pour la première fois en 1986 (235).

Le ribotypage apparaît être une méthode de typage moléculaire bien reproductible et peut être un complément utile à d'autres méthodes telles que le sérotypage, le lysotypage, la MEE et la REA pour l'étude épidémiologique de la listériose.

Cette méthode présente deux avantages.

Du fait de la conservation des gènes ribosomaux, une sonde universelle peut être utilisée pour la caractérisation de plusieurs organismes.

De plus, cette procédure permet d'obtenir un nombre convenable de bandes (5 à 15) de différentes tailles moléculaires car les bactéries contiennent de nombreux opérons.

L'ARNr peut donc être utilisé pour déterminer le degré de relation génétique parmi les souches et pour l'épidémiologie moléculaire des espèces microbiennes.

En général, les souches apparentées épidémiologiquement appartiennent au même ribotype.

VI. 2. 2. 3. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) (25) (52) (53) (59) (60) (421) (442) (509).

Il s'agit d'un système de typage par électrophorèse des enzymes ou analyse de la mobilité électrophorétique des enzymes métaboliques constitutives ou analyse des profils d'isoenzymes.

Les différentes enzymes étudiées sont l'acide phosphatase (ACP), l'aconitase (ACO), l'adénylate kinase (ADK), l'alpha-naphtyl acétate estérase, l'alpha-naphtyl acide phosphatase, l'alanine deshydrogénase (ADH) (ALD), la catalase (CAT), l'α-estérase, la β-estérase, la 2-alpha-naphtyl propionyl estérase 1 (NP1) (EST-α), la 2-alpha-naphtyl propionyl estérase 2 (NP2), la β-naphtyl propionyl estérase (EST-β), la fumarase (FUM), la glucose-6-phosphate deshydrogénase (GP6) (G6P), la NADP-dépendante glutamate deshydrogénase (GLD) (GD2), la glutamique-oxalo acétique transaminase, la NAD-dépendante glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (GP1), l'indophénol oxydase (IPO), l'isocitrate deshydrogénase (IDH), la lactate deshydrogénase (LDH), la leucyl-glycyl (ou glycine)-glycine peptidase (LGG), la mannose 6-phosphate isomérase (MPI), la nucléoside phosphorylase (NSP), la L-phénylalanine-L-leucine peptidase (PLP), la 6-phosphogluconate deshydrogénase (PGD) (6PG), la phosphoglucomutase (PGM), la phosphoglucose isomérase (PGI).

Elle permet de déterminer les types électrophorétiques ou électrophorétypes (ET) reflétant le génotype chromosomique.

Elle fait appel à 3 étapes : lyse, électrophorèse et identification des "taches".

La MEE a été employée pour étudier la structure génétique et l'épidémiologie de nombreuses bactéries.

Les isolats bactériens sont différenciés selon la variation dans la mobilité électrophorétique d'un grand nombre d'enzymes métaboliques constitutives.

Elle permet d'estimer les niveaux de diversité génétique et la relation parmi les isolats de populations naturelles donc de distinguer les isolats bactériens.

Pour chaque enzyme, la mobilité relative est établie par marquage de la distance de migration relative à partir de la cathode c'est-à-dire que les enzymes les plus proches de l'anode donnent la marque la plus faible.

VI. 3. AUTRES METHODES.

VI. 3. 1. TYPAGE DES MONOCINES (595).

Il est rendu possible du fait de la production de monocines par la plupart des souches.

VI. 3. 2. SEPARATION IMMUNOMAGNETIQUE (IMS) (524).

Il s'agit d'une nouvelle approche d'extraction et d'isolement des bactéries pathogènes directement à partir d'aliments, de bouillons d'enrichissement ou de culture pure et de suspensions hétérogènes faisant appel à des gouttes immunomagnétiques (IMB) liées de façon covalente à des anticorps monoclonaux dirigés contre les flagelles de Listeria monocytogenes.

La sensibilité de cette méthode est influencée par :

- la procédure de couverture,

- le temps d'incubation,

- le nombre de gouttes immunomagnétiques.

Les résultats obtenus par ce test d'agglutination et par l'hybridation dot blot sont en étroite corrélation.

VI. 3. 3. CYTOMETRIE EN FLUX (FLOW CYTOMETRY OU FCM) (148) (150).

La cytométrie en flux des populations bactériennes marquées par fluorescence fait appel à une immunofluorescence en combinaison avec des mesures du contenu en ADN et de taille.

Elle permet une caractérisation morphologique, une différenciation des autres bactéries entre autres les Streptocoques en fonction des paires de bases nucléiques et une détection fluorescente des cellules en suspension traversée par un rayon laser après traitement avec des colorants appropriés.

Elle s'effectue après un enrichissement sélectif par analyse des intéractions cellulaires avec le rayon d'après un certain nombre de paramètres tels que :

- la taille (morphologie) mesurée grâce à une lumière diffuse,

- le contenu en ADN (acides nucléiques) grâce au marquage par l'iodure de propidium (PI) de la suspension bactérienne,

- l'intensité d'immunofluorescence grâce au marquage de l'antisérum spécifique de Listeria par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC),

- l'antigénécité de surface.

La cytométrie en flux fait appel aux étapes suivantes :

1 - une rupture des chaînes cellulaires par ultrasons et centrifugation,

2 - une dilution du culot dans l'éthanol pour fixer les acides nucléiques puis dans une solution de ribonucléase (RNase A) pour extraire l'ADN.

Le traitement à la Rnase avant coloration par le PI rend la coloration d'ADN spécifique, en réduisant l'ampleur de la distribution d'ADN et en affinant le signal de fluorescence d'ADN.

3 - un marquage :

. direct par remise en suspension des cellules dans un antisérum types 1 et 4 anti-Listeria polyvalent marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC),

ou

. indirect par incubation des cellules avec l'antisérum type 1 Listeria O, l'antisérum type 4 Listeria O ou l'antisérum Listeria polyvalent et remise en suspension dans IgG, IgA, IgM de chèvre anti-lapin marquées à FITC,

4 - une addition d'iodure de propidium en solution dans du citrate trisodique ou coloration de l'ADN par immunofluorescence,

5 - une détection au rayon laser.

La FCM permet une détection rapide et fiable mais possède deux inconvénients :

- pas de corrélation parfaite entre les résultats par FCM et par culture,

- degré élevé de faux positifs malgré l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de Listeria pouvant surmonter cet inconvénient.

La FCM peut aussi détecter des cellules mortes.

La FCM est appliquée à :

- la caractérisation des agents des infections orales,

- la différenciation des espèces bactériennes en fonction des paires de bases nucléaires,

- la caractérisation de l'accumulation intracellulaire de polyβhydroxybutyrate dans Alcaligenes eutrophus,

- la détection de Legionella spp. dans l'eau.

VI. 3. 4. BIOLUMINESCENCE (ATPMETRIE) (375) (429).

Il s'agit d'une bioluminescence luciférine - luciférase (libération des photons à partir du complexe luciférine - luciférase en présence d'ATP et mesure du flux de photons) permettant d'estimer le nombre de bactéries retenues sur gels neutres et amphiphiles et présentes dans l'éluat afin de déterminer les propriétés de surface hydrophobe par chromatographie d'intéraction hydrophobe.

On observe une bonne corrélation entre le nombre de bactéries viables et le contenu en ATP.

La détermination de l'ATP est plus rapide que celle du nombre de bactéries viables par estimation de l'adsorption de Listeria monocytogenes sur octyl-Sépharose ce qui fait de cette bactérie un organisme hydrophile.

VI. 3. 5. IMPEDANCEMETRIE. (64)

La conductimétrie indirecte utilise une technique d'impédancemétrie bactérienne automatique rapide (mesure de la variation de conductance du milieu de culture due à l'activité métabolique des micro-organismes c'est-à-dire à la dégradation des éléments nutritifs et à leur transformation en composés chargés entraînant des modifications des caractéristiques électriques du milieu).

La croissance en bouillon impédance Whitley fait naître des changements conductimétriques indirects, lesquels sont améliorés par addition de glucose.

VI. 3. 6. CARACTERISATION DE LA LISTERIOLYSINE O (LLO). (383)

Il s'agit d'un procédé simple et très efficace pour stabiliser l'activité hémolytique de la LLO de Listeria monocytogenes après purification par immunoaffinité.

La LLO est partiellement purifiée par précipitation par du sulfate d'ammonium puis purifiée par chromatographie d'affinité et soumise à une SDS-PAGE en gels convergents isoélectriquement.

L'activité hémolytique de la LLO est stabilisée par élution directe en tubes contenant un tampon alcalin (lysine - KCl - éthylène glycol pH 11,5).

L'utilisation d'une procédure de chromatographie par immunoaffinité en deux étapes (élution de la LLO avec un tampon acide acétique pH 2,8 et collecte des éluats en tampon alcalin contenant de l'éthylène glycol 50 % pH 11,5) peut purifier facilement la LLO tout en conservant son activité hémolytique.

VI. 3. 7. ACTIVITE PHOSPHOLIPASE C. (423)

Cet essai simple consistant à recouvrir les colonies formées sur gélose tryptone supplémentée en extrait de levure et en NaCl avec du L-α-phosphatidylinositol - agarose comme substrat permet de contrôler la présence de l'activité Phospholipase C spécifique de phosphatidylinositol (PI-PLC) après une incubation de 5 jours à 37°C.

Les colonies actives PI-PLC montrent des halos turbides autour des colonies du fait de la libération de diacyl-glycérol insoluble à partir du substrat.

L'activité PI-PLC est un marqueur exact permettant la discrimination entre les espèces pathogènes et non pathogènes puisqu'elle est détectée seulement chez les espèces pathogènes Listeria monocytogenes mais pas chez Listeria seeligeri, Listeria welshimeri, Listeria innocua, Listeria murrayi et Listeria grayi et peut être inclus dans un schéma de différenciation des différentes espèces Listeria pathogènes et non pathogènes.

VII. MAITRISE DE LISTERIA MONOCYTOGENES.

VII. 1. NIVEAU ZERO EN LISTERIA : UNE SITUATION IRREALISTE. (236) (Annexe XIX)

La résistance rend son élimination complète difficilement réalisable.

D'après les conclusions du groupe d'experts de l'OMS en Février 1988 (236), les seuls aliments pouvant être considérés comme exempts de Listeria sont ceux qui ont subi un traitement assainissant (cuisson, pasteurisation, irradiation, acide organique...) et dont on a évité toute recontamination ultérieure (consommation immédiate ou mise sous emballage clos...).

Il conviendra donc, selon les recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, de maintenir le taux de Listeria à un niveau le plus bas possible à savoir de respecter la limite fixée de 100 Listeria par gramme d'aliment. (Annexe XX)

VII. 2. CLASSIFICATION DES PRODUITS EN FONCTION DU "DANGER LISTERIA". (236)

Quatre catégories de produits sont distinguées en fonction de leur technologie.

VII. 2. 1. VIANDES ET PREPARATIONS DE VIANDE.

Dans ce cas, la viande n'a subi aucun traitement autre que le froid et éventuellement le hâchage.

On distingue :

- la viande réfrigérée : on constate qu'à la surface d'une viande, la croissance est essentiellement fonction de la température à pH de l'ordre de 5,6 ; par exemple, à 8°C aucune croissance n'est observée en 15 jours alors qu'à 15°C elle peut atteindre 2 puissances logarithmiques dans le même temps.

La flore d'accompagnement inhibe de façon importante les Listeria.

- la viande de bœuf sous vide : il existe un effet pH, un effet température et un effet de compétition entre Listeria monocytogenes et les bactéries lactiques à 2°C et à 4°C.

En effet, à ces températures et à pH 5,6, le niveau de Listeria monocytogenes est constant et la croissance des bactéries lactiques est forte alors qu'à pH 6,5 et à 2°C la situation est inversée.

- la viande hâchée : le comportement est identique à celui observé dans la viande en morceaux ; la multiplication est pratiquemment nulle à 4°C et 8°C, elle débute après 48 h à 20°C et 7 jours à 15°C.

En absence de flore de compétition, la croissance atteint 3 puissances logarithmiques en 24 h à 12°C et en 48 h à 8°C alors qu'elle n'est pas observée en présence d'une flore d'accompagnement élevée.

Dans ce cas, il s'agit de respecter de façon scrupuleuse la chaîne du froid ; le froid devra être précoce et continu et ne pas excéder + 2°C ou + 3°C.

La cuisson de ces produits détruira éventuellement les Listeria présentes.

VII. 2. 2. PRODUITS CRUS A CONSOMMER EN L'ETAT (PRODUITS CRUS, FERMENTES, SECHES OU NON).

Ces produits se caractérisent par des conditions générales d'anaérobiose relative, la présence de sel, associant une acidification et le cas échéant la dessiccation.

Bien que l'expérience montre que Listeria monocytogenes ne se multiplie que peu ou pas dans les produits séchés, salés et/ou fermentés secs, il convient de ne pas exclure la possibilité d'une multiplication dans les produits crus à consommer en l'état.

Il est possible d'agir sur la maturation du produit en séchoir pour maîtriser la présence de Listeria monocytogenes et de définir une valeur d'Aw maximale.

VII. 2. 3. PRODUITS CONDITIONNES AYANT RECU UN TRAITEMENT THERMIQUE DANS LEUR CONDITIONNEMENT.

L'application d'un barême temps/température correct permet de détruire les Listeria.

Le critère "absence de Listeria dans 25 g" doit donc être respecté dans ce type de produits.

En effet, on peut considérer qu'un traitement thermique de 2 minutes à 70°C est suffisant pour garantir 10 réductions décimales de Listeria monocytogenes.

Listeria monocytogenes est donc un micro-organisme dont la thermorésistance ne pose pas de problème particulier compte tenu des traitements thermiques et du barême de cuisson traditionnellement pratiqués.

VII. 2. 4. PRODUITS ASSAINIS PAR UN TRAITEMENT THERMIQUE ET SUJETS A RECONTAMINATION.

La présence de Listeria monocytogenes dans l'environnement de production (locaux, surfaces et matériaux de contact, fluides, air, eau, personnel) constitue une source de danger.

La fréquence de recontamination dépend des procédures de maîtrise mises en place.

On distingue :

- les produits remanipulés, reconditionnés sous vide ; dans ce cas, la flore lactique exerce un effet de compétition important et d'autant plus efficace que certaines souches de Lactobacilles peuvent sécréter des bactériocines, substances inhibitrices.

- les produits manipulés, prétranchés en aérobiose car les conditions de conservation en aérobiose n'arrêtent habituellement pas la multiplication de Listeria monocytogenes.

Les seuls aliments pouvant être considérés comme exempts de Listeria sont ceux auxquels on a appliqué un traitement listéricide juste avant ou après leur conditionnement.

VII. 3. REGLEMENTATION ET RECOMMANDATIONS. (236)

VII. 3. 1. EN FRANCE.

La Fédération Française des Industries Charcutières (F.I.C) (Annexe XXI) et le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (avis du 8 Septembre 1992) (Annexe XX) considèrent que le critère retenu de 100 Listeria monocytogenes par gramme correspond à un compromis entre un niveau de sécurité satisfaisant et la sensibilité des méthodes courantes d'analyse et que la dose minimale infectante est sans doute plus élevée pour un consommateur n'appartenant pas à une catégorie à risque.

Un taux de contamination supérieur à 10000/g est considéré comme inadmissible.

VII. 3. 2. MESURES NATIONALES PRISES PAR CERTAINS ETATS.

VII. 3. 2. 1. Suisse.

Par une modification du 25 Février 1988 de l'ordonnance sur les exigences hygiéniques et microbiologiques relatives aux denrées alimentaires, objets usuels et biens de consommation, les autorités helvétiques ont adopté une position sévère concernant Listeria monocytogenes : "Listeria monocytogenes dans les denrées alimentaires prêtes à la consommation : non décelable dans 10 grammes".

Les prélèvements sont effectués sur les lieux de production ou les entrepôts centraux ou de distribution ; dans le cas où ils sont effectués sur les lieux de vente, il est tenu compte d'une éventuelle contamination par contact mais elle n'est pas précisée.

Le secret professionnel est maintenu entre les autorités helvétiques et les industriels concernés lors de la présence de Listeria monocytogenes dans les aliments sauf en cas de situation épidémiologique potentiellement grave.

VII. 3. 2. 2. Italie.

Une circulaire du Ministre de la Santé et de la Nutrition-Division III présente un plan de surveillance des secteurs zootechnique, agricole et agro-alimentaire concernant Listeria monocytogenes.

Les mesures adoptées sont les suivantes :

- au niveau du secteur de production ; en cas de présence de Listeria monocytogenes, il faut procéder :

  . à une suppression temporaire de la production,

  . au lavage et à la désinfection de tous les ateliers de production,

  . à des prélèvements d'échantillons en différents points des ateliers,

  . au retrait du marché du produit contaminé.

Les levées d'interdiction de production et de commercialisation ne sont effectuées qu'après la désinfection des locaux et l'obtention de trois contrôles analytiques négatifs à des jours différents dans une période maximale de 15 jours.

- au niveau du secteur de commercialisation ; des contrôles peuvent être effectués sur des produits commercialisés.

Le retrait du marché des produits contaminés serait obligatoire dans un délai maximum de 3 jours et cela au frais du producteur ou du circuit de distribution.

VII. 3. 2. 3. Canada.

Le Ministère de la Santé et du Bien-être Social, Direction Générale de la Protection de la Santé a émis un document en Décembre 1989 intitulé "Politique Administrative-Surveillance de la Conformité : aliments contaminés par Listeria monocytogenes".

La position est plus souple.

Les facteurs à prendre en considération pour l'établissement du système de surveillance sont :

- le potentiel de développement de Listeria monocytogenes dans un aliment donné (pH, Aw, agents de conservation),

- la connaissance des principaux produits incriminés (produits laitiers),

- l'absence de preuve établissant une liaison certaine entre la présence de Listeria monocytogenes à un faible taux dans un aliment et un cas de listériose.

Le système de surveillance permet une demande de rappel en cas de contamination de produits laitiers où le risque de développement est important (lait pasteurisé) et où il n'y a pas de croissance connue (crème glacée, fromages à pâte dure) et d'aliments prêts à consommer où il y a risque ou pas de développement.

Parallèlement, les autorités encouragent l'élaboration de "guides de bonnes pratiques d'hygiène" faisant appel à la démarche H.A.C.C.P.

VII. 3. 2. 4. Grande-Bretagne.

Dans le rapport "Contamination des aliments : Listeria et Listériose - réponse du Gouvernement au 6° rapport (1988-1989) du Comité des Services Sociaux", le gouvernement prône une réglementation concernant l'hygiène et la contamination des aliments par Listeria monocytogenes fondée sur le développement, l'élaboration ou la modification au niveau de la production, de la distribution et de la vente de "guides de bonnes pratiques et d'hygiène" où la démarche H.A.C.C.P. est utilisée.

VII. 3. 2. 5. Allemagne.

Les autorités allemandes ont présenté dans une communication publiée dans le bulletin du Ministère de la Santé, les mesures à prendre en cas de contamination par Listeria monocytogenes.

Elles tiennent compte de la nature, du mode de contamination, de la finalité des aliments concernés mais aussi des niveaux de Listeria monocytogenes dénombrés.

Ces mesures différencient les aliments où la norme "zéro Listeria" est possible de ceux où elle ne l'est pas.

VII. 3. 3. REFLEXIONS DE L'OMS. (236)

VII. 3. 3. 1. Recommandations aux autorités sanitaires pour assurer la protection du consommateur.

Les objectifs sont de :

- diminuer l'incidence de la listériose d'origine alimentaire,

- limiter ou éliminer lorsque cela est technologiquement possible la charge en Listeria monocytogenes des aliments,

- renforcer la confiance des consommateurs dans l'innocuité des aliments.

Le groupe d'experts réuni à Genève en Février 1988 a classé les aliments en 4 catégories :

- aliments crus (légumes et viande),

- aliments crus transformés (aliments crus mélangés à d'autres ingrédients comme les salades préparées, le saucisson fermenté, les fromages au lait cru),

- aliments préparés où un procédé listéricide a été employé et remanipulés (certains fromages, viandes d'abattoir découpées ou transformées par la vente au détail),

- aliments fabriqués (sous conditionnement scellé) où un procédé listéricide a été appliqué (lait pasteurisé, produits laitiers, viandes cuites sous emballage hermétique).

Les recommandations sont les suivantes :

- encourager activement les recherches permettant la réduction et l'élimination de la contamination des aliments crus ainsi que la réduction de la contamination des aliments préparés,

- entreprendre ou poursuivre des campagnes d'éducation du public visant à aider les consommateurs à éviter la contamination des aliments crus ou préparés,

- veiller à ce que les consommateurs n'aient pas un sentiment de fausse sécurité vis-à-vis des aliments crus ou préparés,

- s'assurer que les denrées préemballées ayant subi un traitement listéricide soient exemptes de Listeria monocytogenes jusqu'à leur date limite de consommation,

- encourager l'utilisation des rayonnements ionisants pour éliminer Listeria monocytogenes dans les aliments à risque préemballés,

- envisager le retrait des aliments préparés ou préemballés contaminés,

- retirer du marché toute denrée alimentaire à l'origine de cas de listériose humaine et étudier en détail toutes les suites et conséquences possibles de cette mesure avant sa mise en exécution,

- collaborer avec les secteurs de l'industrie alimentaire intéressés de manière à prévenir et limiter la contamination,

- coopérer avec l'industrie alimentaire, les universités et les instituts de recherche pour coordonner la recherche fondamentale,

- mettre en place et maintenir des structures de surveillance pour prévenir tout risque d'épidémie,

- échanger des données par le canal du Centre collaborateur de l'OMS de Berlin qui coordonne le programme de surveillance de l'OMS,

- éduquer tous les professionnels de la Santé.

VII. 3. 3. 2. Recommandations aux industries alimentaires.

Elles sont les suivantes :

- promouvoir la méthode H.A.C.C.P. et assurer la qualité microbiologique des produits par l'éducation et la formation de tous les travailleurs,

- appliquer la méthode H.A.C.C.P. pour identifier les germes pathogènes, découvrir les sources de contamination et les éliminer, reconnaître les modes de contamination et les éliminer, déterminer les conditions favorables à la survie et à la croissance des germes pathogènes et veiller à ce que les traitements bactéricides (chaleur, irradiation) et les méthodes de désinfection assurent la destruction de Listeria monocytogenes,

- conduire et promouvoir des recherches pour développer de nouveaux moyens supprimant ou limitant la croissance de Listeria monocytogenes,

- coopérer avec les autorités chargées de la réglementation,

- collaborer avec les fabricants d'équipements destinés à l'industrie alimentaire de manière à faire progresser la conception de ces équipements en vue d'une meilleure hygiène,

- collaborer avec les autorités chargées de la réglementation et de la santé publique à l'élaboration de codes de pratiques hygiéniques pour les différents secteurs de la production alimentaire,

- collaborer avec les organisations internationales comme l'OMS et nationales et avec les universités pour élaborer des programmes d'enseignement de la microbiologie alimentaire tenant compte de l'approche H.A.C.C.P.,

- entreprendre des recherches dans le but d'apporter de nouvelles solutions technologiques au problème de la présence de Listeria monocytogenes dans les denrées ne subissant pas de traitement listéricide avant consommation.

VII. 3. 4. RECOMMANDATIONS DU COMITE NATIONAL D'ORIENTATION SUR LES CRITERES MICROBIOLOGIQUES. (341)

Deux documents ont été rédigés en 1988 par le "Center for Control Disease" (C.D.C.) (USA) pour mieux contrôler Listeria monocytogenes ; il s'agit de l'AMI et du FDA-MIFIICA.

En effet, la surveillance de Listeria monocytogenes aux Etats-Unis est très développée.

Ces documents concernent divers points à savoir :

- <u>les installations</u> :

. toutes les surfaces doivent être nettoyables et désinfectables.

Cela suppose que les surfaces soient lisses, sans fissures, non poreuses et autovidangeables,

. les plans des installations doivent contrôler les mouvements de Listeria monocytogenes entre les aires de production crue et cuite (traffic des employés, activités de manipulation des aliments et mouvements du personnel),

. les systèmes de réfrigération et de ventilation doivent pouvoir être nettoyés et désinfectés pour réduire la contamination provenant de l'air,

. la pression doit être maintenue dans toutes les aires de production de viande prête à consommer,

. la vidange du sol doit être conçue de telle façon qu'elle empêche l'eau de stagner et les sols doivent être recouverts de matériaux facilement nettoyables,

. l'humidité de l'environnement doit être contrôlée pour empêcher la condensation,

. les insectes nuisibles et la vermine doivent être exclues des équipements.

- les équipements :

. ils doivent être appropriés et jugés acceptables par l'agence de réglementation,

. ils doivent être maintenus dans un état de travail convenable.

Seuls les matériels approuvés doivent être utilisés dans les équipements en contact avec les aliments.

Les procédures de maintenance doivent être établies et enregistrées,

. ils doivent être utilisés de telle manière qu'ils ne deviennent pas une source de contamination par inadvertance,

. l'aptitude à la réfrigération doit être suffisante pour maintenir les températures des pièces appropriées aux opérations à effectuer,

. les autres dispositifs doivent être proprement installés et calibrés à chaque étape du process.

- les procédures de fabrication :

. réduire la contamination durant le process,

. empêcher la croissance de Listeria monocytogenes durant le process,

. éliminer Listeria monocytogenes des produits.

- le personnel :

. éduquer le personnel aux programmes de GMP et H.A.C.C.P. et le responsabiliser afin qu'il suive les pratiques d'hygiène,

. promouvoir le recyclage à propos des programmes GMP et H.A.C.C.P. et impliquer le personnel dans les efforts à fournir pour améliorer les pratiques d'hygiène,

. utiliser toute la technologie disponible pour aider le personnel à maintenir les conditions d'hygiène comme :

- le lavage des mains et des pieds,

- le port des gants, charlottes, blouses et tabliers,

- la séparation des zones de production propre et sale.

Il faut donc éviter le contact entre ces aires comprenant les employés, le personnel supervisant et les inspecteurs.

. éliminer les sources de contamination de l'environnement de production de la viande prête à consommer,

. fournir une surveillance afin d'aider les employés à maintenir les pratiques d'hygiène.

- les procédures de nettoyage et de désinfection :

. avoir un personnel adéquat et suffisant,

. prévoir un temps suffisant pour le process de nettoyage/désinfection,

. fournir une surveillance adéquate du personnel,

. développer et publier des procédures écrites de nettoyage et de désinfection pour chaque pièce de l'équipement et pour chaque aire de production,

. utiliser des dispositifs et des produits efficaces pour assurer un nettoyage et une désinfection corrects,

. développer des programmes d'entraînement pour le personnel chargé du nettoyage et de la désinfection,

. promouvoir des procédures aussi nouvelles que possible pour le nettoyage et la désinfection des installations d'air conditionné, des sols et des systèmes de vidange,

. incorporer quelques pratiques de nettoyage et de désinfection dans le plan H.A.C.C.P. en tant que points de contrôle critique,

. établir des programmes d'échantillonnage de l'environnement pour Listeria monocytogenes afin de vérifier l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection.

Quelques recommandations sont ensuite données :

- aux commerçants :

1 - rester chez soi en cas de maladie et ne pas être en contact avec des aliments ou les aires de production d'aliments.

2 - pratiquer une bonne hygiène personnelle lors de la fabrication, de la manipulation et de la préparation d'aliments.

3 - se laver toujours les mains lors de la sortie des aires où sont manipulés des végétaux crus, de la viande, de la volaille, du poisson et des fruits de mer avant de passer dans l'aire de manipulation des aliments cuits.

4 - préparer des aliments à partir de matériaux frais et sains.

5 - empêcher la contamination croisée des aliments cuits en stockant les aliments crus et préparés séparément et en évitant le contact entre les aliments cuits et les équipements contaminés par les aliments crus.

6 - prendre fréquemment la température des aliments.

7 - cuire les aliments à température suffisante pour détruire Listeria monocytogenes (63°C).

8 - maintenir les aliments au chaud à une température supérieure à 60°C.

9 - contrôler la multiplication de Listeria monocytogenes à une température inférieure à 4°C.

10 - réchauffer rapidement à 74°C.

11 - congeler les aliments périssables immédiatement et les maintenir dans cet état jusqu'à ce qu'ils soient préparés.

12 - maintenir les aliments dans un lieu de stockage, de préparation et de service hors des insectes et des animaux nuisibles.

13 - laver selon les instructions des fabricants.

14 - utiliser un bon détergent et de l'eau à 43-49°C pour le lavage manuel des plats.

Eliminer toutes les salissures et rincer avec de l'eau chaude.

Désinfecter avec de l'eau bouillante (77°C) ou utiliser un désinfectant chimique approuvé.

15 - utiliser des équipements satisfaisant aux normes de la National Sanitation Foundation pour assurer un nettoyage et une désinfection faciles.

- aux consommateurs :

1 - consulter le médecin en cas de sensibilité.

2 - suivre les règles de préparation des aliments.

3 - nettoyer mains et ustensiles avant de manipuler les aliments et spécialement après manipulation d'aliments crus.

4 - réchauffer les aliments à température supérieure à 74°C.

5 - maintenir les aliments chauds au chaud (> 63°C).

6 - maintenir les aliments froids au froid (< 4°C).

7 - cuire la viande, la volaille et les produits de la mer de même que les aliments congelés ou réfrigérés de façon adéquate.

8 - refroidir les aliments rapidement dans des récipients peu profonds.

9 - séparer les aliments crus et cuits spécialement quand ces derniers sont achetés déjà cuits.

10 - envelopper ou couvrir les aliments dans le réfrigérateur.

11 - maintenir la température du réfrigérateur entre 1 et 4°C.

12 - éviter le lait cru et les fromages faits à partir de lait non pasteurisé.

VII. 4. MOYENS DE LUTTE.

Ces moyens passent en partie par le respect des règles éditées par le Laboratoire National de la Santé pour la France et du C.D.C. pour les Etats-Unis ; elles ont été citées précédemment.

Les principales mesures à prendre, que ce soit dans l'industrie alimentaire, dans les magasins de détail ou à domicile, sont les suivantes :

- séparer les aliments non contaminés de ceux qui le sont,

- limiter la teneur en eau des aliments,

- éliminer les conditions favorables à la transmission.

La contamination croisée devrait disparaître grâce à une conception efficace de l'équipement et à des méthodes d'hygiène correctes ; de même, la contamination par contact devrait être réduite au minimum.

Les produits crus et les produits cuits doivent être gardés séparés de manière à éviter la contamination croisée par les manipulateurs, les surfaces de contact et les autres moyens de transmission.

Les procédés listéricides (pasteurisation et cuisson), s'ils sont appliqués correctement, éliminent Listeria monocytogenes et la recontamination peut être évitée si l'on observe de bonnes pratiques d'hygiène.

VII. 4. 1. SURVEILLANCE DE L'ENVIRONNEMENT. (236)

Le Comité National d'Orientation sur les critères microbiologiques (USA) a indiqué que la maîtrise de Listeria peut nécessiter éventuellement des modifications dans les lieux de travail et que cette maîtrise est particulièrement délicate quand on travaille simultanément sur des protéines et des substances végétales offrant des conditions idéales pour la croissance en raison de la coexistence de souillures organiques, d'humidité élevée et de basses températures.

Les installations doivent être conçues de façon à éviter "des niches" à Listeria (points faibles de l'hygiène) et de manière à permettre des opérations adéquates de nettoyage et de désinfection.

La surveillance nécessite :

- des surfaces lisses, sans fissures, nettoyables (sols, plafonds, murs),

- un matériel adapté, facilement démontable et accessible au nettoyage,

- la maîtrise de la contamination des équipements de climatisation (nettoyabilité des gaines et des grilles ou ailettes de distribution d'air conditionné et/ou mise en place d'un système efficace de préfiltration de l'air),

- des circulations internes permettant d'éviter les contaminations croisées,

- l'utilisation de l'eau réduite au strict nécessaire (risque de vapeurs, flaques),

- les systèmes de nettoyage - désinfection doivent avoir fait la preuve de leur efficacité,

- l'existence de dispositions d'hygiène applicables au personnel.

La responsabilité du personnel est déterminante comme principale source de transfert de contamination d'où la nécessité :

- d'un effort permanent d'éducation à respecter les bonnes pratiques de fabrication et les pratiques sanitaires,

- de circulation permanente d'informations sur ces bonnes pratiques,

- d'utilisation de tous les moyens de protection disponibles en termes de conception (identification des travaux propres et sales) aussi bien que de fonctionnement (lavage des mains, des bottes, etc...),

- de mise en place d'un système de surveillance aidant le personnel à maintenir ses performances,

- de mise en place d'un plan qualité.

L'accessibilité et la nettoyabilité des surfaces, leur aptitude à permettre l'écoulement et le drainage facile de l'eau restante, puis le maintien d'une ambiance sèche sont les deux exigences prioritaires nécessaires pour tirer tout le bénéfice de l'éducation au comportement sanitaire du personnel.

La règle de base la plus importante est la suivante : la désinfection n'est efficace que si elle intervient sur une surface débarrassée des souillures et que si les quantités de matière active déposée ainsi que les temps de contact prescrits sont respectés.

VII. 4. 2. METHODE H.A.C.C.P. (236) (Figure 7) (Tableau XVII)

En 1988, l'OMS a recommandé aux industries agro-alimentaires de lutter contre la présence et/ou la prolifération des Listeria dans les aliments en vue de protéger la santé publique, d'où la mise en place de la méthode ou système H.A.C.C.P.

Ce système est une démarche qualité signifiant "Hasard Analysis Critical Control Point" ou "Analyse des dangers et points critiques pour leur maîtrise".

Cette démarche a l'avantage de focaliser les actions sur des problèmes bien identifiés au lieu de prendre toutes sortes de précautions sans en connaître bien la portée mais aussi de permettre des effets maximaux pour un coût minimal, tout en garantissant un haut niveau de sécurité.

Les principes fondamentaux sont :

- la description complète du process alimentaire et l'établissement d'un diagramme des flux,
- l'identification et l'analyse des dangers à chaque étape du process amenant à la détermination des points à risques (PR),
- la détermination des points critiques (PC) pour un danger défini et le choix des actions permettant de limiter ou de faire disparaître ce danger (points critiques pour la maîtrise ou PCM),
- la détermination des méthodes de contrôle applicables à chaque point critique (MPC),
- le choix des méthodes de contrôle de l'efficacité du système H.A.C.C.P.

Cette méthode comporte plusieurs étapes.

VII. 4. 2. 1. Etape préliminaire.

La Direction Générale de l'entreprise décide d'amorcer une démarche H.A.C.C.P ; il s'agit de l'initialisation.

C'est un groupe de travail qui en est chargé ; il a pour mission de définir les objectifs (dangers microbiologiques, chimiques, physiques...), le champ d'action (produit, process spécifique, stade final ou intermédiaire...) et le niveau de qualité requis.

Il comprend en général 2 à 8 personnes réprésentant différents secteurs de l'entreprise comme la qualité, la production, les contrôles, la recherche et développement, le marketing, les achats, le commercial, la logistique...

Cette étape préliminaire conduit à l'établissement du diagramme de fabrication du produit aussi détaillé que possible.

Ce diagramme comprend :

- les opérations unitaires successives de fabrication et les transferts,
- l'identification de toutes les matières premières utilisées,
- l'enregistrement des paramètres de production (temps, température...),
- l'identification de toutes les surfaces au contact des produits (matériels, mains, gants...),
- la prise en compte de l'environnement des produits (atmosphère, système de nettoyage...).

VII. 4. 2. 2. Analyse des dangers.

Ils peuvent être de natures très diverses à savoir physique, chimique ou microbiologique mais il ne faut retenir que ceux dont l'apparition peut être raisonnablement envisagée à chacune des étapes.

Il est donc nécessaire de faire l'inventaire des différents dangers ainsi que des mesures préventives visant à les éliminer ou à les réduire.

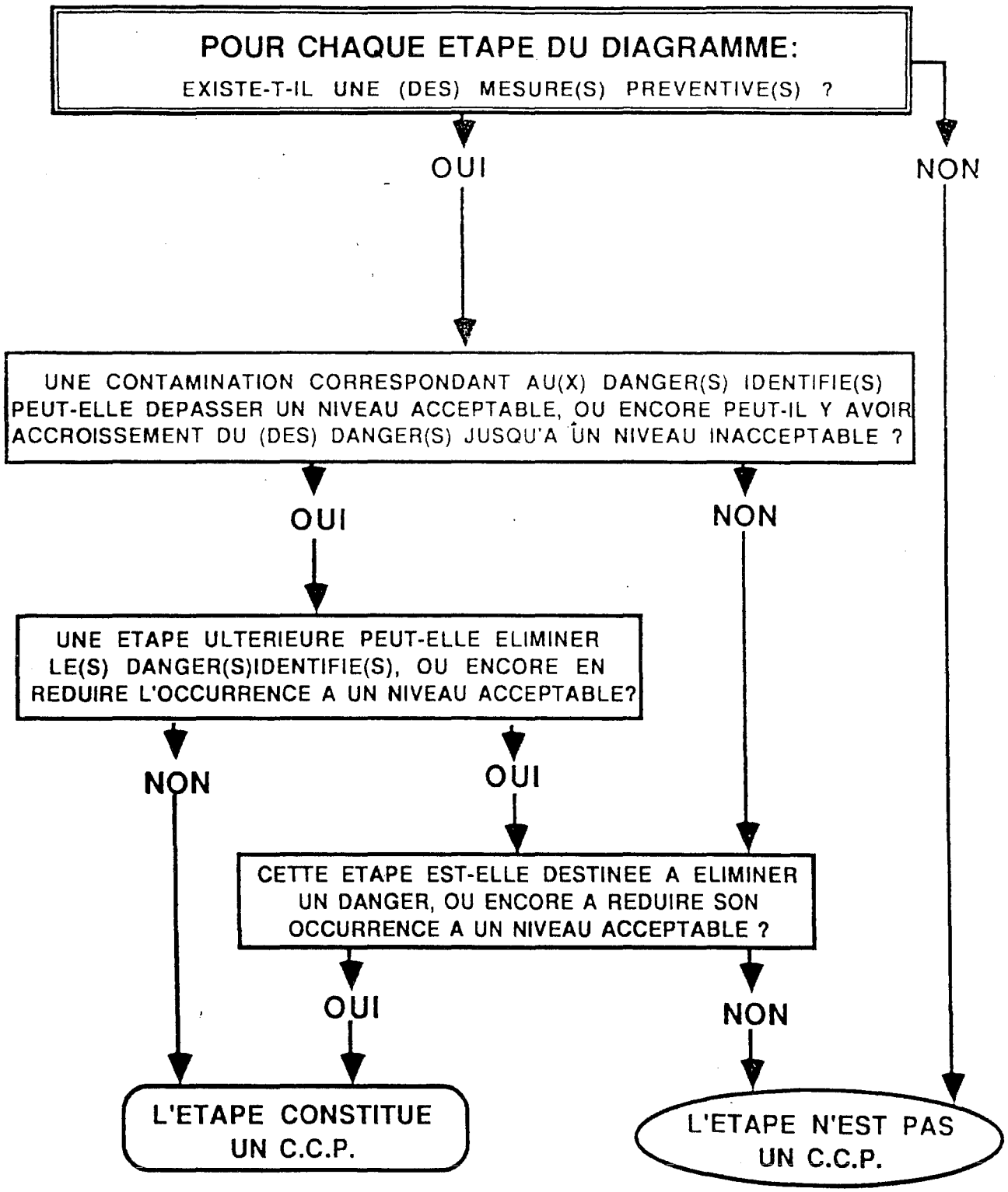
VII. 4. 2. 3. Points critiques pour la maîtrise (PCM).

Il s'agit d'une activité, d'une étape, d'un procédé, d'un processus dont les paramètres peuvent être modifiés et qui, s'ils sont maîtrisés, peuvent supprimer ou minimiser les dangers.

Tableau XVII : Etapes du système H.A.C.C.P.

ETAPES	OBJECTIFS	RESULTATS
1: ETAPE PRELIMINAIRE	- INITIALISATION - CONSTITUTION D'UN GROUPE DE TRAVAIL - ANALYSE DES PROCEDES	→ DIAGRAMME DE FABRICATION
2: ANALYSE DES DANGERS	- IDENTIFICATION DES DANGERS - EVALUATION DE LA PROBABILITE D'APPARITION - IDENTIFICATION DES MESURES PREVENTIVES DESTINEES A LES MAITRISER	→ HIERARCHISATION DES DANGERS
3: POINTS CRITIQUES POUR LA MAITRISE: (CCP)	- IDENTIFICATION DES CCP - ETABLISSEMENT DE VALEURS CIBLES	→ REFERENTIEL D'ENTREPRISE (I) -specifications -procedures -modes opératoires
4: SURVEILLANCE	- DEFINITION D'UN SYSTEME D'OBSERVATION - DEFINITION DES ACTIONS CORRECTIVES	→ REFERENTIEL D'ENTREPRISE (II) -echantillonnage -méthodes de contrôle -conduite à tenir
5: EVALUATION	- DEFINITION DES PROCEDURES DE VERIFICATION DU SYSTEME HACCP - ENREGISTREMENT SYSTEMATIQUE DES DONNEES	→ AUDIT SYSTEME DOCUMENTAIRE

Figure 7 : Arbre de décision pour l'identification des points critiques de maîtrise (C.C.P.)



Pour chaque point critique, on définit des valeurs cibles mesurables donc contrôlables (température, pH, Aw...)

VII. 4. 2. 4. Surveillance.

Elle consiste à définir la fréquence des observations, des enregistrements systématiques (plans d'échantillonnage, fréquence des contrôles), leurs modalités pratiques (fiches de laboratoire, cartes de contrôle) en vue de vérifier que les valeurs cibles sont respectées.

Les techniques physiques et chimiques (température, pH, observations visuelles) sont préférées aux techniques microbiologiques car elles sont plus rapides.

Des actions correctives spécifiques sont prévues lorsque les déviations par rapport aux valeurs-cibles définies sont décelées.

Ces actions doivent être suffisamment explicites pour pouvoir être appliquées immédiatement et sans équivoque.

VII. 4. 2. 5. Evaluation de l'efficacité.

Elle passe d'abord par la vérification que la procédure est appliquée, par exemple au cours d'un audit interne ou d'essais (analyse bactériologique).

L'ensemble des données recueillies fait l'objet d'une collecte, d'une exploitation et d'un archivage (ingrédients, traitements, rapports d'essais, dossiers concernant les déviations, procédures d'adaptation du système H.A.C.C.P.).

VII. 4. 3. AUTRES METHODES.

VII. 4. 3. 1. Lors de la préparation.

Elles font appel essentiellement aux règles d'hygiène visant à minimiser les contaminations ou à inhiber la prolifération des Listeria.

Les principes sont :

- prévention des contaminations sur la chaîne d'abattage passant par :

  . le respect des principes de base de l'hygiène,

  . la qualité sanitaire des animaux abattus,

  . la sensibilisation du personnel,

  . le nettoyage et la désinfection des locaux et du matériel.

Les points critiques à ce niveau sont :

- l'anesthésie et la saignée où tout déplacement vers les autres postes de la chaîne doit être évité et où la décontamination régulière du couteau et le nettoyage en continu de la table de saignée sont nécessaires,

- l'échaudage où le douchage des carcasses avant immersion permet de limiter les phénomènes d'inspiration réflexe et de réduire la pollution de l'eau,

- l'éviscération où la pointe du couteau doit être maintenue tournée vers l'opérateur afin d'éviter les perforations intestinales,

- la séparation des onglons est à mettre en œuvre le plus tôt possible sur la chaîne,

- le transit des carcasses doit permettre d'éviter les contacts entre les carcasses et les installations fixes (portes, murs, postes de travail).

  - séparation des secteurs propres et souillés,

  - marche en avant des produits, sans retour en arrière ni entre-croisement des courants de circulation (les matières premières éventuellement souillées ne doivent pas entrer en contact avec les produits transformés),

- utilisation précoce, rapide et continue du froid.

Le respect de la chaîne du froid est essentiel pour limiter au mieux la multiplication de Listeria monocytogenes.

Un équipement de réfrigération doit donc être en parfait état de fonctionnement et de capacité suffisante et doit permettre également de maintenir une ambiance sèche, facteur limitant le développement de Listeria.

Les aliments doivent être disposés dans les chambres froides de telle façon qu'ils ne soient pas en contact les uns avec les autres et que l'air froid puisse correctement circuler,

- agrément du cadre de travail : espace, aération, atténuation des bruits, entretien des locaux et du matériel,

- formation et sensibilisation du personnel à l'hygiène.

Le personnel doit disposer de façon à répondre à la politique d'hygiène menée par l'entreprise :

- de locaux et de matériel correctement conçus et entretenus,

- d'une tenue vestimentaire répondant aux exigences des industries agro-alimentaires,

- d'une formation à l'hygiène dynamique et permanente.

- nettoyage et désinfection des locaux et du matériel.

Un plan de nettoyage - désinfection doit être clairement défini et appliqué rigoureusement.

VII. 4. 3. 2. Lors de la commercialisation.

Deux points sont primordiaux ; il s'agit de :

- l'importance de la chaîne du froid à savoir :

  . le respect des températures à cœur des denrées,

  . le transport par camion avec raccourcissement des temps de chargement et de déchargement, maintien du fonctionnement des groupes frigorifiques des camions et réfrigération des quais,

  . la distribution en évitant les surcharges des présentoirs et en respectant les températures de conservation.

- l'importance de l'humidité ; le produit alimentaire doit être la plus sec possible.

VII. 4. 3. 3. Lors de la conservation.

Ce point a déjà été vu par ailleurs mais il est important d'insister sur la séparation des aliments crus et cuits dans une réserve froide, sur la cuisson suffisante des aliments et sur le nettoyage et la désinfection des couteaux et de la paroi intérieure du réfrigérateur et sur le lavage des mains.

VII. 4. 4. DECONTAMINATION DES ALIMENTS.

Il convient ici de rappeler que, selon l'OMS, les seuls aliments que l'on puisse considérer exempts de Listeria sont ceux qui ont été pasteurisés, irradiés, cuits ou conservés au vinaigre, à condition que toute recontamination ultérieure ait été évitée, soit par la consommation immédiate, soit par la mise sous emballage clos.

La décontamination se fait différemment selon les aliments :

- les aliments carnés :

. irradiation ou radurisation (164) (182) : une dose de 2 kGy permet de détruire 10000 Listeria monocytogenes (273).

Du point de vue microbiologique, toxicologique et nutritionnel, elle ne présente aucun risque pour la santé humaine jusqu'à 10 kGy.

Elle est généralement effectuée sur le produit emballé, évitant ainsi toute recontamination.

Les obstacles à sa mise en place sont de nature économique (coût d'installation élevé), psychologique (réticence des consommateurs) et politique (stratégie de lutte).

Une dose de 2,5 kGy est efficace pour des poulets (339).

L'exposition de la viande de porc à une source de radiation au cobalt 60 de 6,6 kGy/h à des doses de 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, et 6 kGy montre qu'une dose de 2 kGy entraîne une réduction de 7 log (542).

Une dose de 1,5 kGy pour la viande et de 3-4 kGy pour le foie permettent de réduire la croissance de la flore d'altération (Pseudomonas, Enterobacter) et d'éliminer la flore pathogène (Listeria) (141).

Par contre, la survie dans la Mozzarella et la glace a été démontrée (251).

Seules les viandes de volaille congelées et séparées mécaniquement sont autorisées à être décontaminées par cette technique par l'arrêté ministériel du 25 Septembre 1895.

- biopréservation : les bactéries lactiques (3) (244) (340) (480) telles que Lactobacillus spp. (451) (495) (496) (498) (528) (599), Pediococcus spp. (41) (50) (135) (136) (197) (269) (384) (413) (525) (611), Leuconostoc spp. (124) (252) (253) et Carnobacterium spp. (86) (87) (497) et les bactéries corynéformes (554) sécrètent des bactériocines ayant un rôle dans l'inhibition des Listeria.

Ces bactériocines sont donc des substances inhibitrices sécrétées selon des mécanismes variés dont la plupart ne sont pas clairs, dont la nature protéique est confirmée par démonstration de leur sensibilité aux enzymes protéolytiques et dont la production est affectée par le milieu de croissance, le pH et la température de croissance (3).

Ces substances possédent généralement des spectres d'activité antibactérienne étroits et des modes d'action bactéricide ou bactériostatique.

Cette technique semble trouver ses applications plutôt dans les produits de charcuterie.

La nisine est la bactériocine la plus connue produite par les bactéries lactiques (276).

Elle a un spectre d'activité large sur les bactéries Gram (+) et les espèces Salmonella variées et autres bactéries Gram (-) (533).

Elle altère la perméabilité de la membrane cytoplasmique, conduisant à une effusion d'acides aminés et une diminution du potentiel membranaire et des gradients ioniques (74) (484).

Une autre bactériocine, la lactostrepcine 5 (Lac 5) produite par Streptococcus cremoris (613), rompt l'intégrité de la membrane cellulaire des cellules de Lactococcus lactis et donc conduit à une fuite d'ions et d'ATP.

La lactococcine A (555), qui agit préférentiellement sur les lactococci, augmente la perméabilité de la membrane cytoplasmique des cellules entières, inhibe le transport des acides aminés dans les cellules sensibles et cause une effusion d'acides aminés préaccumulés.

La mésentéricine Y105 (257) (373), bactériocine produite par Leuconostoc mesenteroides Y105, est un peptide de faible poids moléculaire composé de 36 acides aminés qui est hautement thermostable et acidostable et dont la structure primaire ressemble étroitement à d'autres bactériocines récemment découvertes ; leucocine A-UAL187 (252), pédiocine PA-1 (197) , sakacine P (546) et curvacine A (546).

Elle possède diverses propriétés :

- elle diminue le potentiel membranaire.

En effet, la mesure par cytométrie en flux montre que mY105 diminue l'incorporation de la sonde potentielle fluorescente rhodamine 123 (Rh123) se produisant seulement dans les cellules possédant des membranes intactes donc diminue le potentiel membranaire ce qui induit une perméabilisation de la membrane cytoplasmique des cellules cibles aboutissant à un échange libre d'ions à travers la membrane.

- elle inhibe le transport de leucine et d'acide glutamique principalement mais aussi d'acide alanine amino-isobutyrique (analogue non métabolisable de l'alanine) et de lysine.

En effet, l'incorporation de leucine et d'acide glutamique se fait beaucoup moins rapidement.

- elle induit une effusion partielle d'acides aminés préaccumulés à partir des cellules qui ont antérieurement accumulé de la leucine ou de l'acide glutamique.

Ceci suggère que la libération de leucine et d'acide glutamique est médiée non pas par un transporteur mais probablement par une simple fuite à travers la membrane et qu'une petite fraction d'acides aminés transportés dans les cellules est incorporée dans les protéines durant le temps d'incubation.

La non-accumulation et l'effusion d'acides aminés à partir des cellules sensibles sont en accord avec les données indiquant que mY105 diminue le potentiel membranaire des bactéries cibles.

- elle agit sur les mitochondries en augmentant le stade 4 de la respiration et en diminuant le stade 3 de la respiration.

- elle inhibe l'ATP synthétase donc diminue la synthèse d'ATP.

- elle inhibe l'adénine nucléotide translocase tandis que l'affinité de l'ADP pour son transporteur n'est pas modifiée.

Le premier évènement de l'action de mY105 peut être la formation directe ou indirecte de pores dans la membrane plasmatique transportant l'énergie, spécialement celle de sa cible naturelle hébergeant des phospholipides particuliers et/ou une organisation protéique puis la dépolarisation et l'effusion de composés cytoplasmiques de faible masse moléculaire.

De tels pores ne peuvent pas être formés par seulement une molécule mais plutôt par des molécules peptidiques qui s'aggrègent ou agissent en conjonction avec d'autres molécules membranaires pour établir un pore fonctionnel.

La pédiocine JD (106) (413) (465) (499), bactériocine pediococcale thermostable produite par Pediococcus acidilactici JD1-23, agit sur la force motrice du proton et la perméabilité au proton de Listeria monocytogenes donc sur la membrane cytoplasmique.

Les cellules de contrôle, traitées avec la bactériocine inactivée par la trypsine à pH de 5,3 à 6,1 maintiennent un gradient de pH et un potentiel membranaire d'approximativement 0,65 unité de pH et 75 mV.

Cependant, ces gradients sont rapidement diminués dans les cellules après exposition à la pédiocine JD, même si aucune lyse cellulaire ne se produit.

Les cellules entières traitées avec la bactériocine sont deux fois plus perméables aux protons que les cellules de contrôle.

Les résultats suggèrent que l'action inhibitrice de la pédiocine JD envers Listeria monocytogenes est dirigée contre la membrane cytoplasmique et que l'inhibition de Listeria monocytogenes peut être causée par l'effondrement du gradient de pH et/ou du potentiel membranaire par liaison à un récepteur cytoplasmique spécifique et par l'augmentation de la perméabilité au proton dans les cellules de Listeria monocytogenes.

Bien que JD soit active sur Listeria même à pH proche de la neutralité, il apparaît que la bactériocine agisse comme un proton non couplé dans Listeria monocytogenes.

La pédiocine AcH produite par Pediococcus acidilactici produit une fuite d'ions K^+ et des matériels absorbant l'UV et rend les cellules sensibles perméables à l'o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside.

La pédiocine inhibe le transport actif du glucose.

L'utilisation de bactéries lactiques bactériocinogéniques ou de leurs bactériocines comme conservateurs potentiels doit donc attirer l'attention de l'industrie alimentaire.

Ceci est spécialement vrai pour les bactériocines dérivant des microflores des aliments fermentés et non des pathogènes gastrointestinaux.

. traitement au CO_2 à haute pression (576) : Listeria monocytogenes mise en suspension dans de l'eau distillée est complètement tuée par un traitement au CO_2 à 6,18 MPa (61,2 atm) à 35°C pendant 2 h alors que le traitement à N_2 dans les mêmes conditions ne possède pas d'effet bactéricide.

Dans les aliments, le traitement au CO_2 à 13,7 MPa (131,1 atm) à 35°C pendant 2 h est efficace pour éradiquer Listeria.

- <u>le lait</u> : pasteurisation et stérilisation.

- <u>les végétaux</u> : contrôle des ensilages.

L'utilisation du four micro-ondes n'a de valeur que si la température est maintenue pendant près de 2 minutes ou si la température est égale en tous points de l'aliment (113) (353).

Cette méthode n'est pas efficace pour certains (134) (247) (266).

9ème PARTIE :

BESOINS DE LA RECHERCHE

I. EPIDEMIOLOGIE. (154)

Il faudrait :

- déterminer l'incidence réelle chez l'homme d'où des efforts accrus pour diagnostiquer la listériose,

- développer de meilleurs systèmes de surveillance de la listériose, notamment des systèmes de collecte de données afin de mieux détecter l'exacte incidence des cas sporadiques et mieux percevoir le début des épidémies.

Il s'agit donc de recueillir des informations sur les cas, en particulier sur les facteurs de risque, les données démographiques, les sources possibles de l'infection, les détails cliniques et les sérotypes et lysotypes des souches isolées.

- améliorer les techniques sérologiques pour évaluer l'état immunitaire et la réceptivité des femmes vis-à-vis de Listeria monocytogenes avant la grossesse,

- rechercher le rôle des infections intercurrentes et d'autres facteurs qui font d'un porteur inapparent un malade par diminution des résistances ou d'autres mécanismes,

- mettre au point des alternatives à la lysotypie, comme le typage par les isoenzymes, le ribotypage et le typage par les gènes de restriction.

II. VIRULENCE ET PATHOGENICITE. (154)

Il faudrait :

- faire la lumière sur le mécanisme de la pathogénèse,

- déterminer les doses minimales infectantes surtout quand la quantité réelle de Listeria monocytogenes dans la nourriture en cause a pu être mesurée,

- étudier de façon génétique les facteurs de virulence de même que l'expression de la virulence en fonction des différentes conditions de croissance,

- développer des méthodes de substitution pour évaluer la virulence comme les épreuves sur œuf.

III. METHODOLOGIE. (154)

Il faudrait développer :

- des méthodes d'isolement différentielles,

- des méthodes quantitatives de dénombrement de Listeria monocytogenes dans les aliments.

IV. CONTAMINATION DES DENREES CRUES ET ELABOREES. (154)

Il faudrait établir :

- les cycles de contamination de Listeria monocytogenes ; ceci comprend le rôle des déjections humaines et animales, la dissémination dans l'environnement par l'épandage et les eaux de surface, le rôle de la vermine dans la dissémination vers les animaux d'abattoirs, les ateliers de préparation des aliments et les denrées alimentaires,

- les sources de Listeria monocytogenes et les points d'entrée dans la chaîne alimentaire,

- les mesures de prévention de la contamination des ateliers de préparation et de la recontamination après fabrication.

V. ROLE DES TECHNIQUES DE FABRICATION. (154)

Il faudrait étudier :

- les effets du traitement thermique sur Listeria monocytogenes dans les aliments autres que le lait de vache, par exemple la viande,

- l'emploi de l'irradiation des aliments pour supprimer Listeria monocytogenes de certains fromages à pâte molle sans nuire aux qualités organoleptiques,

- la mise au point de techniques supprimant Listeria monocytogenes d'aliments "prêts à consommer" et utilisant les plus récentes découvertes,

- l'amélioration des équipements de fabrication pour faire avancer les progrès de l'hygiène dans la production alimentaire.

VI. ROLE DES FACTEURS EXTRINSEQUES ET INTRINSEQUES. (154)

Il faudrait étudier le rôle de ces facteurs pris isolément ou s'ajoutant les uns aux autres (pH, Aw, flore microbienne, additifs alimentaires), plus particulièrement pour les aliments soumis à de longs délais de distribution.

VII. LISTERIA AUTRES QUE LISTERIA MONOCYTOGENES. (154)

Une étude sur le rôle de ces germes serait nécessaire car ils sont un excellent indicateur de souillure post-fabrication.

CONCLUSION

Listeria monocytogenes, bactérie pathogène, doit attirer l'attention des pouvoirs publics, des industriels, des commerçants et de la population.

Du fait de son caractère ubiquitaire, Listeria monocytogenes peut être rencontrée un peu partout à condition que le milieu soit favorable à sa survie d'une part et à son développement d'autre part.

Elle est très invasive et sécrète une toxine, la listériolysine, qui lui permet d'être libérée dans le cytoplasme d'une cellule hôte après phagocytose et de s'y multiplier.

L'incidence est faible mais le taux de mortalité est élevé ; de ce fait, des progrès doivent être faits dans l'optique de déterminer la dose infectante.

En raison de la succession des épidémies, les pays concernés par le problème se sont attachés à la combattre le mieux possible par la mise en place d'un plan de surveillance très strict, impliquant plusieurs organismes.

Listeria monocytogenes, fort heureusement, ne touche pas toute la population puisque seuls les nouveau-nés, les femmes enceintes, les immunodéprimés, les personnes âgées développent la maladie principalement sous la forme de méningite et de septicémie.

Les autres catégories d'individus peuvent être contaminés mais leur état de santé suffisamment sain leur permet de ne pas être atteints par la maladie.

Le diagnostic de toute listériose devra être très rapide de manière à instituer un traitement adéquat et efficace.

Le respect des règles d'hygiène et des mesures préventives établies par le Laboratoire National de la Santé et par le "Center for Disease Control" ainsi que la mise en place d'un plan de surveillance doivent permettre une nette réduction du nombre de cas ; de plus, les femmes enceintes devront consulter leur médecin à la moindre poussée de température inexpliquée.

Un des moyens de lutte le plus important est de contrôler la contamination des denrées alimentaires ; par conséquent, ceci implique de connaître le comportement des Listeria dans celles-ci.

Les méthodes d'isolement et de détection doivent donc être les plus performantes possibles mais aussi les plus rapides ; un effort doit être fait dans cette optique.

De nombreuses incertitudes demeurent cependant au sujet des Listeria ; de ce fait, la recherche a encore beaucoup de progrès à faire en particulier le développement de meilleurs systèmes de surveillance, l'étude du mécanisme de pathogénèse, la détermination de la dose minimale infectante, la mise au point de méthodes d'isolement et de dénombrement mais aussi d'alternative à la lysotypie comme le ribotypage, le typage par les isoenzymes, l'analyse RAPD...

La contamination des denrées alimentaires au cours des différentes étapes de leur fabrication doit également être étudiée de façon détaillée.

Il ne faut tout de même pas que la peur de la maladie ne devienne une véritable psychose puisque quelques moyens de prévention et de lutte sont déjà connus et les femmes enceintes si elles sont bien surveillées et traitées à temps, ne font courir aucun risque à leur enfant.

BIBLIOGRAPHIE

1 - AHAMAD N., E.H. MARTH.
Behavior of Listeria monocytogenes at 7, 13, 21 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid.
J. Food Prot., 1989, **52** (10), 688-695.

2 - AHAMAD N., E.H. MARTH.
Acid injury of Listeria monocytogenes.
J. Food Prot., 1990, **53** (1), 26-29.

3 - AHN C., M.E. STILES.
Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats.
J. Appl. Bacteriol., 1990, **69** (3), 302-310.

4 - ALEXANDER A.V., R.L. WALKER, B.J. JOHNSON, B.R. CHARLTON, L.W. WOODS.
Bovine abortions attributable to Listeria ivanovii : four cases (1988-1990).
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1992, **200** (5), 711-714.

5 - ALGAN M., B. JONON, J.L. GEORGE, C. LION, M. KESSLER, J.C. BURDIN.
Listeria monocytogenes endophthalmitis in a renal transplant patient receving ciclosporin.
Ophthalmologica, 1990, **201** (1), 23-27.

6 - AL-ZOREKY N., W.E. SANDINE.
Highly selective medium for isolation of Listeria monocytogenes from food.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (10), 3154-3157.

7 - AMIN M, F. KUROSAKI, A. NISHI.
Carrot phytoalexin alters the membrane permeability of Candida albicans and multilamellar liposomes.
J. Gen. Microbiol., 1988, **134**, 241-246.

8 - ANONYME.
Listeria dans les produits de charcuteries - mesures préventives.
Disponible de la Fédération Française des Industries Charcutières (FIC). Publication de Janvier 1992.

9 - ANTONISSEN A.C.J.M., P.J.M.R. LEMMENS, J.F. VAN DEN BOSCH, C.P.A. VAN BOVEN.
Purification of a delayed hypersensitivity-inducing protein from Listeria monocytogenes.
FEMS Microbiol. Lett., 1986, **34**, 91-95.

10 - ARIKARA K., S. OGIKARA, J. SAKATA, M. ITOH, V. KONDO.
Antimicrobial activity of Enterococcus faecalis against Listeria monocytogenes.
Lett. Appl. Microbiol., 1991, **13** (4), 190-192.

11 - ART D., P. ANDRE.
Comparison of three selective isolation media for the detection of L. monocytogenes in foods.
Int. J. Med. Microbiol., 1991, **275** (1), 79-84.

12 - AUDURIER A., J. ROCOURT, A. COURTIEU.
Isolement et caractérisation des bactériophages de Listeria monocytogenes.
Ann. Microbiol. (Institut Pasteur), 1977, **128 A**, 185-198.

13 - AUDURIER A., A.G. TAYLOR, B. CARBONNELLE, J. Mc LAUCHLIN.
A phage typing system for Listeria monocytogenes and its use in epidemiological studies.
Clin. Invest. Med., 1984, **7**, 229-232.

14 - AUDURIER A., C. MARTIN.
Phage typing of Listeria monocytogenes.
Int. J. Food Microbiol., 1989, **8**, 251-258.

15 - BACK J.-P., S.A. LANGFORD, R.G. KROLL.
Growth of Listeria monocytogenes in Camembert and other soft cheeses at refrigeration temperatures.
J. Dairy Res., 1993, **60** (3), 421-429.

16 - BAILEY J.S., D.L. FLETCHER, N.A. COX.
Listeria monocytogenes colonization of boiler chickens.
Poult. Sci., 1990, **69**, 457-461.

17 - BAIRD-PARKER A.C.
An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci.
J. Appl. Bacteriol., 1962, **25**, 12-19.

18 - BALOGA A.O., S.K. HARLANDER.
Comparison of methods for discrimination between strains of Listeria monocytogenes from epidemiological surveys.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (8), 2324-2331.

19 - BANNERMAN E.S., J. BILLE.
A new selective medium for isolating Listeria spp. from heavily contaminated material.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54** (1), 165-167.

20 - BANNERMAN E.S., M-N. YERSIN, J. BILLE.
Evaluation of the Organon-Teknika MICRO-ID LISTERIA system.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (6), 2011-2015.

21 - BARANY F.
Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, **88**, 189-193.

22 - BARANY F.
The ligase chain reaction (LCR) in a PCR world.
PCR Methods Applications, 1991, **1**, 5-16.

23 - BARNIER E., J.P. VINCENT, M. CATTEAU.
Survie de Listeria monocytogenes dans les saumures et le sérum de fromagerie.
Sci. Aliments, 1988, **8**, HS IX, 175-178.

24 - BASSAN R.
Bacterial endocarditis produced by Listeria monocytogenes, case presentation and review of literature.
Am. J. Clin. Pathol. (USA), 1975, **63** (4), 522 -527.

25 - BAXTER F., F. WRIGTH, R.M. CHALMERS, J.C. LOW, W. DONACHIE.
Characterization by multilocus enzyme electrophoresis of Listeria monocytogenes isolates involved in ovine listeriosis outbreaks in Scotland from 1989 to 1991.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (9), 3126-3129.

26 - BAZIN C., S. LAMISSE, P. LE BIGOT, G. GINIES, F. VACHON, V. VIC-DUPONT.
Etude clinique de 50 cas de listérioses neuro-méningées de l'adulte.
Méd. Mal. Infect., 1977, **7** (1), 26-29.

27 - BAZIN C.
Listérioses.
Encycl. Med. Chir. (Paris). Maladies infectieuses, 8017 R^{10}, 1985, **11**, 6p.

28 - BEARNS R.E., K.F. GIRARD.
The effect of pasteurization on Listeria monocytogenes.
Can. J. Microbiol., 1958, **4**, 55-61.

29 - BEARNS R.E., K.F. GIRARD.
On the isolation of Listeria monocytogenes from biological specimens.
Am. J. Med. Technol., 1959, **25**, 120-126.

30 - BECKERS H.J., P.S.S. SONTORO, E.H.M. DELFGOU-VAN ASCH.
The occurence of Listeria monocytogenes in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat.
Int. J. Food Microbiol., 1987, **4**, 249-256.

31 - BEERENS H., M.M. TAHON-CASTEL.
Ann. Inst. Pasteur (Paris), 1966, **111**, 90-93.

32 - BELTRAN A., C. PELAEZ, A. MORAL.
Keeping quality of vacuum-packed smoked sardine fillets : microbiological aspects.
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1989, **188**, 232-236.

33 - BELYI Y.F., I.S. TARTAKOVSKII, S.V. PROSOROVSKII.
Purificatiion and characterization of a 58-kDa cell wall-associated protein from Listeria monocytogenes.
Med. Microbiol. Immunol. Berl., 1993, **182** (2), 87-95.

34 - BENEDICT R.C., F.J. SCHULTZ.
An effect of iron level and food type on production of hemolysin and catalase of Listeria monocytogenes strain Scott A.
J. Food Prot., 1991, **54** (7), 528-531.

35 - BENKERROUM N.
Inhibitory action of nisin against Listeria monocytogenes.
J. Dairy Sci., 1988, **71** (12), 3237-3245.

36 - BERCHE P., J.L. GAILLARD, S. RICHARD.
nvasiveness and intracellular growth of Listeria monocytogenes.
Infection, 1988, **16**, 145-148.

37 - BERCHE P., J.L. GAILLARD, M. SIMONET.
Bactériologie. Bactéries des infections humaines.
Médecine. Sciences. Flammarion. 1988.

38 - BERCHE P., J.L. GAILLARD.
Physiopathologie de la listériose humaine.
Rev. Prat. (PARIS), 1989, **39**, 17, 1507-1509.

39 - BERCHE P.
Physiopathologie.
Impact Médecin. Les dossiers du praticien n° **176**. La listériose. 1992. Chapitre 4. 14-17.

40 - BERRANG M.E., R.E. BRACKETT, L.R. BEUCHAT.
Growth of Listeria monocytogenes on fresh vegetables stored under controlled atmosphere.
J. Food Prot., 1989, **52**, 702-705.

41 - BERRY E.D., M.B. LIEWEN, R.W. MANDIGO, R.W. HUTKINS.
Inhibition of Listeria monocytogenes by bacteriocin-producing Pediococcus during the manufacture of fermented semidry sausage.
J. Food Prot., 1990, **53**, 194-197.

42 - BESNIER J.M.
Aspects cliniques de la listériose.
Impact Médecin. Les dossiers du praticien n° **176**. La listériose. 1992. Chapitre 5. 17-21.

43 - BESSESEN M.T., Q. LUO, H.A. ROTBART, M.J. BLASER, R.T. ELLISON.
Detection of Listeria monocytogenes by using the polymerase chain reaction.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56**, 2930-2932.

44 - BEST M., M.E. KENNEDY, F. COATES.
Efficacy of a variety of disinfectants against Listeria spp.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (2), 377-380.

45 - BEUCHAT L.R.
Injury and repair of Gram-negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane.
Adv. Appl. Microbiol., 1978, **23**, 219-243.

46 - BEUCHAT L.R., R.E. BRACKETT, D.Y.-Y. HAO, D.E. CONNER.
Growth and thermal inactivation of Listeria monocytogenes in cabbage and cabbage juice.
Can. J. Microbiol., 1986, **32**, 791-795.

47 - BEUCHAT L.R., R.E. BRACKETT.
Inhibitory effects of raw carrots on Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (6), 1734-1742.

48 - BEUCHAT L.R., R.E. BRACKETT.
Survival and growth of Listeria monocytogenes on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature.
J. Food Sci., 1990, **55**, 755-758.

49 - BEUCHAT L.R., R.E. BRACKETT.
Behavior of Listeria monocytogenes inoculated into raw tomatoes and processed tomato products.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (5), 1367-1371.

50 - BHUNIA A.K., M.C. JOHNSON, B. RAY.
Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici.
J. Appl. Bacteriol., 1988, **65**, 261-268.

51 - BHUNIA A.K., M.G. JOHNSON.
Monoclonal antibody specific for Listeria monocytogenes associated with a 66-Kilodalton cell surface antigen.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (6), 1924-1929.

52 - BIBB W.F., B. SCHWARTZ, B.G. GELLIN, B.D. PLIKAYTIS, R.E. WEAVER.
Analysis of Listeria monocytogenes by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations.
Int. J. Food Microbiol., 1989, **8**, 233-239.

53 - BIBB W.F., B.G. GELLIN, R. WEAVER, B. SCHWARTZ, B.D. PLIKAYTIS, M.W. REEVES, R.W. PINNER, C.V. BROOME.
Analysis of clinical and food-borne isolates of Listeria monocytogenes in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (7), 2133-2141.

54 - BIBI W., M.R. BACHMANN.
Antibacterial effect of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on the growth of the Listeria spp. in skim milk.
Milchwissenschaft, 1990, **45** (1), 26-28.

55 - BILLAUD E. F. RAFFI.
Traitement et prévention.
Impact Médecin. Les dossiers du praticien n° **176**. La listériose. 1992. Chapitre 6. 17-21.

56 - BILLE J., B. CATIMEL, E. BANNERMAN, C. JACQUET, M.N. YERSIN, I. CANIAUX, D. MONGET, J. ROCOURT.
Api Listeria, a new and promising one-day system to identify Listeria isolates.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (6), 1857-1860.

57 - BLAIS B.W., L.M. PHILIPPE.
A simple RNA probe system for analysis of Listeria monocytogenes polymerase chain reaction products.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (9), 2795-2800.

58 - BLENDEN D.C.
Listeriosis.
In : Diseases of swine (Editeur : H.W. DUNNE. 3th Edition), 1991, **401-412**, The Iowa State University Press, Ames.

59 - BOERLIN P., J. ROCOURT, J.C. PIFFARETTI.
Taxonomy of the genus Listeria by using multilocus enzyme electrophoresis.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1991, **41**, 59-64.

60 - BOERLIN P., J. ROCOURT, J.C. PIFFARETTI.
Typing of human, animal, food and environmental isolates of Listeria monocytogenes by multilocus enzyme electrophoresis.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (6), 1624-1629.

61 - BOHNERT M., F. DILASSER, C. DALET, J. MENGAUD, P. COSSART.
Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of Listeria monocytogenes in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR.
Res. Microbiol., 1992, **143**, 271-280.

62 - BOISIVON A.
Action bactériostatique et bactéricide comparée des pénicillines, céphalosporines, aminosides et des associations ampicilline-gentamycine et triméthoprime-sulfaméthoxazole sur Listeria monocytogenes.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1980, **131 B**, 267-276.

63 - BOJSEN-MOLLER J.
Human listeriosis. Diagnostic epidemiological and clinical studies.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (3)., 1972, **229**, 1-157.

64 - BOLTON F.J.
An investigation of indirect conductimetry for detection of some food-borne bacteria.
J. Appl. Bacteriol., 1990, **69** (5) , 655-661.

65 - BORDER P.M., J.J. HOWARD, G.S. PLASTOW, K.W. SIGGENS.
Detection of Listeria species and Listeria monocytogenes using polymerase chain reaction.
Letters Appl. Microbiol., 1990, **11**, 158-162.

66 - BORDERON J.C., E. BORDERON, J. LAUGIER, R. BOULARD.
Etude de la colonisation par Entérobactéries résistant aux antibiotiques : comparaison des enfants ne recevant pas d'antibiotiques et des enfants traités par ampicilline.
Ann. Pédiatr., 1976, **23**, 53-61.

67 - BOUCHER M., M.L. YONEKURA, R.J. WALLACE, J.P. PHELAN.
Adult respiratory distress syndrome : a rare manifestation of Listeria monocytogenes infection in pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol., 1984, **149** (6), 689-688.

68 - BRACKETT R.E., L.R. BEUCHAT.
Survival of Listeria monocytogenes in whole egg and egg yolk powders and in liquid whole eggs.
Food Microbiology, 1991, **8** (4), 331-337.

69 - BRADSHAW J.G., J.T. PEELER, J.J. CORWIN, J.M. HUNT, J.T. TIERNEY, E.P. LARKIN, R.M. TWEDT.
Thermal resistance of Listeria monocytogenes in milk.
J. Food Prot., 1985, **48**, 743-745.

70 - BRIONES V., M.M. BLANCO, A. MARCO, N. PRATS, J.F. FERNANDEZ-GARAYZABAL, G. SUAREZ, M. DONINGO, L. DOMINGUEZ.
Biliary excretion as possible origine of Listeria monocytogenes in fecal carriers.
American Journal of Veterinary Research, 1992, **53** (2), 191-193.

71 - BROOKS J.L., J.P. BACK, R.G. KROLL.
Direct application to dairy foods of a Listeria-specific oligonucleotide probe to 16S rRNA.
Int. J. Food Microbiol., 1992, **16** (4), 303-312.

72 - BROSCH R., C. BUCHRIESER, J. ROCOURT.
Subtyping of Listeria monocytogenes serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis.
Res. Microbiol., 1991, **142**, 667-675.

73 - BROSCH R., C. BUCHRIESER, B. SIXL-VOIGT, J. ROCOURT.
Use of pulsed field electrophoresis of DNA restriction fragments for comparing Listeria monocytogenes strains isolated from human infections and food in Austria.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **275** (4), 557-560.

74 - BRUNO M.E.C., A. KAISER, T.J. MONTVILLE.
Depletion of proton motive force by nisin in Listeria monocytogenes cells.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58**, 2255-2259.

75 - BSAT N., C.A. BATT.
A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non-radioactive detection of Listeria monocytogenes.
Mol. Cell. Probes, 1993, **7** (3), 199-207.

76 - BUAZZI M.M., E.H. MARTH.
Mechanisms in the inhibition of Listeria monocytogenes by potassium sorbate.
Food Microbiol., 1991, **8** (3), 249-256.

77 - BUAZZI M.M., E.H. MARTH.
Sites of action by propionate on Listeria monocytogenes.
Int. J. Food Microbiol., 1992, **15** (1-2), 109-119.

78 - BUBERT A., S. KÖHLER, W. GOEBEL.
The homologous and heterologous regions within the iap gene allow genus- and species-specific identification of Listeria spp. by polymerase chain reaction.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (8), 2625-2632.

79 - BUBERT A., M. KUHN, W. GOEBEL, S. KOHLER.
Structural and functional properties of the p60 proteins from different Listeria species.
J. Bacteriol., 1992, **174** (24), 8166-8171.

80 - BUCHANAN R.L., N.E. GIBBONS.
Bergey's manual of determination bacteriology, 8th Edition. Williams & Wilkins. Baltimore, 1974.

81 - BUCHANAN R.L., H.G. STAHL, D.L. ARCHER.
Improved plating media for simplified, quantitative detection of Listeria monocytogenes in foods.
Food Microbiol., 1988, **4**, 269-275.

82 - BUCHANAN R.L., H.G. STAHL, M.M. BENCIVENGO, F. DEL CORRAL.
Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactam and modified Vogel Johnson agars for detection of Listeria spp. in retail level meats, poultry and seafood.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55** (3), 599-603.

83 - BUCHANAN R.L., H.G. STAHL, R.C. WHITING.
Effects and interaction of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, sodium nitrite on the growth of Listeria monocytogenes.
J. Food Prot., 1989, **52** (12), 844-851.

84 - BUCHANAN R.L.
Advances in cultural methods for the detection of Listeria monocytogenes.
In : A.J. MILLER, J.L. SMITH, G.A. SOMKUTI (ed). Foodborne listeriosis. Society for Industrial Microbiology. Elsevier. Science Publishing. Inc., New York, 1990, p. 85-95.

85 - BUCHANAN R.L., L.A. KLAWITTER.
A research note : Effects of temperature and oxygen on the growth of Listeria monocytogenes at pH 4,5.
J. Food Sci., 1990, **55** (6), 1754-1756.

86 - BUCHANAN R.L.
Characterization of a lactic acid bacterium, Carnobacterium piscicola LK5, with activity against Listeria monocytogenes at refrigeration temperatures.
J. Food Saf., 1992, **12** (3), 199-217.

87 - BUCHANAN R.L.
Effectiveness of Carnobacterium piscicola LK5 for controlling the growth of Listeria monocytogenes Scott A in refrigerated foods.
J. Food Saf., 1992, **12** (3), 219-236.

88 - BUCHRIESER C., R. BROSCH, J. ROCOURT.
Use of pulsed field gel electrophoresis to compare large DNA-restriction fragment of Listeria monocytogenes strains belonging to serogroups 1/2 and 3.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **14**, 297-304.

89 - BUCHRIESER C., R. BROSCH, B. CATIMEL, J. ROCOURT.
Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing Listeria monocytogenes strains involved in outbreaks.
Can. J. Microbiol., 1993, **39** (4), 395-401.

90 - BUDU-AMOAKO E., S. TOORA, R.F. ABLETT, J. SMITH.
Evaluation of the ability of primary selective enrichment to resuscitate heat-injured and freeze-injured Listeria monocytogenes cells.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (9), 3177-3179.

91 - BUICK R.K., A.P. DAMOGLOU.
The effect of vacuum packaging on microbial spoilage and shelf-life of "ready-to-use" sliced carrots.
J. Sci. Food. Agri., 1987, **38**, 167-175.

92 - BUNNING V.K., C.W. DONNELLY, J.T. PEELER, E.H. BRIGGS, J.G. BRADSHAW, R.G. CRAWFORD, C.M. BELIVEAU, J.T. TIERNEY.
Thermal inactivation of Listeria monocytogenes with bovine milk phagocytes.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54**, 364-370.

93 - BUNNING V.K., R.G. CRAWFORD, J.T. TIERNEY, J.T. PEELER.
Thermotolerance of Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium after sublethal heat shock.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (10), 3216-3219.

94 - BUNNING V.K., R.G. CRAWFORD, J.T. TIERNEY, J.T. PEELER.
Thermotolerance of heat-shocked Listeria monocytogenes in milk exposed to high-temperature, short-time pasteurization.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (6), 2096-2098.

95 - BUSCH S.V., C.W. DONNELLY.
Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured Listeria monocytogenes and Listeria innocua.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (1), 14-20.

96 - BUTMAN B.T., M.C. PLANCK, R.J. DURHAM, J.A. MATTINGLY.
Monoclonal antibody which identify a genus Listeria antigen.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54**, 1564-1569.

97 - CARLIER V.
Listeria dans les denrées alimentaires.
Bull. Liaison CTSCCV, 1992, **4**, 2-10.

98 - CARMINATI D.
Antimicrobial activity of lysozyme against Listeria monocytogenes in milk.
Man. Microbiol. Aliments. Nutr., 1989, **7** (1), 49-56.

99 - CARMINATI D., G. GIRAFFA, S. CARINI.
Comportement de Listeria monocytogenes en présence de Streptococcus lactis producteurs de substances de type bactériocine.
Microbiol. Aliment Nutr., 1989, **7** (3), 293-301.

100 - CARPENTER S.L., M.A. HARRISSON.
Survival of Listeria monocytogenes on processed poultry.
J. Food Sci., 1985, **54**, 556-557.

101 - CASOLARI C., B. FACINELLI, U. FABIO, J. ROCOURT, P.E. VARALDO.
Restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA from Listeria monocytogenes strains.
Eur. J. Epidem., 1990, **6**, 319-322.

102 - CASSIDAY P.K., R.E. BRACKETT, L.R. BEUCHAT.
Evaluation of three newly developed direct plating media to enumerated Listeria monocytogenes in foods.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55** (6), 1645-1648.

103 - CHAKRABORTY T., M. LEIMEISTER-WÄCHTER, E. DOMANN, M. HARTL, W. GOEBEL, T. NICHTERLEIN, S. NOTERMANS.
Coordinate regulation of virulence genes in Listeria monocytogenes requires the product of the prfA gene.
J. Bacteriol., 1992, **174** (2), 568-574.

104 - CHEN J., R. BROSCH, J.B. LUCHANSKY.
Isolation and characterization of Listeria monocytogenes-specific nucleotide sequences.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (12), 4367-4370.

105 - CHENEVERT J., J. MENGAUD, E. GORMLEY, P. COSSART.
A DNA probe specific for L. monocytogenes in the genus Listeria.
Int. J. Food Microbiol., 1989, **8**, 317-319.

106 - CHRISTENSEN D.P., R.W. HUTKINS.
Collapse of the proton motive force in Listeria monocytogenes caused by a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (10), 3312-3315.

107 - CHRISTIE R., N.E. ATKINS, E.A. MUNCH-PETERSEN.
Note on a lytic phenomenon shown by group B steptococci.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1944, **22**, 197-200.

108 - CHUNG K.T., J.S. DICKSON, J.D. CROUSE.
Attachment and proliferation of bacteria on meat.
J. Food Prot., 1989, **52**, 173-177.

109 - COLE M.B., M.V. JONES, C. HOLYOAK.
The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of Listeria monocytogenes.
J. Appl. Bacteriol., 1990, **69** (1), 63-72.

110 - COLLINS M.D., S. WALLBANKS, D.J. LANE, J. SHAH, R. NIETUPSKI, J. SMIDA, M. DORSCH, E. STACKEBRANDT.
Phylogenetic analysis of the genus Listeria based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1991, **41**, 240-246.

111 - CONKLIN A.R., I.H. SIDDIQUE.
Certain chemical and biological properties of phenol extracts from Listeria monocytogenes.
Am. J. Vet. Res., 1976, **37**, 1331-1335.

112 - CONNER D.E., R.E. BRACKETT, L.R. BEUCHAT.
Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of Listeria monocytogenes in cabbage juice.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, **52** (1), 59-63.

113 - COOTE P.J., C.D. HOLYOAK, M.B. COLE.
Thermal inactivation of Listeria monocytogenes during a process simulating temperatures achieved during microwave heating.
Journal of Applied Bacteriology, 1991, **70**, 489-494.

114 - COSSART P., M.F. VICENTE, J. MENGAUD, F. BAQUERO, J.C. PEREZ-DIAZ, P. BERCHE.
Listeriolysin O is essentail for virulence of Listeria monocytogenes : direct evidence obtained by gene complementation.
Infect. Immun., 1989, **57**, 3629-3636.

115 - COTONI L.
A propos des bactéries dénommées Listerella. Rappel d'une observation ancienne de méningite chez l'homme.
Ann. Inst. Pasteur, 1942, **68**, 92-95.

116 - COTTEREAU P., A. LAVAL.
Les aspects cliniques de la listériose chez les animaux domestiques et de laboratoire.
Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires de Médecine Comparée de Lyon, 1972, **74**, 447-454.

117 - COURTIEU A.L., A.F. MIEGEVILLE, G. HUYNH.
Epidémie des listérioses en France : rôle du Centre National de Référence (CNR) des Listeria.
Méd. Mal. Infect., 1992, **22**, HS, 30.

118 - COWART R.E., B.G. FOSTER.
Differential effects of iron on growth of Listeria monocytogenes : minimum requirements and mechanism of acquisition.
J. Infect. Dis., 1985, **151**, 721-730.

119 - COX L.J., T. KLEISS, J.L. CORDIER, C. CORDELLANA, P. KONKEL, C. PEDRAZZINI, R. BEOMER, A. SIEBENGA.
Listeria spp. in food processing non-food and domestic environments.
Food Microbiology, 1989, **6**, 49-61.

120 - CRAWFORD R.G., C.M. BELIVEAU, J.T. PEELER, C.W. DONNELLY, V.K. BUNNING.
Comparative recovery of uninjured and heat-injured Listeria monocytogenes cells from bovine milk.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55** (6), 1490-1494.

121 - CURTIS G.D.W., R.G. MITCHELL, A.F. KING, E.J. GRIFFIN.
A selective differential medium for the isolation of Listeria monocytogenes.
Lett. Appl. Microbiol., 1989, **8**, 85-98.

122 - CURTIS G.D.W., R.G. MITCHELL.
Bacteriocin (monocin) interactions among Listeria monocytogenes strains.
Int. J. Food Microbiol., 1992, **16** (4), 283-292.

123 - CZAJKA J., N. BSAT, M. PIANI, W. RUSS, K. SULTANA, M. WIEDMANN, R. WHITAKER, C.A. BATT.
Differenciation of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of Listeria monocytogenes strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (1), 304-308.

124 - DABA H., S. PANDIAN, J.F. GOSSELIN, R.E. SIMARD, J. HUANG, C. LACROIX.
Detection and activity of a bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (12), 3450-3455.

125 - DALLMIER A.W., S.E. MARTIN.
Catalase and superoxide dismutase activities after heat injury of Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54**, 581-582.

126 - DALLMIER A.W., S.E. MARTIN.
Catalase, superoxide dismutase, and hemolysin activities and heat susceptibility of Listeria monocytogenes after growth in media containing sodium chloride.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (9), 2807-2810.

127 - DATTA A.R., B.A. WENTZ, W.E. HILL.
Detection of hemolytic Listeria monocytogenes by using DNA colony hybridization.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, **53** (9), 2256-2259.

128 - DATTA A.R., B.A. WENTZ, W.E. HILL.
Identification and enumeration of beta-hemolytic Listeria monocytogenes in naturally contamined dairy products.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71** (3), 673-675.

129 - DATTA A.R., B.A. WENTZ, D. SHOOK, M.W. TRUCKSESS.
Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detection of Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54** (12), 2933-2937.

130 - DATTA A.R., B.A. WENTZ, J. RUSSELL.
Cloning of the listeriolysin O gene and development of specific gene probes for Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56**, 3874-3877.

131 - DATTA A.R., M.A. MOORE, B.A. WENTZ, J. LANE.
Identification and enumeration of Listeria monocytogenes by nonradioactive DNA probe colony hybridization.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (1), 144-149.

132 - DATTA A.R., M.H. KOTHARY.
Effects of glucose, growth temperature, and pH on Listeriolysin O production in Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (10), 3495-3497.

133 - DE GEORGES M., C.H. HEINTZ, J. VALTY, E. DROUHET, J.F. ACAR, G. LEDUC.
Endocardite infectieuse à Listeria monocytogenes et à Cephalosporium.
Pressr Méd., 1971, **79** (30), 1377-1380.

134 - DEALLER S., N. ROTOWA, R. LACRY.
Microwave reheating of convenience meals.
Br. Food J., 1990, **92** (3), 19-21.

135 - DEGNAN A.J., A.E. YOUSEF, J.B. LUCHANSKY.
Use of Pediococcus acidilactici to control Listeria monocytogenes in temperature abused vacuum-packaged wierners.
J. Food Prot., 1992, **55** (2), 98-103.

136 - DEGNAN A.J., N. BUYONG, J.B. LUCHANSKY.
Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes.
Int. J. Food Microbiol., 1993, **18** (2), 127-138.

137 - DELONG E.F., G.S. WICKHAM, N.R. PACE.
Phylogenetic strains : ribosomal RNA-based probe for the identification of single cells.
Science, 1989, **243**, 1360-1363.

138 - DENEER H.G., I. BOYCHUK.
Species-specific detection of Listeria monocytogenes by DNA amplification.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (2), 606-609.

139 - DENIS F., J.P. RAMET.
Activité antibactérienne du système lactoperoxydase sur Listeria monocytogenes.
Microbiol. Alim. Nutr., 1989, **7**, 25-30.

140 - DENIS F., J.P. RAMET.
Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on Listeria monocytogenes in tryp-ticase soy broth, UHT milk and French soft cheese.
J. Food Prot., 1989, **52**, 706-711.

141 - DESMONTS M.H.
L'ionisation des produits carnés d'origine bovine. Conséquences microbiologiques, nutritionnelles et organoleptiques.
Thèse. FRA ; DA. 1991 ; 190 p.

142 - DESPIERRES M.
Isolement de L. monocytogenes dans un milieu défavorable à Streptococcus faecalis.
Ann. Inst. Pasteur, 1971, **121**, 493-501.

143 - DICKSON J.S.
Survival and growth of Listeria monocytogenes on beef tissue surfaces as affected by simulated processing conditions.
J. Food Saf., 1990, **10**, 165-174.

144 - DOMANN E., M. LEIMEISTER-WACHTER, M. GOEBEL, T. CHAKRABORTY.
Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from Listeria monocytogenes that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene.
Infect. Immun., 1991, **59**, 65-72.

145 - DOMANN E., J. WEHLAND, K. NIEBUHR, C. HAFFNER, M. LEIMEISTER-WACHTER, T. CHAKRABORTY.
Detection of a prfA-independant promoter responsible for listeriolysin gene expression in mutant Listeria monocytogenes strains lacking the PrfA regulator.
Infect. Immun., 1993, **61** (7), 3073-3075.

146 - DOMINGUEZ RODRIGUEZ L., G.S. FERNANDEZ, J. F.F. GARAYZABAL, E.R. FERRI.
New methodology for the isolation of Listeria microorganisms from heavily contamined environments.
Appl. Environ. Microbiol., 1984, **47** (5), 1188-1190.

147 - DONKER -VOET J.
Listeria monocytogenes, some biochemical and serological aspects.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.,1972, **19**, 287-291.

148 - DONNELLY C.W., G.C. BAIGENT.
Method for flow cytometric detection of Listeria monocytogenes in milk.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, **52** (4), 689-695.

149 - DONNELLY C.W.
Historical perspectives on methodology to detect Listeria monocytogenes.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71** (3), 644-646.

150 - DONNELLY C.W., G.C. BAIGENT, E.H. BRIGGS.
Flow cytometry for automated analysis of milk containing Listeria monocytogenes.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71** (3), 655-658.

151 - DONNELLY C.W.
Resistance of Listeria monocytogenes to heat.
In A.J. MILLER, J.L. SMITH, and G.A. SOMKUTI (ed.), Foodborne listeriosis. Elsevier Science Publishing, Inc., New York, 1990, p. 189-193.

152 - DONS L., O.F. RASMUSSEN, J.E. OLSEN.
Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of Listeria monocytogenes.
Mol. Microbiol., 1992, **6** (20), 2919-2929.

153 - DOYLE M.P., J.L. SCHOENI.
Selective enrichment procedure for isolation of Listeria monocytogenes from fecal and biologic specimens.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, **51** (5), 1127-1129.

154 - DOYLE M.P., K.A. GLASS, J.T. BEERY, G.A. GARCIA, D.J. POLLARD, R.D. SCHULTZ.
Survival of Listeria monocytogenes in milk during high-temperature-short-time pasteurization.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, **53**, 1433-1438.

155 - DUMONT P., L COTONI.
Bacille semblable au rouget du porc, rencontré dans le LCR d'une méningite.
Ann. Inst. Pasteur, 1921, **35**, 625-633.

156 - DUPUY R., D. BOUTELIER, R. GOURGEON.
Listériose méningée chez un cirrhotique guéri par une antibiothérapie précoce.
Rev. Inst. Hepat., 1965, **15**, 1153-1157.

157 - EICH K.O.
Listériose.
In : Manuel Pratique des maladies du porc (1° édition française), 1987, 150-151, Nouvelles Editions de Publications Agricoles, Paris.

158 - EL-KEST P.E., E.H. MARTH.
Inactivation of Listeria monocytogenes by chlorine.
J. Food Prot., 1988, **51**, 520-524.

159 - EL-KEST P.E., E.H. MARTH.
Injury and death of frozen Listeria monocytogenes as affected by glycerol and milk components.
J. Dairy Sci., 1991, **74**, 1201-1208.

160 - EL-KEST P.E., A.E. YOUSEF, E.H. MARTH.
Fate of Listeria monocytogenes during freezing and frozen storage.
Journal of Food Science, 1991, **56** (4), 1068-1071.

161 - EL-SHENAWY M.A., E.H. MARTH.
Sodium benzoate inhibits growth of or inactivates Listeria monocytogenes.
J. Food Protect., 1988, **51**, 525-530.

162 - EL-SHENAWY M.A., E.H. MARTH.
Inhibition or inactivation of Listeria monocytogenes by sorbic acid.
J. Food Protect., 1988, **51**, 842-847.

163 - EL-SHENAWY M.A., E.H. MARTH.
Inhibition or inactivation of Listeria monocytogenes by sodium benzoate together with some organic acids.
J. Food Prot. , 1989, **52** (11), 771-776.

164 - EL-SHENAWY M.A., M.A. YOUSSEF, E.H. MARTH.
Radiation sensitivity of Listeria monocytogenes in broth or in raw ground beef.
Lebensm.-Wiss. Technol., 1989, **22**, 387-390.

165 - EL-SHENAWY M.A., H.S. GARCIA, E.H. MARTH.
Inhibition and inactivation of Listeria monocytogenes by the lactoperoxidase system in raw milk, buffer or a semisynthetic medium.
Milchwissenschaft, 1990, **45** (10), 638-641.

166 - EL-SHENAWY M.A., E.H. MARTH.
Behavior of Listeria monocytogenes in the presence of gluconic acid and during preparation of cottage cheese curd using gluconic acid.
J. Dairy Sci., 1990, **73** (6), 1429-1438.

167 - EL-SHENAWY M.A., E.H. MARTH.
Organic acids enhance the antilisterial activity of potassium sorbate.
J. Food Prot., 1991, **54** (8), 593-597.

168 - EL-SHENAWY M.A., E.H. MARTH.
Behavior of Listeria monocytogenes in the presence of sodium propionate together with food acids.
J. Food Prot., 1992, **55** (4), 241-245.

169 - EMOND E., I. FLISS, S. PANDIAN.
A ribosomal DNA fragment of Listeria monocytogenes and its use as a genus-specific probe in an aqueous-phase hybridization assay.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (8), 2690-2697.

170 - ESPAZE E.P.
Diagnostic bactériologique.
Impact Médecin. Les dossiers du praticien n° **176**. La listériose. 1992. Chapitre 3. 9-14.

171 - ESTELA L.A., J.N. SOFOS.
Comparison of conventional and reversed phage typing procedures for identification of Listeria spp.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (2), 617-619.

172 - EVERT TING W.T., K.E. DEIBEL.
Sensitivity of Listeria monocytogenes to spices at two temperatures.
Journal of Food Safety, 1992, **12**, 129-137.

173 - FABIANI G., J. MARSOIN, F. CARTIER.
Recherche par coproculture des porteurs de Listeria chez les transplantés rénaux.
Méd. Mal. Infect.,1976, 6 suppl., 15-20.

174 - FACINELLI B.P., E. VARALDO, C. CASOLARI, U. FABIO.
Cross-infection with Listeria monocytogenes confirmed by DNA fingerprinting.
Lancet, 1988, **II**, 1247-1248.

175 - FACINELLI B., M.C. ROBERTS, E. GIOVANETTI, C. CHIARA, U. FABIO, P.E. VARALDO.
Genetic basis of tetracycline resistance in food-borne isolates of Listeria innocua.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (2), 614-616.

176 - FAIRCHILD T.M., P.M. FOEGEDING.
A proposed nonpathogenic biological indicator for thermal inactivation of Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (4), 1247-1250.

177 - FARBER J.M., G.W. SANDERS, J.I. SPIERS.
Monoclonal antibody directed against the flagella antigens of Listeria species and their use in EIA-based methods.
J. Food Protect., 1987, **50**, 479-484.

178 - FARBER J.M., G.W. SANDERS, J.I. SPIERS.
Methodology for isolation of Listeria from foods - A canadian perspective.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71** (3), 675-678.

179 - FARBER J.M., G.W. SANDERS, J.I. SPIERS, J.Y. D'AOUST, D.B. EMMONS, R. McKELLAR.
Thermal resistance of Listeria monocytogenes in inoculated and naturally contaminated raw milk.
Int. J. Food Microbiol., 1988, **7**, 277-286.

180 - FARBER J.M., G.W. SANDERS, M.A. JOHNSTON.
A survey of various foods for the presence of Listeria species.
J. Food Prot., 1989, **52**, 456-458.

181 - FARBER J.M., B.E. BROWN.
Effect of prior heat-shock on heat resistance of Listeria monocytogenes in meat.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (6), 1584-1587.

182 - FARRAG M.D.E.-D.H., K. SHAMSUZZAMAN, J. BORSA.
Radiation sensitivity of Listeria monocytogenes in phosphate buffer, trypticase soy broth and poultry feed.
J. Food Prot., 1990, **53**, 648-651.

183 - FARRAG S.A., E.H. MARTH.
Growth of Listeria monocytogenes in the presence of Pseudomonas fluorescens at 7 or 13 degrees C in skim milk.
J. Food Prot., 1989, **52**, 852-855.

184 - FATTAL E., J. ROJAS, M. YOUSSEF, P. COUVREUR, A. ANDREMONT.
Liposome-entrapped ampicillin in the treatment of experimental murine listeriosis and salmonellosis.
Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 1991, **35** (4), 770-772.

185 - FEINBERG A.P., B. VOGELSTEIN.
A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity.
Anal. Biochem., 1983, **132**, 6-13.

186 - FENLON D.R.
The influence of gaseous environment and water availability on the growth of Listeria.
Microbiol. Aliment. Nutr., 1989, **7** (2), 165-169.

187 - FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F., L. DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, J.A. VASQUEZ-BOLAND, J.L. BLANCO-CANCELO, G. SUAREZ-FERNANDEZ .
Listeria monocytogenes dans le lait pasteurisé.
Can. J. Microbiol., 1986, **32**, 149-150.

188 - FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F., L. DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, J.A. VASQUEZ-BOLAND, E.F.R. FERRI, V.B. DIESTE, J.L. BLANCO-CANCELO, G. SUAREZ-FERNANDEZ.
Survival of Listeria monocytogenes in raw milk treated in a pilot plant size pasteurizer.
J. Appl. Bacteriol., 1987, **63**, 533-537.

189 - FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F., C. DELGADO, M. BLANCO, J.A. VAZQUEZ-BOLAND, V. BRIONES, G. SUAREZ, L. DOMINGUEZ.
Role of potassium tellurite and brain heart infusion in expression of the hemolytic phenotype of Listeria spp. on agar plates.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (1), 434-438.

190 - FIEDLER F.
Biochemistry of the cell surface of Listeria strains : a locating general view.
Infection, 1988, **16** (Suppl. 2), 592-597.

191 - FISTROVICI E., D.L. COLLINS-THOMPSON.
Use of plasmid profiles and restriction endonucleases digest in environmental studies of Listeria monocytogenes from raw milk.
Int. J. Food Microbiol., 1990, **10** (1), 43-50.

192 - FITTER S., M. HEUZEN ROEDER, C.J. THOMAS.
A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of Listeria monocytogenes.
J. Appl. Bacteriol., 1992, **73**, 53-59.

193 - FLAMM R.K., D.J. HINRICHS, M.F. THOMASHOW.
Cloning of a gene encoding a major secreted polypeptide of Listeria monocytogenes and its potential use as a species-specific probe.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55**, 2251-2256.

194 - FLEMING D.W., S.L. COLCHI, K.L. Mc DONALD, J. BRONDOM, P.S. HAYES, B.D. PLIKAYTIS, M.B. HOLMES, A. AUDURIER, C.V. BROOME, A.L. REINGOLD.
Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis.
N. Engl. J. Med., 1985, **312**, 404-407.

195 - FLISS I., M.S. LAURENT, E. EMEND, R. LEMIEUX, R.E. SIMARD, A. ETTRIKI, S. PANDIAN.
Production and characterization of anti-DNA-RNA monoclonal antibodies and their application in Listeria detection.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (8), 2698-2705.

196 - FLUIT A.C., R. TORENSMA, M.J.C. VISSER, C.J.M. AARSMAN, M.J.J.G. POPPELIER, B.H.I. KELLER, P. KLAPWIJK, J. VERHOEF.
Detection of Listeria monocytogenes in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (5), 1289-1293.

197 - FOEGEDING P.M., A.B. THOMAS, D.H. PILKINGTON, T.R. KLAENHAMMER.
Enhanced control of Listeria monocytogenes by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (3), 884-890.

198 - FRANK J.F., R.A. KOFFI.
Surface-adherent growth of Listeria monocytogenes is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat.
J. Food Prot., 1990, **53**, 550-554.

199 - FRASER J.A., W.H. SPERBER.
Rapid detection of Listeria spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis.
J. Food Prot., 1988, **51**, 762-765.

200 - FREITAG N.E., P. YOUNGMAN, D.A. PORTNOY.
Transcriptional activation of the Listeria monocytogenes hemolysin gene in Bacillus subtilis.
J. Bacteriol., 1992, **174** (4), 1293-1298.

201 - FREITAG N.E., L. RONG, D.A. PORTNOY.
Regulation of the prfA transcriptional activator of Listeria monocytogenes : multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread.
Infect. Immun., 1993, **61** (6), 2537-2544.

202 - FUCHS R.S., P.K. SURENDRAN.
Incidence of Listeria monocytogenes in tropical fish and fishery products.
Lett. Appl. Microbiol., 1989, **9**, 49-51.

203 - FURRER B., U. CANDRIAN, C. HOEFELEIN, J. LUETHY.
Detection and identification of Listeria monocytogenes in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments.
J. Appl. Bacteriol., 1991, **70** (5), 372-379.

204 - FÜZI M., I. PILLIS.
Kiserletes Orvostudomany, 1970, **22**, 61.

205 - GAILLARD J.L., P. BERCHE, P. SANSONETTI.
Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of Listeria monocytogenes.
Infect. Immun., 1986, **52**, 50-55.

206 - GAILLARD J.L., P. BERCHE, J. MOUNIER, S. RICHARD, P. SANSONETTI.
In vitro model of penetration and intracellular growth of Listeria monocytogenes in the human enterocyte-like cell line Caco 2.
Infect. Immun.,1987, **55**, 2822-2829.

207 - GAILLARD J.L., P. BERCHE, C. FREHEL, E. GOUIN, P. COSSART.
Entry of L. monocytogenes into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci.
Cell, 1991, **65**, 1127-1141.

208 - GANDHI A.J., B. PERUSSIA, H. GOLDFINE.
Listeria monocytogenes phosphatidylinositol (PI)-specific phospholipase C has low activity on glycosyl-PI-anchored proteins.
Journal of Bacteriology, 1993, **175** (24), 8014-8017.

209 - GAYA P., M. MEDINA, M. MUNEZ.
Effect of the lactoperoxidase system on Listeria monocytogenes behavior in raw milk at refrigeration temperatures.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (11), 3355-3360.

210 - GENIGEORGIS C.A., D. DUTULESCU, J.F. GARAYZABAL.
Prevalence of Listeria spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level.
J. Food Prot., 1989, **52**, 618-624.

211 - GEOFFROY C., J.L. GAILLARD, J.E. ALOUF, P. BERCHE.
Purification, characterization and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin (listeriolysin O) from Listeria monocytogenes.
Infect. Immun., 1987, **55**, 1641-1646.

212 - GEOFFROY C., J.L. GAILLARD, J.E. ALOUF, P. BERCHE.
Production of thiol-dependant hemolysins by Listeria monocytogenes and related species.
J. Gen. Microbiol., 1989, **135**, 481-487.

213 - GEOFFROY C., J. MENGAUD, J.E. ALOUF, P. COSSART.
Alveolysin, the thiol-activated toxin of Bacillus alvei, is homologous to listeriolysin O, perfringolysin O, pneumolysin and streptolysin and contain a single cysteine.
J. Bacteriol., 1990, **172**, 7301-7305.

214 - GERNER-SMIDT VIBEKE THAMDRUP ROSDAHL P., W. FREDERIKSEN.
A new Danish Listeria monocytogenes phage typing system.
APMIS, 1993, **101**, 160-167.

215 - GILL C.O., M.P. REICHEL.
Growth of the cold-tolerant pathogens Yersinia enterocolitica, Aeromonas hydrophila and Listeria monocytogenes on high pH-beef packaged under vacuum or carbon dioxide.
Food Microbiol., 1989, **6**, 223-230.

216 - GIRARD K.F., A.J. SBARRA, W.A. BARDAWIL.
Serology of Listeria monocytogenes. I. Characteristics of the soluble haemolysin.
J. Bacteriol., 1963, **85**, 349-355.

217 - GLASS K.A., M.P. DOYLE.
Fate and thermal inactivation of Listeria monocytogenes in beaker sausage and pepperoni.
J. Food Prot., 1989, **52**, 226-231.

218 - GLASS K.A., M.P. DOYLE.
Listeria monocytogenes in processed meat products during refrigerated storage.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55**, 1565-1569.

219 - GOBAT P.F., T. JEMMI.
Epidemiological studies on Listeria spp. in slaughterhouses.
Fleischwirtschaft, 1990, **70**, 241-244.

220 - GOEBEL W., M. LEIMEISTER-WACHTER, M. KUHN, E. DOMANN, T. CHAKRABORTY, S. KOHLER, A. BUBERT, M. WUENSCHER, Z. SOKOLOVIC.
Listeria monocytogenes - a model system for studying the pathomechanisms of an intracellular microorganism.
Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis., 1993, **278** (2-3), 334-347.

221 - GOLDEN D.A., L.R. BEUCHAT, R.E. BRACKETT.
Direct plating technique for enumeration of Listeria monocytogenes in foods.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71** (3), 647-650.

222 - GOLDEN D.A., L.R. BEUCHAT, R.E. BRACKETT.
Evaluation of selective direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured and freeze-injured Listeria monocytogenes from foods.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54** (6), 1451-1456.

223 - GOLDFINE H., C. KNOB.
Purification and characterization of Listeria monocytogenes phosphatidylinositol-specific phospholipase C.
Infect. Immun., 1992, **60**, 4059-4067.

224 - GOLDFINE H., N.C. JOHNSTON, C. KNOB.
Nonspecific phospholipase C of Listeria monocytogenes : activity on phospholipids in Triton X-100-mixed micelles and in biological membranes.
Journal of Bacteriology, 1993, **175** (14), 4298-4306.

225 - GOLSTEYN THOMAS E.J., R.B. KING, J. BURCHAK, V.P.J.GANNON.
Sensitive and specific detection of Listeria monocytogenes in milk and ground beef with the polymerase chain reaction.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (9), 2576-2580.

226 - GORET P., J. OUDAR.
Les listérioses animales : fréquence et incidence éventuelles chez l'homme.
Rev. Path. Comp., 1965, **2**, 602-626.

227 - GOUET P., J.A. LABADIE, C. SERRATORE.
Development of Listeria monocytogenes in monoxenic and polyxenic beef minces.
Zentralbl. Bakteriol. Hyg. 1. Abt. Orig. B, 1978, **B 166**, 87-94.

228 - GOULET V., J.L. LEONARD, J. LELERS.
Epidémiologie de la listériose humaine en France : étude des données des laboratoires de microbiologie recueillies en 1984.
In : Listériose, Listeria, Listeriosis 1985-1986. Comptes-rendus du 9° Symposium International sur les problèmes de listérioses, Nantes, France, 17-20 Septembre, 1985. Editeur : Université de Nantes, Nantes, 372-377.

229 - GOULET V., S. BROHIER.
Listeriosis in France in 1986 : case study made by hospital microbiologists.
Pathol. Biol., 1989, **37**, 206-211.

230 - GOULET V., A. LEPOUTRE, J. ROCOURT, A.L. COURTIEU, P. DE HAUMONT, P. VEIT.
Epidémie de listériose en France : bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique.
Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 1993, **4**.

231 - GOUT J.P., C. ALLIBEU, M. MICOUD.
Participation rénale au cours des listérioses neuro-méningées avec présence d'immuns complexes circulants.
Méd. Mal. Infect., 1978, **8** (5), 235-239.

232 - GRAU F.H., P.B. VANDERLINDE.
Growth of Listeria monocytogenes on vacuum packaged beef.
In : Proceedings of the 34th International Congress of Meat Science and Technology, Part B, Brisbane, Australie, 1988, 518-519.

233 - GRAVES L.M., B. SWAMINATHAN, M.W. REEVES, J. WENGER.
Ribosomal DNA fingerprinting of Listeria monocytogenes using a digoxigenin-labeled DNA probe.
Eur. J. Epidemiol., 1991, **7** (1), 77-82.

234 - GRAY M.L., A.H. KILLINGER.
Listeria monocytogenes and listeric infections.
Bacteriol. Rev., 1966, **30**, 309-382.

235 - GRIMONT F., P.A.D. GRIMONT.
Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools.
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 1986, **137 B**, 165-175.

236 - GROUPE DE TRAVAIL DE L'OMS.
Les listérioses d'origine alimentaire.
Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, 1989, **67** (1), 19-26.

237 - GUTEKUNST K.A., B.P. HOLLOWAY, G.M. CARLONE.
DNA sequence heterogeneity in the gene encoding a 60-kilodalton extracellular protein of Listeria monocytogenes and other Listeria species.
Can. J. Microbiol., 1992, **38** (8), 865-870.

238 - GUYER S., T. JEMMI.
Behavior of Listeria monocytogenes during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (5), 1523-1527.

239 - HAO D.Y.-Y., L.R. BEUCHAT, R.E. BRACKETT.
Comparison of media and methods for detecting and enumerating Listeria monocytogenes in refrigerated cabbage.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, **53** (5), 955-957.

240 - HAMON Y., Y. PERON.
Etude du pouvoir bactériocinogène dans le genre Listeria. II. Individualisation et classification des bactériocines en cause.
Ann. Inst. Pasteur, 1963, **104**, 55-65.

241 - HANY O.E., R. SIDDIGI, M.A. KHAN.
Growth response of Listeria monocytogenes NCTC 7973 in two different media at four incubation temperatures.
Ann. Acad. Med. Singapore, 1993, **22** (3), 300-302.

242 - HARDIE R., W. ROBERTS.
Adult listeriosis presenting as acute hepatitis.
J. Infect., 1984, **8**, 256-258.

243 - HARMAYANI E., J.N. SOFOS, G.R. SCHMIDT.
Fate of Listeria monocytogenes in raw and cooked ground beef with meat processing additives.
Int. J. Food Microbiol., 1993, **18** (3), 223-232.

244 - HARRIS L.J., M.A. DAESCHEL, M.E. STILES, T.R. KLAENHAMMER.
Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes.
J. Food Prot., 1989, **52**, 384-387.

245 - HARRIS L.J., H.P. FLEMING, T.R. KLAENHAMMER.
Sensitivity and resistance of Listeria monocytogenes ATCC 19115, Scott A and UAL 500 to nisin.
J. Food Prot., 1991, **54** (11), 836-840.

246 - HARRIS L.J., J. HUMBER.
AutoMicrobic system for biochemical identification of Listeria species isolated from foods : collaborative study.
Journal Of AOAC International, 1993, **76** (4), 822-830.

247 - HARRISON M.A., S.L. CARPENTER.
Survival of Listeria monocytogenes on microwave cooked poultry.
Food Microbiol., 1989, **6**, 153-157.

248 - HART C.D., G.C. MEAD, A.P. NORRIS.
Effects of gaseous environment and temperature on the storage behavior of Listeria monocytogenes on chicken breast meat.
Journal of Applied Bacteriology, 1991, **70**, 40-46.

249 - HARTFORD T., P.H.A. SNEATH.
Optical DNA-DNA homology in the genus Listeria.
International Journal of Systematic Bacteriology, 1993, **43** (1), 26-31.

250 - HARVEY M.H., C.J. STRACHAN, B.T. THOM.
Listeria monocytogenes : a rare cause of mycotic aortic aneuvrysm.
Br. J. Surg., 1984, **71** (2), 166-167.

251 - HASHISAKA A.E., S.D. WEAGANT, F.M. DONG.
Survival of Listeria monocytogenes in mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma irradiation.
J. Food Prot., 1989, **52**, 490-492.

252 - HASTINGS J. W., M. SAILER, K. JOHNSON, K.L. ROY, J.C. VEDERAS, M.E. STILES.
Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from Leuconostoc gelidum.
J. Bacteriol., 1991, **173**, 7491-7500.

253 - HASTINGS J. W., M.E. STILES.
Antibiosis of Leuconostoc gelidum isolated from meat.
Journal of Applied Bacteriology, 1991, **70** (2), 127-134.

254 - HAY J.M., J. PAILLOT, C. MANUEL, Y. FLAMANT, J.N. MAILLARD.
Ulcères aigus duodénaux compliqués au cours des méningites à Listeria.
Nouv. Presse Méd., 1978, **7** (16), 1363-1368.

255 - HAYES P.S., J.C. FEELEY, L.M. GRAVES, G.W. AJELLO, D.W. FLEMING.
Isolation of Listeria monocytogenes from raw milk.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, **51** (2), 438-440.

256 - HAYES P.S., L.W. GRAVES, G.W. AJELLO, B. SWAMINATHAN, R.E. WEAVER, J.D. WENGER, A. SCHUCHAT, C.V. BROOME, The Listeria Study Groups.
Comparison of cold enrichment and U.S. Department of Agriculture methods for isolating Listeria monocytogenes from naturally contaminated foods.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (8), 2109-2113.

257 - HECHARD Y., B. DERIJARD, F. LETELLIER, Y. CENATIEMPO.
Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from Leuconostoc mesenteroides.
J. Gen. Microbiol., 1992, **138** (Pt 12), 2725-2731.

258 - HEISICK J.E., D.E.WAGNER, M.L. NIERMAN, J.T. PEELER.
Listeria spp. found on fresh market produce.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55**, 1925-1927.

259 - HELSEL L., S. JOHNSON, W. DEWITT, W. BIBB.
Characterization of monoclonal antibodies to the hemolysin of Listeria monocytogenes and use of the antibodies in affinity purification of the protein.
Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Abstr. 1, p. 54). American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1990.

260 - HENDERSON J.T., A.L. CHOPKO, P.D. VAN WASSENAAR.
Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by Pediococcus acidilactici PAC 1.0.
Arch. Biochem. Biophys., 1992, **295**, 1-8.

261 - HENRY B.S.
Dissociation in the genus Brucella.
J. Infect. Dis., 1933, **52**, 374-402.

262 - HIGGINS D.L., B.J. ROBISON.
Comparison of MICRO-ID Listeria method with conventional biochemical methods for identification of Listeria isolated from food and environmental samples : collaborative study.
Journal Of AOAC International, 1993, **76** (4), 831-838.

263 - HOF H., P. EMMERLING.
Murine model for therapy of listeriosis in the compromised host. III. The effect of rifampicin.
Chemotherapy, 1984, **30**, 125-130.

264 - HOF H.
The effect of coumermycin on experimental listeriosis.
J. Infect., 1986, **13**, 17-23.

265 - HOLCK A., L. AXELSSON, S.E. BIRKELAND, T. AUKRUST, H. BLOM.
Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from Lactobacillus sake Lb706.
J. Gen. Microbiol., 1992, **138** (Pt 12), 2715-2720.

266 - HOLLYWOOD N.W., Y. VARABIOFF, G.E. MITCHELL.
The effect of microwave and conventional cooking on the temperature profiles and microbial of minced beef.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **14** (1), 67-75.

267 - HOLMSTROM K., L. ROSSEN, O.F. RASMUSSEN.
A highly sensitive and fast nonradioactive method for detection of polymerase chain reaction products.
Analytical Biochemistry, 1993, **209**, 278-283.

268 - HOLOSCHITZ J., M. SCHNEIDER, A. YARETZKY, J. BERNHEIM, A. KLAJMAN.
Listeria monocytogenes pericarditis in a chronically hemodialysed patient.
Am. J. Med. Sci., 1984, **288** (1), 34-37.

269 - HOOVER D.G., K.J. DISHART, M.A. HERMES.
Antagonistic effect of Pediococcus spp. against Listeria monocytogenes.
Food Biotechnol., 1989, **3**, 183-196.

270 - HOWARD P.J., K.D. HARSONO, J.B. LUCHANSKY.
Differenciation of Listeria monocytogenes, Listeria innocua, Listeria ivanovii, and Listeria seeligeri by pulsed-field gel electrophoresis.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (2), 709-712.

271 - HUDSON J.A.
Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of Listeria monocytogenes.
Lett. Appl. Microbiol., 1992, **14** (4), 178-184.

272 - HUGHEY V.L., P.A. WILGER, E.A. JOHNSON.
Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against Listeria monocytogenes Scott A in foods.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55** (3), 631-638.

273 - HUHTANEN C.N., R.K.JENKINS, D.W. THAYER.
Gamma radiation sensibility of Listeria monocytogenes.
J. Food Prot., 1989, **52**, 610-613.

274 - HUMBERT G., J. AUBERTIN.
Listérioses.
Conc. Méd., 1975, **27** (12), 94-96.

275 - HUMBERT G., C. DUVAL, C. FESSARD, M. MENNIER, A. LEDOUX.
Les listérioses en France. Résultats d'une enquête nationale (824 cas).
Méd. Mal. Infect., 1976, **6**, 60-70.

276 - HURST A.
Nisin.
Adv. Appl. Microbiol., 1991, **27**, 85-123.

277 - JACQUET C., S. AUBERT, N. El SOHL, J. ROCOURT.
Use of rRNA gene restriction patterns for the identification of Listeria species.
Syst. Appl. Microbiol., 1992, **15**, 42-46.

278 - JACQUET C., J. BILLE, J. ROCOURT.
Typing of Listeria monocytogenes by restriction polymorphism of the ribosomal ribonucleic acid gene region.
Zbl. Bakt., 1992, **276**, 356-365.

279 - JASINSKA S.
Bacteriophages of lysogenic strains of Listeria monocytogenes.
Acta Microbiol. Pol., 1964, **13**, 29-44.

280 - JEAN D., J. CROIZE, P. HIRTZ, C. LEGEAIS, I. PELLOUX, M. FAVIER, M.R. MALLARET, P. LE NOC, P. RAMBAUD.
Infection nosocomiale à Listeria monocytogenes en maternité.
Arch. Fr. Pédiatr., 1991, **48**, 419-422.

281 - JEMMI T.
Actual knowledge of Listeria monocytogenes in meat and fish products.
Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg., 1990, **31**, 144-157.

282 - JEMMI T., A. KEUSCH.
Behavior of Listeria monocytogenes during processing and storage of experimentally contaminated hot-smoked trout.
International Journal of Food Microbiology, 1992, **15**, 339-346.

283 - JENKINS E.M., A.N. NJOKU-OBI, E.W. ADAMS.
Purification of the soluble hemolysins of Listeria monocytogenes.
J. Bacteriol.,1964, **88**, 418-424.

284 - JENKINS E.M., B.B. WATSON.
Extracellular antigens from Listeria monocytogenes. I. Purification and resolution of hemolytic and lipolytic antigens from culture filtrates of Listeria monocytogenes.
Infect. Immun., 1971, **3**, 589-594.

285 - JENSEN M.A., J.A. WEBSTER, N. STRAUS.
Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (4), 945-952.

286 - JOHNSON J.L., M.P. DOYLE, R.G. CASSENS.
Survival of listeria monocytogenes in ground beef.
Int. J. Food Microbiol., 1988, **6**, 243-247.

287 - JOHNSON J.L., M.P. DOYLE, R.G. CASSENS, J.L. SCHOENI.
Fate of Listeria monocytogenes in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54** (2), 497-501.

288 - JOHNSON J.L., M.P. DOYLE, R.G. CASSENS.
Incidence of Listeria spp. in retail meat roasts.
J. Food Sci., 1990, **55**, 572-574.

289 - JUNG D.S., F.W. BODYFELT, M.A. DAESCHEL.
Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting Listeria monocytogenes in fluid milk.
J. Dairy Sci., 1992, **75** (2), 387-393.

290 - JUNTTILA J., J. HIRN, P. HILL, E. NURMI.
Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of Listeria monocytogenes during manufacture of fermented sausage.
J. Food Protect., 1989, **52**, 151-153.

291 - KAHN M.A., A. SEAMANT, M. WOODBINE.
Listeria monocytogenes haemolysin : lecithinase.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1972, **19**, 341-352.

292 - KAMAU D.N., S. DOORES, K.M. PRUITT.
Antibacterial activity of the lactoperoxydase system against Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in milk.
J. Food Prot., 1990, **53** (12), 1010-1014.

293 - KAMAU D.N., S. DOORES, K.M. PRUITT.
Enhanced thermal destruction of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus by the lactoperoxidase system.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (9), 2711-2716.

294 - KAMPELMACHER E.H., L.M. VAN NOORLE JANSEN.
Isolation of Listeria monocytogenes from faeces of clinically healthy humans and animals.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 1969, **211**, 353-359.

295 - KARUNASAGAR I., G. KROHNE, W. GOEBEL.
Listeria ivanovii is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization.
Infect. Immun., 1993, **61** (1), 162-169.

296 - KATHARIOU S., P. METZ, H. HOF, W. GOEBEL.
Tn 916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of Listeria monocytogenes.
J. Bacteriol., 1987, **169**, 1291-1297.

297 - KAWALER B., H. HOF.
Failure of cephalosporins to cure experimental listeriosis.
J. Infection, 1984, **9**, 239-243.

298 - KEELER R.F., M.L. GRAY.
Antigenic and related biochemical properties of Listeria monocytogenes. I. Preparation and composition of cell wall material.
J. Bacteriol., 1960, **80**, 683-695.

299 - KEER K.G., N.A. ROTOWA, P.M. HAWKEY, R.W. LACEY.
Evaluation of the Mast ID ant API 50CH systems for identification of Listeria spp.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (3), 657-660.

300 - KIM C., L.M. GRAVES, B. SWAMINATHAN, L.W. MAYER, R.E. WEAVER.
Evaluation of hybridization characteristics of a cloned pRF 106 probe for Listeria monocytogenes detection and development of a nonisotopic colony hybridization assay.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (1), 289-294.

301 - KIM C., B. SWAMINATHAN, P.K. CASSIDAY, L.W. MAYER, B.P. HOLLOWAY.
Rapid confirmation of Listeria monocytogenes isolated from foods by a colony blot assay using a digoxigenin-labeled synthetic oligonucleotide probe.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (6), 1609-1614.

302 - KING W., S. RAPOSA, J. WARSHAW, A. JOHNSON, D. HALBERT, J.D. KLINGER.
A new colorimetric nucleic acid hybridization assay for Listeria in foods.
Int. J. Food Microbiol., 1989, **8**, 225-232.

303 - KING W., S.M. RAPOSA, J.E. WARSHAW, A.R. JOHNSON, D. LANE, J.D. KLINGER, D.N. HALBERT.
A colorimetric assay for the detection of Listeria using nucleic acid probes.
In A.J. MILLER, J.L. SMITH, and G.A. SOMKUTI (ed.), Foodborne listeriosis. Society for Industrial Microbiology. Elsevier Science Publishing, Inc., New York, 1990, 117-124.

304 - KLARSFELD A.
Enquête ; Voyage en Listériose.
Journal International de Médecine (JIM), 1992, **245**, 41-45.

305 - KLINGER J. D., A.R. JOHNSON.
A rapid nucleic hybridization assay for Listeria in foods.
Food Technol., 1988, **42**, 66-70.

306 - KLINGER J. D., A. JOHNSON, D. CROAN, P. ELYNN, K. WHIPPIE, M. KIMBALL, J. LAWRIE, M. CURIALE.
Comparative studies of nucleic acid hybridization assay for Listeria monocytogenes in foods.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71** (3), 669-673.

307 - KNABEL S.J., H.W. WALKER, P.A. HARTMAN, A.F. MENDONCA.
Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of Listeria monocytogenes during pasteurization.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (2), 370-376.

308 - KNIGTH M.T., J.F. BLACK, D.W. WOOD.
Industry perspectives on Listeria monocytogenes.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71** (3), 682-683.

309 - KOCKS C., E. GOUIN, M. TABOURET, P. BERCHE, H. OHAYON, P. COSSART.
Listeria monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein.
Cell, 1992, **68**, 521-531.

310 - KÖHLER S., M. LEIMEISTER-WACHTER, T. CHAKRABORTY, F. LOTISPEICH, W. GOEBEL.
The gene coding for protein p60 of Listeria monocytogenes and its use as a specific probe for Listeria monocytogenes.
Infect. Immun., 1990, **58**, 1943-1950.

311 - KÖHLER S., A. BUBERT, M. VOGEL, W. GOEBEL.
Expression of the iap gene coding for protein p60 of Listeria monocytogenes is controlled on the posttranscriptional level.
J. Bacteriol., 1991, **173**, 4668-4676.

312 - KOLSTAD J., L.M. RORVIK, P.E. GRANUM.
Characterization of plasmids from Listeria sp.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **12** (2-3), 123-131.

313 - KOLSTAD J., D.A. CAUGANT, L.M. RORVIK.
Differenciation of Listeria monocytogenes isolates by using plasmid profiling and multilocus enzyme electrophoresis.
Int. J. Food Microbiol., 1992, **16** (3), 247-260.

314 - KOVINCIC I., I.F. VUJICIC, M. SUABIC-VLAHOVIC, M. VULIC, M. GAGIC, I.V. WESLEY.
Survival of Listeria monocytogenes during the manufacture and ripening of Trappist cheese.
J. Food Prot., 1991, **54** (6), 418-420.

315 - KUBASIAK M.
La listériose, acquisitions récentes et contribution à l'étude épidémiologique.
Thèse Méd., Tours, 1271, N°**16**.

316 - KUHN M., S. KATHARIOU, W. GOEBEL.
Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium Listeria monocytogenes.
Infect. Immun., 1988, **56**, 79-82.

317 - LACHICA R.V.
Selective plating medium for quantitative recovery of food-borne Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (1), 167-169.

318 - LACHICA R.V.
Simplified Henry technique for initial recognition of Listeria colonies.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (4), 1164-1165.

319 - LACHICA R.V.
Same-day identification scheme for colonies of Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (4), 1166-1168.

320 - LAI E., B.W. BIRREN, S.M. CLARK, M.I. SIMON, L. HOOD.
Pulsed field gel electrophoresis.
BioTechniques, 1989, **7**, 34-42.

321 - LAMOTHE M., B. SIMMONS, M. GELFAND, P. SCHOETTLE, E. OWEN.
Listeria monocytogenes causing endovascular infection.
Southern Medical Journal, 1992, **85** (2), 193-195.

322 - LAPEYSSONNIE L.
Listeria et listérioses. Données récentes de biologie et d'épidémiologie.
In : "Biologie Médicale", Volume XLVIII. 57° année. N° **2** Mars-Avril 1959.

323 - LAUGIER J., J.C. BORDERON, A. CHANTEPIE.
Méningite du nouveau-né à Listeria monocytogenes et contamination en maternité.
Arch. Franç. Pédiatr., 1978, **35**, 168-171.

324 - LAWRENCE L.M., J. HARVEY, A. GILMOUR.
Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (9), 3117-3119.

325 - LEASOR S.B., P.M. FOEGEDING.
Listeria spp. in commercially broken raw liquid whole egg.
J. Food Prot., 1989, **52**, 777-780.

326 - LEBEK G., P. TEYSSEIRE, A. BAUMGARTNER.
A method for typing Listeria monocytogenes strains by classification of listeriocins and phage receptors.
Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis., 1993, **278** (1), 58-68.

327 - LEBLON D., M. FRANCILLARD, J.L. GAILLARD, P. BERCHE.
Loss of catalase activity in Tn 1545-induced mutants does not reduce growth of Listeria monocytogenes in vivo.
Infect. Immun., 1989, **57**, 2569-2573.

328 - LEBRUN M., J. LOULERGUE, E. CHASLUS-DANCLA, A. AUDURIER.
Plasmids in Listeria monocytogenes in relation to cadmium resistance.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (9), 3183-3186.

329 - LECHTENGERG R., M.F. SIERRA, G.F. PRINGLE, W.A. SHUCART, K.M. BUTT.
Listeria monocytogenes : brain abcess or meningo-encephalitis?
Neurology (USA), 1979, **29** (1), 86-90.

330 - LEE S.H., J.F. FRANK.
Effect of growth temperature and media on inactivation of Listeria monocytogenes by chlorine.
J. Food Saf., 1991, **11** (2), 65-71.

331 - LEE W.H., D. Mc CLAIN.
Improved Listeria monocytogenes selective agar.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, **52**, 1215-1217.

332 - LEIMEISTER-WÄCHTER M., T. CHAKRABORTY.
Detection of listeriolysin O, the thiol-dependant hemolysin in Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii, and Listeria seeligeri.
Infect. Immun., 1989, **57**, 2350-2357.

333 - LEIMEISTER-WÄCHTER M., C. HAFFNER, E. DOMANN, W. GOEBEL, T. CHAKRABORTY.
Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of Listeria monocytogenes.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1990, **87**, 8336-8340.

334 - LEIMEISTER-WÄCHTER M., E. DOMANN, T. CHAKRABORTY.
Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is coordinately expressed with listeriolysin in Listeria monocytogenes.
Mol. Microbiol., 1991, **5**, 361-366.

335 - LEIMEISTER-WÄCHTER M., E. DOMANN, T. CHAKRABORTY.
The expression of virulence genes in Listeria monocytogenes is thermoregulated.
J. Bacteriol., 1992, **174** (3), 947-952.

336 - LE MINOR L., M. VERON.
Bactériologie médicale. PARIS. Flammarion Médecine Sciences. 1982. XII. 773 p.

337 - LENNON D., L. BRUCE, C. MANTELL, D. BECROFT, B. DOVE, K. FARMER, S. TONKIN, N. YEATES, R. STAMP, K. MICKLESON.
Epidemic perinatal listeriosis.
Pediatr. Infect. Dis., 1984, **3** (1), 30-34.

338 - LEW A.E., P.M. DESMARCHELIER.
Restriction fragment length polymorphism analysis of Listeria monocytogenes and its application to epidemiological investigations.
Int. J. Food Microbiol., 1992, **15** (3-4), 347-356.

339 - LEWIS S.J., J.E. CORRY.
Survey of the incidence of Listeria monocytogenes and other Listeria spp. in experimentally irradiated and in matched unirradiated raw chickens.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **12** (2-3), 257-262.

340 - LEWUS C.B., A. KAISER, T.J. MONTVILLE.
Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (6), 1683-1688.

341 - Listeria monocytogenes : Recommandations by The "National Advisory Committee" on Microbiological Criteria for foods.
Int. J. Food Microbiol. (NLD), 1991, **14** (3-4), 185-246.

342 - LOESSNER M.J., R.H. BELL, J.M. JAY, L.A. SHELEF.
Comparison of seven plating media for enumeration of Listeria spp.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54** (12), 3003-3007.

343 - LOESSNER M.J., M. BUSSE.
Bacteriophage typing of Listeria species.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56**, 1912-1918.

344 - LOESSNER M.J.
Improved procedure for bacteriophage typing of Listeria strains and evaluation of new phages.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (3), 882-884.

345 - LOESSNER M.J., S. GOEPPLE, M. BUSSE.
Comparative inductibility of bacteriophage in naturally lysogenic and lysogenized strains of Listeria spp. by UV ligth and mitomycin C.
Lett. Appl. Microbiol., 1991, **12** (5), 196-199.

346 - LOPEZ A., R. BILDFELL.
Neonatal porcine listeriosis.
Canadian Veterinary Journal, 1985, **30**, 828-829.

347 - LOVETT J.
Listeria isolation, p. 29.01-29.09.
In Bacteriological analytical manual, 6th ed., Food and Drug Administration, Sept., 1987. Association of Analytical Chemists, Arlington, Va., 1987.

348 - LOVETT J., D.W. FRANCIS, J.M. HUNT.
Listeria monocytogenes in raw milk : detection, incidence and pathogenicity.
J. Food Prot., 1987, **50**, 188-192.

349 - LOVETT J.
Isolation and identification of Listeria monocytogenes in dairy products.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71**, 658-660.

350 - LOVETT J.
Listeria monocytogenes, p. 283-310.
In : M. DOYLE (ed.), Foodborne bacterial pathogens. Marcel DEKKER, Inc., New York. 1989.

351 - LOVETT J., D.W. FRANCIS, J.G. BRADSHAW.
Outgrowth of Listeria monocytogenes in foods.
In : A.J. MILLER, J.L. SMITH, G.A. SOMKUTI (ed). Foodborne listeriosis. Society for Industrial Microbiology. Elsevier Science Publishing. Inc., New York,1990,183-187.

352 - LUCHANSKY J.B., M.P. DOYLE.
Behavior and control of Listeria monocytogenes in meats.
Comptes-rendus de la Conférence Internationale : Listeria et Sécurité Alimentaires, Laval, France, 13-14 Juin 1991. ASEPT Editeur, Laval, 105-114.

353 - LUND B.M., M.R. KNOW, M.B. COLE.
Destruction of Listeria monocytogenes during microwave cooking.
Lancet, 1989, **333**, 218.

354 - Mc BRIDE M.E., K.F. GIRARD.
A selective medium for the isolation of Listeria monocytogenes from mixed bacterial populations.
J. Lab. Clin. Mes., 1960, **55**, 153-157.

355 - Mc CARTHY S.A., M.L. MOTES, R.M. Mc PHEARSON.
Recovery of heat-stressed Listeria monocytogenes from experimentally and naturally contaminated shrimp.
J. Food Prot., 1990, **53**, 22-25.

356 - Mc CARTHY S.A.
Pathogenicity of nonstressed, heat-stressed, and resuscitated Listeria monocytogenes 1A1 cells.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (8), 2389-2391.

357 - Mc CLAIN D., W.H. LEE.
Development of USDA-FSIS method for isolation of Listeria monocytogenes from raw meat and poultry.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71**, 660-664.

358 - Mc CLAIN D., W.H. LEE.
FSIS method for the isolation and identification of Listeria monocytogenes from processed meat and poultry products.
Laboratory Communication n° **57**, revised 24 May 1989. U.S. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service, Beltsville, Md.

359 - Mc CLURE P.J., T.M. KELLY, T.A. ROBERTS.
Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of Listeria monocytogenes on gradient plates and in liquid medium.
Lett. Appl. Microbiol., 1989, **9** (3), 95-99.

360 - Mc CLURE P.J., T.M. KELLY, T.A. ROBERTS.
The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of Listeria monocytogenes.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **14** (1), 77-91.

361 - Mc CUE M.J., E.E. MORRE.
Myocarditis with microabcess formation caused by Listeria monocytogenes associate with myocardial infarct.
Hum. Pathol., 1979, **10** (4), 469-472.

362 - MacGOWAN A.P., K. O'DONAGHUE, S. NICHOLLS, J. McLAUCHLIN, P.M. BENNET, D.S. REEVES.
Typing of Listeria spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis.
J. Med. Microbiol., 1993, **38** (5), 322-327.

363 - MACKANESS G.B.
Cellular resistance to infection.
J. Exp. Med.,1962, **166**, 381-406.

364 - Mc KAY A.M.
Antimicrobial activity of Enterococcus faecium against Listeria sp.
Lett. Appl. Microbiol., 1990, **11** (1), 15-17.

365 - Mc KEE R.A., C.M. GOODING, S.D. GARRETT, H.A. POWELL, B.M. LUND, M. KNOX.
DNA probes and the detection of food-borne pathogens using the polymerase chain reaction.
Biochemical Society Transactions. Food Biotechnology, 1991, **19**, 698-701.

366 - McKELLAR R.C.

Effect of reduced pH on secretion, stability and activity of Listeria monocytogenes listeriolysin O.

J. Food Safety, 1992, **12**, 283-293.

367 - McKELLAR R.C.

Novel mechanism for the CAMP reaction between Listeria monocytogenes and Corynebacterium equi.

Int. J. Food Microbiol., 1993, **18** (1), 77-82.

368 - MACKEY B.M., C.M. DERRICK.

Elevation of the heat resistance of Salmonella typhimurium by sublethal heat shock.

J. Appl. Bacteriol., 1986, **61**, 389-393.

369 - MACKEY B.M., N. BRATCHELL.

The heat resistance of Listeria monocytogenes.

Lett. Appl. Microbiol., 1989, **9**, 89-94.

370 - Mc LAUCHLIN J., A. AUDURIER, A.G. TAYLOR.

The evaluation of a phage typing systems for Listeria monocytogenes for use in epidemiological studies.

J. Med. Microbiol., 1986, **22**, 357-365.

371 - Mc LAUCHLIN J., A. AUDURIER, A.G. TAYLOR.

Aspects of the epidemiology of human Listeria monocytogenes infections in the U.K. 1967-1984. The use of serotyping and phage typing.

J. Med. Microbiol., 1986, **22**, 367-377.

372 - Mc LAUCHLIN J., P.N. PINI.

The rapid demonstration and presumptive identification of Listeria monocytogenes in food using monoclonal antibody in a direct immunofluorescence test (DIFT).

Letters in Applied Microbiology, 1988, **8**, 25-27.

373 - MAFTAH A., D. RENAULT, C. VIGNOLES, Y. HECHARD, P. BRESSOLLIER, M.H. RATINAUD, Y. CENATIEMPO, R. JULIEN.
Membrane permeabilization of Listeria monocytogenes and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105.
J. Bacteriol., 1993, **175** (10), 3232-3235.

374 - MAFU A.A., D. ROY, J. GOULET, P. MAGNY.
Attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times.
J. Food Prot., 1990, **53** (9), 742-746.

375 - MAFU A.A., D. ROY, L. SAVOIE, J. GOULET.
Bioluminescence assay for estimating the hydrophobic properties of bacteria as revealed by hydrophobic interaction chromatography.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (6), 1640-1643.

376 - MAFU A.A., D. ROY, J. GOULET, L. SAVOIE.
Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of Listeria monocytogenes to surfaces.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (7), 1969-1973.

377 - MAISNIER-PATINS S., N. DESCHAMPS, S.R. TATINI, J. RICHARD.
Inhibition of Listeria monocytogenes in Camembert cheese made with a nisin-producing starter.
Lait, 1992, **72** (3), 249-263.

378 - MARA M., F. PATOCKA, K. JULA.
Contribution of knowledge of factors participating in virulence of Listeria monocytogenes study of the chemical nature of complex Ei.
J. Hyg. Epidem. (Praha), 1974, **18**, 29-41.

379 - MARA M., K. NOUZA, C. JOHN, J. PRUCHOVA, J. OCENASKOVA, H. SESTAKOVA, J. HRIBALOVA, E. MENCIKOVA.
The immunological properties of listerial complex Ei.
Acta Microbiologica Hungarica, 1989, **36** (2-3), 345-351.

380 - MARSHALL D.L., R.H. SCHMIDT.
Growth of Listeria monocytogenes at 10°C in milk preincubated with selected Pseudomonas.
J. Food Prot., 1988, **51**, 277-282.

381 - MARTIN A., S.E. KATZ.
Rapid determination of Listeria monocytogenes in foods using a resuscitation / selection / kit system detection.
J. AOAC. Int., 1993, **76** (3), 632-636.

382 - MARTIN S.E., R.S. FLOWERS, Z.J. ORDAL.
Catalase : its effect on microbial enumeration.
Appl. Environ. Microbiol., 1976, **32**, 731-734.

383 - MATAR G.M., W.F. BIBB, L. HELSEL, W. DEWITT, B. SWAMINATHAN.
Immunoaffinity purification, stabilization and comparative characterization of listeriolysin O from Listeria monocytogenes serotype 1/2a and 4b.
Res. Microbiol., 1992, **143**, 489-498.

384 - MATTILA-SANDHOLM T., A. HAIKARA, E. SKYTTA.
The effect of Pediococcus damnosus and Pediococcus pentosaceus on the growth of pathogens in minced meat.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **13** (1), 87-94.

385 - MATTINGLY J.A., B.T. BUTMAN, M.C. PLANK, R.J. DURHAM, B.J. ROBISON.
Rapid Monoclonal Antibody-Based Enzyme Linked Immunosorbent assay for detection of Listeria monocytogenes in food products.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71** (3), 679-681.

386 - MAUPAS P., A. PHILIPPON, A. AUDURIER, E. BORDERON, P. BOUCARD.
Epidémiologie et pathogénie des listérioses.
Sem. des Hôp., 1971, **47** (43-44), 2475-2480.

387 - MAZURIER S.I., K. WERNARS.
Typing of Listeria monocytogenes strains by random amplification of polymorphic DNA.
Res. Microbiol., 1992, **143**, 499-505.

388 - MAZURIER S.I., A. AUDURIER, N. MARQUET-VAN DER MEE, S. NOTERMANS, K. WERNARS.
A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of Listeria monocytogenes isolates.
Res. Microbiol., 1992, **143**, 507-512.

389 - MENGAUD J., J. CHENEVERT, C. GEOFFROY, J.L. GAILLARD, P COSSART.
Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of Listeria monocytogenes : listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin.
Infect. Immun., 1987, **55**, 3225-3227.

390 - MENGAUD J., M.F. VICENTE, J. CHENEVERT, J. MONIZ PEREIRA, C. GEOFFROY, B. GICQUEL-SANZEY, F. BAQUERO, J.C. PEREZ-DIAZ, P COSSART.
Expression in Escherichia coli and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of Listeria monocytogenes.
Infect. Immun., 1988, **56**, 766-772.

391 - MENGAUD J., M.F. VICENTE, J. CHENEVERT, C. GEOFFROY, F. BAQUERO, J.C. PEREZ-DIAZ, P COSSART.
A genetic approach to demonstrate the role of listeriolysin O in the virulence of Listeria monocytogenes.
Acta Microbiol. Hung., 1989, **36**, 177-182.

392 - MENGAUD J., C. BRAUN-BRETON, P COSSART.
Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in Listeria monocytogenes : a novel type of virulence factor?
Mol. Microbiol., 1991, **5**, 367-372.

393 - MENGAUD J., C. GEOFFROY, P COSSART.
Identification of a new operon involved in Listeria monocytogenes virulence : its first gene encodes a protein a protein homologous to bacterial metalloproteases.
Infect. Immun., 1991, **59**, 1043-1049.

394 - MESSINA M.C., H.A. AHAMAD, J.A. MARCHELLO, C.P. GERBA, M.W. PAQUETTE.
The effect of liquid smoke on Listeria monocytogenes.
J. Food Prot., 1988, **51**, 629-631.

395 - MICHARD J., N. JARDY, K. LAINE.
Croissance des Listeria dans des jus de laitue. Effets de la température et de la microflore associée.
Microbiol. aliments Nutr., 1989, **7**, 31-42.

396 - MICHARD J., N. JARDY.
Dénombrement et localisation de Listeria monocytogenes dans les fromages à pâte molle et à croûte lavée fabriqués avec du lait cru en provenance d'une entreprise fromagère.
Microbiol. Aliments Nutr., 1989, **7**, 131-137.

397 - MITCHELL W.J., J. REIZER, C. HERRING, C. HOISCHEN, M.H. SAIER Jr.
Identification of a phosphoenolpyruvate : fructose phosphotransferase system (fructose-1-phosphate forming) in Listeria monocytogenes.
J. Bacteriol., 1993, **175** (9), 2758-2761.

398 - MOELLERING R., G. MEDOFF, I. LEECH, C. WENNERSTEN, L. KUNZ.
Antibiotic synergism against Listeria monocytogenes.
Antimicrob. Agents. Chemother., 1972, **1**, 30-34.

399 - MONTICELLO D.J., D. O'CONNOR.
Lysis of Listeria monocytogenes by nisin.
In : Food-borne Listeriosis. (A.J. MILLER, J.L. SMITH, G.A. SOMKUTI, ed). Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1990, 81-83.

400 - MORRIS I.J., C.D. RIBEIRO.
Listeria monocytogenes and pate.
Lancet, 1989, **II**, 1285-1286.

401 - MORRISSEY D., M. LOMBARDI, J. ELDREDGE, K. KEARNEY, E.P. GROODY, M.L. COLLINS.
Nucleic acid hybridization assay employing dA-tailed capture probes-1-Multiple capture methods.
Anal. Biochem., 1989, **182**, 345-359.

402 - MOUNIER J., A. RYTER, M. RODON-COQUIS, P.J. SANSONETTI.
Intracellular and cell-to-cell spread of Listeria monocytogenes involves interaction with F-actin in the enterocyte-like cell line Caco-2.
Infect. Immun., 1990, **58**, 1048-1058.

403 - MULLIS K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKO, G. HORN, H. ERLICH.
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction.
Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1986, **2**, 263-273.

404 - MURRAY E.G.D., R.A. WEBB, M.B.R. SWANN.
A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto underscribed bacillus. Bacterium monocytogenes (in sp.).
J. Pathol. Bacteriol., 1926, **29**, 407.

405 - MUSTAPHA A.
Destruction of Listeria monocytogenes by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers.
J. Food Prot., 1989, **52** (5), 306-311.

406 - MYERS E.R., A.W. DALLMIER, S.E. MARTIN.
Sodium chloride, potassium chloride, and virulence in Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (7), 2082-2086.

407 - NAKAZATO H.
Radioimmunoassay of antibody to ΦX174 DNA:RNA hybrid.
Anal. Biochem., 1979, **98**, 74-80.

408 - NAKAZATO H.
Fractionation and characterization of antibodies elicited by ΦX174 deoxyribonucleic acid-ribonucleic acid hybrid.
Biochemistry, 1980, **29**, 2835-2840.

409 - NGUYEN-THE C., B.M. LUND.
The lethal effect of carrot on Listeria species.
Journal of Applied Bacteriology, 1991, **70** (6), 479-488.

410 - NIEBUHR K., T. CHAKRABORTY, M. ROHDE, T. GAZLIG, B. JANSEN, P. KOLLNER, J. WEHLAND.
Localization of the ActA polypeptide of Listeria monocytogenes in infected tissue culture celle lines : ActA is not associated with actin "comets".
Infect. Immun., 1993, **61** (7), 2793-2802.

411 - NIEDERHAUSER C., U. CANDRIAN, C. HÖFELEIN, M. JERMINI, H.P. BÜHLER, J. LÜTHY.
Use of polymerase chain reaction for detection of Listeria monocytogenes in food.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (5), 1564-1568.

412 - NIEDERHAUSER C., C. HÖFELEIN, J. LÜTHY, U. KAUFMANN, H.P. BÜHLER, U. CANDRIAN.
Comparison of "Gen-Probe" DNA and PCR for detection of Listeria monocytogenes in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese.
Res. Microbiol., 1993, **144**, 47-54.

413 - NIELSEN J.W., J.S. DICKSON, J.D. CROUSE.
Use of a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici to inhibit Listeria monocytogenes associate with fresh meat.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56**, 2142-2145.

414 - NINET B., E. BANNERMAN, J. BILLE.
Assessment of the Accuprobe Listeria monocytogenes culture identification reagent kit for rapid colony confirmation and its application in various enrichment broths.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (12), 4055-4059.

415 - NIRMUL G., S. GLABMAN, M. HAIMOU, E. LEITER, L. BURROWS.
Listeria monocytogenes meningitis during immunodepression.
N. Engl. J. Med., 1971, **285**, 1323.

416 - NOAH C.W., N.C. RAMOS, M.V. GIPSON.
Efficiency of two commercial ELISA Kits compared with the BAM culture method for detecting Listeria in naturally contamined foods.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1991, **74** (5), 819-821.

417 - NOCERA D., E. BANNERMAN, J. ROCOURT, K. JATON-OGAY, J. BILLE.
Characterization by DNA restriction endonuclease analysis of Listeria monocytogenes strains related to the Swiss epidemic of listeriosis.
Journal of Clinical Microbiol., 1990, **28** (10), 2259-2263.

418 - NOCERA D., M. ALTWEGG, G. MARTINETTI-LUCCHINI, E. BANNERMAN, F. ISCHER, J. ROCOURT, J. BILLE.
Characterization of Listeria strains from a foodborne listeriosis outbreak by rRNA gene restriction patterns compared to four other typing methods.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1993, **12** (3), 162-169.

419 - NORLAND O.S.
Host-parasite relations in initiation of infection. III. Hypoglycemia without stress in experimental infection with Listeria monocytogenes.
Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1960, **24**, 88-95.

420 - NORRUNG B., P. GERNER-SMIDT.
Comparison of multilocus enzyme electrophoresis (MEE), ribotyping, restriction enzyme analysis (REA) and phage typing for typing of Listeria monocytogenes.
Epidemiol. Infect., 1993, **111** (1), 71-79.

421 - NORRUNG B., N. SKOVGAARD.
Application of multilocus enzyme electrophoresis in studies of the epidemiology of Listeria monocytogenes in Denmark.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (9), 2817-2822.

422 - NOTERMANS S., T. CHAKRABORTY., M. LEIMEISTER-WÄCHTER, J. DUFRENNE, K.J. HEUVELMAN, H. MAAS, W. JANSEN, K. WERNARS, P. GUINEE.
Specific gene probe for detection of biotyped and serotyped Listeria strains.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55** (4), 902-906.

423 - NOTERMANS S., J. DUFRENNE, M. LEIMEISTER-WÄCHTER, E. DOMANN, T. CHAKRABORTY.
Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic Listeria species.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (9), 2666-2670.

424 - OKWUMABUA O., B. SWAMINATHAN, P. EDMONDS, J. WENGER, J. HOGAN, M. ALDEN.
Evaluation of a chemiluminescent DNA probe assay for the rapid confirmation of Listeria monocytogenes.
Res. Microbiol., 1992, **143**, 183-189.

425 - OLAPEDO D.K., A.A.G. CANDLISH, W.H. STIMSON.
Detection of Listeria monocytogenes using a polyclonal antibody.
Lett. Appl. Microbiol., 1992, **14**, 26-29.

426 - ORTEL S.
Phage typing of Listeria.
Int. J. Food Microbiol., 1989, **8**, 241-244.

427 - ORTEL S.
Listeriocins (monocins).
Int. J. Food Microbiol., 1989, **8**, 249-250.

428 - OSTLING C.E., S.E. LINDGREN.
Inhibition of Enterobacteria and Listeria growth by lactic, acetic and formic acids.
J. Appl. Bacteriol., 1993, **75** (1), 18-24.

429 - PARK S.F., G.S. STEWART, R.G. KROLL.
The use of bacterial luciferase for monitoring the environmental regulation of expression of genes encoding virulence factors in Listeria monocytogenes.
J. Gen. Microbiol., 1992, **138** (Pt 12), 2619-2627.

430 - PARK S.F., R.G. KROLL.
Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in Listeria monocytogenes.
Mol. Microbiol., 1993, **8** (4), 653-661.

431 - PARRISIUS S.B., S. BHAKDI, M. ROTH, J. TRANUM-JENSEN, W. GOEBEL, H.P.R. SEELIGER.
Production of listeriolysin by beta-hemolytic strains of Listeria monocytogenes.
Infect. Immun., 1986, **51**, 314-319.

432 - PATOCKA F., M. MARA.
Contribution to knowledge of factors participating in virulence of Listeria monocytogenes.
J. Hyg. Epidem. (Praha), 1973, **17**, 457-468.

433 - PAYNE K.D., E. RICO-MUNOZ, P.M. DAVIDSON.
The antimicrobial activity of phenolic compounds against Listeria monocytogenes and their effectiveness in model milk system.
J. Food Protect., 1989, **52**, 151-153.

434 - PEARSON L.J., E.H. MARTH.
Inhibition of Listeria monocytogenes by cocoa in a broth medium and neutralization of this effect by casein.
J. Food Prot., 1990, **53** (1), 38-46.

435 - PEARSON L.J., E.H. MARTH.
Behavior of Listeria monocytogenes in the presence of methylxanthines : caffeine and theobromine.
J. Food Prot., 1990, **53** (1), 47-55.

436 - PEREZ C.
Contribution à l'étude épidémiologique des listérioses ; à propos de dix observations chez l'adulte.
Thèse Méd., Montpellier, 1974, N°**213**.

437 - PEREZ-DIAZ J.C., M.F. VICENTE, F. BAQUERO.
Plasmids in Listeria.
Plasmid, 1982, **8**, 112-118.

438 - PETERKIN P.I., E.S. IDZIAK, A.N. SHARPE.
Screening DNA probes using the hydrophobic grid-membrane filter.
Food Microbiol., 1989, **6**, 281-284.

439 - PETERKIN P.I., E.S. IDZIAK, A.N. SHARPE.
Detection of Listeria monocytogenes direct colony hybridization on hydrophobic grid-membrane filters by using a chromogen-labeled DNA probe.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (2), 586-591.

440 - PETRAN R.L., E.A. ZOTTOLA, R.B. GRAVINI.
Incidence of Listeria monocytogenes in market samples of fresh and frozen vegetables.
J. Food Sci., 1988, **53**, 1238-1240.

441 - PETRILLI E.S., G. D'ABLAING, W.F. LEDGER.
Listeria monocytogenes chorioamnionitis : diagnosis by transabdominal amniocentesis.
Obstet. Gynecol., 1980, **55** (3) (Suppl.), 5-8.

442 - PIFFARETTI J.C., H. KRESSEBUCH, M. AESCHBACHER, J. BILLE, E. BANNERMAN, J.M. MUSSER, R.K. SELANDER; J. ROCOURT.
Genetic characterization of clones of the bacterium Listeria monocytogenes causing epidemic disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1989, **86**, 3818-3822.

443 - PINE L., G.B. MALCOM, J.B. BROOKS, M.I. DANESHVAR.
Physiological studies on the growth and utilization of sugars by Listeria species.
Can. J. Microbiol., 1988, **35**, 245-254.

444 - PINI P.N., R.J. GILBERT.
A comparison of two procedures for the isolation of Listeria monocytogenes from raw chicken and soft cheeses.
Int. J. Food Microbiol.,1988, **7**, 331-337.

445 - PIRIE J.H.H.
A new disease of veld rodents "Tiger River Disease".
Publ. S. Afr. Inst. Med. Res., 1927, **3**, 163.

446 - PITCHER D., D. MARY.
Listeria monocytogenes endocarditis in hypertrophic cardiomyopathy.
Br. Med. J., 1978 I (6118) 961.

447 - PORTNOY D.A., P.S. JACK, D.J. HINRICHS.
Role of hemolysin for the intracellular growth of Listeria monocytogenes.
J. Exp. Med., 1988, **167**, 1459-1471.

448 - POYART C., E. ABACHIN, I. RAZAFIMANANTSOA, P. BERCHE.
The zinc metalloprotease of Listeria monocytogenes is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C : direct evidence obtained by gene complementation.
Infect. Immun., 1993, **61** (4), 1576-1580.

449 - PREMARATNE R.J., W.J. LIN, E.A. JOHNSON.
Development of an improved chemically defined minimal medium for Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (10), 3046-3048.

450 - PREVOT A.R.
Traité systématique.
Bact. 2 vol. Ed. Dunod. PARIS. 1961.

451 - RACCACH M., R. Mc GRATH, H. DAFTARIAN.
Antibiosis of some lactic acid bacteria including Lactobacillus acidophilus toward Listeria monocytogenes.
Int. J. Food Microbiol., 1989, **9**, 25-32.

452 - RACZ P., K. TENNER, E. MERO.
Experimental Listeria interitis, an electron microscopic study of the epithelial phase in experimental Listeria infection.
Lab. Invest. USA, 1972, **26** (6), 694-700.
Résumé Bull. Signal. CNRS, 34-340, 6531.

453 - RALOVICH B., A. FORRAY, E. MERO.
Additional data on diagnosis and epidemiology of Listeria infections.
Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektioskr. Hyg. Abt. I Orig. Reihe A, 1970, **214**, 231-235.

454 - RALOVICH B., A. FORRAY, E. MERO, H. MALOVIES, I. SZAZADOS.
New selective medium for isolation of L. monocytogenes.
Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektioskr. Hyg. Abt. I Orig. Reihe A, 1971, **216**, 88-91.

455 - RALOVICH B., E. EMODY, I. MALOVICS, E. MERO, A. FORRAY.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1972, **19**, 367.

456 - RALOVICH B., M. SHAHAMAT, M. WOODBINE.
Further data on the characters of Listeria strains.
Med. Microbiol. Immunol., 1977, **163**, 125-139.

457 - RALOVICH B.
In : Listeriosis research present situation and perspective. Akadémiai Kiado, Budapest, 1984.

458 - RAPP J., D. KERSTEN.
Listeria septicaemia in few day-old suckling pigs.
Veterinary Medical Review, 1985, **1**, 10-12.

459 - RAPP M.F., H.A. PERSHADSINGH, J.W. LONG, J.M. PICKENS.
Ampicillin-resistant Listeria monocytogenes meningitis in a previously healthy 14 year-old athlete.
Arch. Neurol., 1984, **41**, 1304.

460 - RAPPAPORT F., M. RABINOVITZ, R. TOAFF, K.N. KROCHI.
Genital listeriosis as a cause of repeated abortion.
Lancet, 1960, **1**, 1273-1275.

461 - RAVENEAU J., C. GEOFFROY, J.L. BERETTI, J.L. GAILLARD, J.E. ALOUF, P. BERCHE.
Reduced virulence of a Listeria monocytogenes phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene.
Infect. Immun.,1992, **60** (3), 916-921.

462 - RAVOMANANA D., N. RICHARD, J.-P. ROSEC.
Etude comparative de trois protocoles de recherche de Listeria sp. et Listeria monocytogenes dans les produits alimentaires.
Industries Alimentaires et Agricoles, 1993, **10**, 730-733.

463 - REBIERE I., V. GOULET.
La listériose : revue générale et référence à l'épidémie française de 1992.
La Lettre de l'Infectiologue, 1993, **8** (4), 130-135.

464 - REISS H.J., J. POTEL, A. KREBS.
Granulomatosis infantiseptica, eine durch einen spezifischen Erroger hervogerufene-fetale Sepsis.
Klim. Wschr., 1951, **29**, 29.

465 - RICHTER K.S.
Physical and genetic properties of a bacteriocin produced by a Pediococcus sp. active against Listeria monocytogenes.
M.S. thesis. University of Nebraska, Lincoln, 1989.

466 - ROBISON B.J., L.T. BECK, C.R. BROWN.
Identification of Listeria species using MICRO-ID Listeria, abstr. P-43.
Abstr. 90th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1990. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

467 - ROCOURT J., P.A.D. GRIMONT, F. GRIMONT, H.P.R. SEELIGER.
DNA relatedness among serovars of Listeria monocytogenes (sensu lato).
Curr. Microbiol.,1982, **7**, 383-388.

468 - ROCOURT J., P.A.D. GRIMONT.
Listeria welshimeri sp. nov. and Listeria seeligeri sp. nov.
Int. J. System. Bacteriol., 1983, **33**, 866-869.

469 - ROCOURT J., A. SCHRETTENBRUNNER, H.P.R. SEELIGER.
Differenciation biochimique des groupes génomiques de Listeria monocytogenes (sensu lato).
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1983, **134 A**, 65-71.

470 - ROCOURT J., A. AUDURIER, A.L. COURTIEU, J. DURST, S. ORTEL, A. SCHRET-TENBRUNNER, A.G. TAYLOR.
A multi-centre study on the phage typing of Listeria monocytogenes.
Zbl. Bakt. Hyg. A, 1985, **259**, 489-497.

471 - ROCOURT J., H.P.R. SEELIGER.
Distribution des espèces du genre Listeria.
Zbl. Bakt. Hyg.,1985, **A 259**, 317-330.

472 - ROCOURT J., U. WEHMEYER, E. STACKEBRANDT.
Transfer of Listeria denitrificans to a new genus, Jonesia gen. nov. as Jonesia denitrificans comb. nov.
Int. J. System. Bacteriol., 1987, **37**, 266-270.

473 - ROCOURT J.
Taxonomy of the genus Listeria.
Infect., 1988, **16** (Suppl. 2), 89-91.

474 - ROCOURT J.
Identification and typing of Listeria.
In : Foodborne Listeriosis (Proceedings of a Symposium on September 7, 1988 in Wiesbaden, FRG), pp. 9-28. B. Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg (1989).

475 - ROCOURT J., B. CATIMEL.
International phage typing center for Listeria : report for 1987.
Acta Microbiol. Hung., 1989, **36**, 225-229.

476 - ROCOURT J.
Listériose humaine : épidémiologie et prévention.
La Lettre de l'Infectiologue, 1991, **6** (1), 14-18.

477 - ROCOURT J.
Epidémiologie de la listériose humaine.
Impact Médecin. Les dossiers du praticien n° **176**. La listériose. 1992. Chapitre 2. 5-9.

478 - ROCOURT J., B. CATIMEL, C. JACQUET, R. BROSCH, C. BUCHRIESER.
Epidémie de listériose en France en 1992 : aspects microbiologiques.
Méd. Mal. Infect., 1992, **22**, HS, 35-40.

479 - ROHNER P., E. ARRIGONI, R. AUCKENTHALER.
Activité in vitro des antibiotiques sur Listeria monocytogenes lors d'une épidémie humaine.
Méd. Mal. Infect., 1992, **22**, 220-225.

480 - ROMERO N.C., M.E. NADER DE MACIAS, M.C. APELLA, G. OLIVER.
Inhibition of Listeria monocytogenes by strains of lactic acid bacteria used as ferments.
Microbiol. Aliment Nutr., 1990, **8** (4), 335-340.

481 - ROSSEN L., K. HOLSTROM, J.E. OLSEN, O.F. RASMUSSEN.
A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of Listeria monocytogenes in food samples.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **14**, 135-145.

482 - ROY B., H.-W. ACKERMANN, S. PANDIAN, G. PICARD, J. GOULET.
Biological inactivation of adhering Listeria monocytogenes by listeriaphages and a quaternary ammonium compound.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (9), 2914-2917.

483 - RUHLAND G.J., M. HELLWIG, G. WANNER, F. FIEDLER.
Cell-surface location of Listeria-specific protein p60-detection of Listeria cells by indirect immunofluorescence.
J. Gen. Microbiol., 1993, **139** (Pt 3), 609-616.

484 - RUHR E., S.G. SAHL.
Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles.
Antimicrob. Agents Chemother, 1985, **27**, 841-845.

485 - RUSSEL E.G.
Comparison of immunofluorescent antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Listeria monocytogenes.
Acta Microbiologica Hungarica, 1989, **36** (2-3), 309-313.

486 - RYSER E.T., E.H. MARTH, M.P. DOYLE.
Survival of Listeria monocytogenes during manufacture and storage of cottage cheese.
J. Food Prot., 1985, **48**, 746-750.

487 - RYSER E.T., E.H. MARTH.
Behavior of Listeria monocytogenes during the manufacture and ripening of Cheddar.
J. Food Prot., 1987, **50**, 7-13.

488 - RYSER E.T., E.H. MARTH.
Fate of Listeria monocytogenes during the manufacture and ripening of Camembert cheese.
J. Food Prot., 1987, **50**, 372-378.

489 - RYSER E.T., E.H. MARTH.
Growth of Listeria monocytogenes at different pH values in uncultured whey or whey cultured with Penicillium camemberti.
Can. J. Microbiol., 1988, **34**, 730-734.

490 - SAIKI R.K., P.H. GELEALAND, S. STOFFEL, S.J. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS, H.A. ERLICH.
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science, 1988, **239**, 487-491.

491 - SAMRA Y., M. HERTZ, G. ALTMAN.
Adult listeriosis. A review of 18 cases.
Post grad Med. J., 1984, **60**, 267-269.

492 - SAMUEL D., J. Mc LAUCHLIN, A.G. TAYLOR.
Enhanced chemiluminescence ELISA for Listeria specific antigen in cerebrospinal fluid using an FITC-anti FITC system.
Journal of Bioluminescence & Chemiluminescence, 1990, **5** (3), 179-182.

493 - SARRUT S., C. CRUMIERE, M. VOYER.
La listériose materno-fœtale. II - fréquence et épidémiologie. A propos de 14 observations.
Rev. Franç. Gynecol., 1976, **71** (1), 17-25.

494 - SAUNDERS N.A., A.M. RIDLEY, A.G. TAYLOR.
Typing of Listeria monocytogenes for epidemiological studies using DNA probes.
Acta Microbiol. Hung., 1989, **36**, 205-209.

495 - SCHAACK M.M., E.H. MARTH.
Survival of Listeria monocytogenes in refrigerated cultured milks and yogurts.
J. Food Prot., 1988, **51**, 848-852.

496 - SCHILLINGER U., E.K. LÜCKE.
Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55**, 1901-1906.

497 - SCHILLINGER U., W.H. HOLZAPFEL.
Antibacterial activity of carnobacteria.
Food Microbiol., 1990, **7** (4), 305-310.

498 - SCHILLINGER U., M. KAYA, E.K. LÜCKE.
Behavior of Listeria monocytogenes in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of Lactobacillus sake.
J. Appl. Bacteriol., 1991, **70** (6), 473-478.

499 - SCHVED F., A. LALAZAR, Y. HENIS, B.J. JUVEN.
Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici.
J. Appl. Bacteriol., 1993, **74** (1), 67-77.

500 - SEELIGER H.P.R., D. JONES.
Genus Listeria Pirie. 1940. 383 [AL], 1235-1245. In SNEATH N.S., M.E. MAIR, M.E. SHARPE, J.G. HOLT (ed) , Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. **2**. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

501 - SEELIGER H.P.R.
Zur Aetiologie der Granulomatosis infantiseptica und pseudo-tuberkuloser Erkrankungen.
Dtsch. Med. Wschr., 1952, **77**, 583-588.

502 - SEELIGER H.P.R.
Listeriosis. Karger, Bâle, 1961.

503 - SEELIGER H.P.R., J. BOCKEMUHL.
Kritische untersuchungen zur frage einer kapselbildung bei Listeria monocytogenes.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 1968, **206**, 216-227.

504 - SEELIGER H.P.R., H.J. WELSHIMER.
Genus Listeria. 1974, p. 593-596. In R.E. BUCHANAN and N.E. Gibbons (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

505 - SEELIGER H.P.R., M. SCHOOFS.
Serological analysis of non-hemolysing strains of Listeria sp.
7th International Symposium on the problems of listeriosis, Varna, Bulgarie, 1977.

506 - SEELIGER H.P.R., K. HOHNE.
Serotyping of Listeria monocytogenes and related species.
In : BERGAN T., NORRIS J.R. (ed). Methods in Microbiology. Academic Press New York, 1979, **13**, 31-49.

507 - SEELIGER H.P.R.
A pathogene listerien : Listeria innocua sp. n. (SEELIGER et SCHOOFS, 1977).
Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Orig. A ; Med. Mikrobiol. Infektons kr., 1981, **249**, 487-493.

508 - SEELIGER H.P.R., J. ROCOURT, A. SCHRETTENBRUNNER, P.A.D. GRIMONT, D. JONES.
Listeria ivanovii sp. nov.
Int. J. System. Bact., 1984, **34**, 336-337.

509 - SELANDER R.K., D.A. CAUGANT, H. OCHMAN, J.M. MUSSER, M.N. GILMOUR, T.G. WHITTMAN.
Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, **51**, 873-884.

510 - SEPTAK M.
Acridinium-ester-labelled DNA oligonucleotide probes.
J. Biolumin. Chemilumin., 1989, **4**, 351-356.

511 - SHAHAMAT M., A. SEAMAN, M. WOODBINE.
Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on Listeria monocytogenes.
In : GOULD G.W., CORRY J.E.L., eds. Microbiol., Growth and survival in extreme environment. London : Acad. Press., 1980, 227-237.

512 - SHAHAMAT M., A. SEAMAN, M. WOODBINE.
Survival of Listeria monocytogenes in high-salt concentration.
Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionsk. Hyg. Abt. I. Orig. Reihe A., 1980, **246**, 506-511.

513 - SHELEF L.A.
Survival of Listeria monocytogenes in ground beef or liver during storage at 4°C and 25°C.
J. Food Prot., 1989, **52**, 379-383.

514 - SIDDIQUE I.H., I. FONG-LIN, R.A. CHUNG.
Purification and characterization of hemolysin produced by Listeria monocytogenes.
Am. J. Vet. Res., 1974, **35**, 289-296.

515 - SIDDIQUI R., M.A. KHAN.
Vitamin and nitrogen base requirements for Listeria monocytogenes and hemolysin production.
Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. 1 Abt. Orig. A., 1982, **253**, 225-235.

516 - SIDDIQUI R., M.A. KHAN.
Amino acid requirement of six strains of Listeria monocytogenes.
Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. 1, 1989, **271**, 146-152.

517 - SIONKOWSKI P.J., L.A. SHELEF.
Viability of Listeria monocytogenes strain Brie-1 in the avian egg.
J. Food Prot., 1990, **53**, 15-17.

518 - SIRAGUSA G.R., M.G. JOHNSON.
Inhibition of Listeria monocytogenes growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H_2O_2 antimicrobial system.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55**, 2802-2805.

519 - SIRAGUSA G.R.
Bacteriocin production by Enterococcus Hirae inhibitory to Listeria species, abstr. P-38.
Abstr. 91st Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol., 1991.

520 - SIRAGUSA G.R., M.G. JOHNSON.
Monoclonal antibody specific for Listeria monocytogenes, Listeria innocua, and Listeria welshimeri.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **56** (6), 1897-1904.

521 - SIRAGUSA G.R.
Production of bacteriocin inhibitory to Listeria species by Enterococcus hirae.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (11), 3508-3513.

522 - SIZMUR K., C.W. WALKER.
Listeria in prepacked salads.
Lancet, 1988, **I**, 1167.

523 - SKALKA B., J. SMOLA, K. ELISCHEROVA.
Routine test for in vitro differenciation of pathogenic and apathogenic Listeria monocytogenes strains.
J. Clin. Microbiol., 1982, **15**, 503-507.

524 - SKJERVE E., L.M. RORVIK, O. OLSVIK.
Detection of Listeria monocytogenes in foods by immunomagnetic separation.
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (11), 3478-3481.

525 - SKYLTA E., W. HEREIJGERS, T. MATTILA-SANDHOLM.
Broad spectrum antibacterial activity of Pediococcus damnosus and Pediococcus pentosaceus in minced meat.
Food Microbiol., 1991, **8** (3), 231-237.

526 - SMITH J.L., S.E. HUNTER.
Heat injury in Listeria monocytogenes prevention by solutes.
Lebensm.-Wiss. Technol., 1988, **21**, 307-311.

527 - SMITH J.L., C. Mc COLGAN, B.S. MARMER.
A research note : Growth temperature and action of lysozyme on Listeria monocytogenes.
J. Food Sci., 1991, **56** (4), 1101-1103.

528 - SOBRINO S.O., J.M. RODRIGUEZ, W.L. MOREIRA, M.F. FERNANDEZ, B. SANZ, P.E. HERNANDEZ.
Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from dry fermented sausages.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **13** (1), 1-10.

529 - SOKOLOVIC Z., J. RIEDEL, M. WUENSCHER, W. GOEBEL.
Surface-associated, PrfA-regulated proteins of Listeria monocytogenes synthetized under stress conditions.
Mol. Microbiol., 1993, **8** (2), 219-227.

530 - SORQVIST S.
Heat resistance of Listeria monocytogenes by two recovery media used with and without cold preincubation.
J. Appl. Bacteriol., 1993, **74** (4), 428-432.

531 - STANLEY N.F.
Studies on Listeria monocytogenes. I. Isolation of a monocytogis producing agent (MPA).
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1949, **27**, 123-131.

532 - STEINBREUGGE E.G., R.B. MAXCY, M.B. LIEWEN.
Fate of Listeria monocytogenes on ready to serve lettuce.
J. Food Prot., 1988, **51**, 596-599.

533 - STEVENS K.A., B.W. SHELDON, N.A. KLAPES, T.R. KLAENHAMMER.
Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57**, 3613-3615.

534 - STEWART R.H., J.F. PRINBOW, M.S. SILVERMANN.
Effect of chronic gamma radiation on airbone infection of mice with Listeria monocytogenes.
Radiat. Res., 1965, **24**, 96-103.

535 - STUART M.R., P.E. PEASE.
A numerical study on the relationship of Listeria and Erysipelothrix.
J. Gen. Microbiol., 1972, **73**, 551-565.

536 - STUART S. E., H.J. WELSHIMER.
Taxonomic reexamination of Listeria pirie and transfert of Listeria grayi and Listeria murraya to a new genus Murraya.
Int. J. System. Bacteriol., 1974, **24**, 177-185.

537 - STULL T.L., J.J. LIPUMA, T.D. EDLIND.
A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria : ribosomal RNA.
J. Infect. Dis., 1988, **157**, 280-286.

538 - SWAMINATHAN B., P.S. HAYES, V.A. PRZYBYSZEWSKI, B.D. PLIKAYTIS.
Evaluation of enrichment and plating media for isolating Listeria monocytogenes.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, **71** (3), 664-668.

539 - SWORD C.P., G.C. KINGDON.
Listeria monocytogenes toxin.
In : Microbial toxins. Academic Press, New York, 1971, 357-377.

540 - SWORD C.P., M.J. PICKETT.
The isolation and characterization of bacteriophages from Listeria monocytogenes.
J. Gen. Microbiol., 1961, **25**, 241-248.

541 - SZEMEREDI G.
New method for the isolation of Listeria monocytogenes from contaminated samples.
Acta Microbiologica Hungarica, 1990, **37** (2), 165-169.

542 - TARJAN V.
Sensitivity of Listeria monocytogenes to irradiation.
Acta. Microbiol. Hung., 1990, **37** (1), 101-104.

543 - TESSIER F., G.L. DAGUET.
Influence des antibiotiques sur les Entérobactéries de la flore intestinale au cours de la période néonatale.
Ann. Red., 1971, **18**, 563-567.

544 - THOMAS E.J., R.K. KING, J. BURCHAK, V.P. GANNON.
Sensitive and specific detection of Listeria monocytogenes in milk and ground beef with the polymerase chain reaction.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (9), 2576-2580.

545 - TICE A.D., J.S. NELSON, E.B. VISCONTI.
Listeria monocytogenes pericarditis and myocardial abscess.
RI Med. J., 1979, **62** (4), 135-138.

546 - TICHACZEK P.S., J. NISSEN MEYER, I.F. NES, R.F. VOGEL, W.P. HAMMES.
Characterization of the bacteriocins curvacin A from Lactobacillus curvatis LTH 1174 and sakacin P from Lactobacillus sake LTH 673.
Syst. Appl. Microbiol., in press.

547 - TILNEY L.G., D.A. PORTNOY.
Actin filament and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes.
J. Cell Biol., 1989, **109**, 1597-1608.

548 - TILNEY L.G., P.S. CONNELLY, D.A. PORTNOY.
The nucleation of actin filaments by the bacterial intracellular pathogen, Listeria mo6 nocytogenes.
J. Cell Biol., 1990, **111**, 2979-2988.

549 - TODD E.W., L.F. HEWITT.
A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin.
J. Pathol. Bacteriol., 1932, **35**, 973-974.

550 - TOKORO A., M. KOBAYASHI, N. TATEWAKI, K. SUZUKI, Y. OKAWA, T. MIKAMI, S. SUZUKI, M. SUZUKI.
Protective effect of N-acetyl chitohexaose on Listeria monocytogenes infection in mice.
Microbiology & Immunology, 1989, **33** (4), 357-367.

551 - TORENSMA R., M.J.C. VISSER, C.J.M. AARSMAN, M.J.J.G. POPPELIER, A.C. FLUIT, J. VERHOEF.
Monoclonal antibodies that react with live Listeria spp.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (8), 2713-2716.

552 - TOURAINE J.L., C. TOUSSAINT, N. BLANC, J. TRAEGER.
Listériose après transplantation rénale.
Nouvelle Presse Méd., 1972, **1** (42), 2813-2817.

553 - TRÜSSEL M., T. JEMMI.
The behavior of Listeria monocytogenes during the ripening and storage of artificially contaminated salami and mettwurst.
Fleischwirtschaft, 1989, **69**, 1586-1592.

554 - VALDES-STAUBER N., H. GOTZ, M. BUSSE.
Antagonistic effect of Coryneform bacteria from red smear cheese against Listeria species.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **13** (2), 119-130.

555 - VAN BELKUM M.J., J. KOK, G. VENEMA, H. HOLO, I.F. NES, W.N. KONINGS, T. ABEE.
The bacterium lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner.
J. Bacteriol., 1991, **173**, 7934-7941.

556 - VAN DAELEN A.M., F.H. JAARTSVELD.
Listeria mastitis in cattle.
Tijdschrift Voor Diergeneeskunde, 1988, **113** (7), 380-383.

557 - VAN-DE-WEYER A., M.J. DEVLEESCHOUWER, J. DONY.
Bactericidal activity of disinfectants on Listeria.
J. Appl. Bacteriol., 1993, **74** (4), 480-483.

558 - VAN METRE D.C., G.M. BARRINGTON, S.M. PARISH, D.B. TUMAS.
Otitis media/interna and suppurative meningoencephalomyelitis associated with Listeria monocytogenes infection in a llama.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1991, **199** (2), 236-240.

559 - VAN NETTEN P., A. VAN DER VEN, I. PERALES, D.A.A MOSSEL.
A selective and diagnostic medium for use in the enumeration of Listeria spp. in foods.
Int. J. Food Microbiol., 1988, **6**, 187-188.

560 - VAN NETTEN P., I. PERALES, A. VAN DE MOOSDIJK, G.D.W. CURTIS, D.A.A MOSSEL.
Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and other Listeria spp.
Int. J. Food Microbiol., 1989, **8**, 299-316.

561 - VAZQUEZ-BOLAND J., C. KOCKS, S. DRAMSI, H. OHAYON, C. GEOFFROY, J. MENGAUD, P. COSSART.
Nucleotide sequence of the lecithinase operon of Listeria monocytogenes and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread.
Infect. Immun., 1992, **60**, 219-230.

562 - VELANI S., D. ROBERTS.
Listeria monocytogenes and other Listeria spp. in prepackaged mixed salads and individual salad ingredients.
PHLS Microbiol. Digest., 1991, **8**, 21-22.

563 - VICENTE M.F., F. BAQUERO, J.C. PEREZ-DIAZ.
Cloning and expression of the Listeria monocytogenes haemolysin in Escherichia coli.
FEBS letters.,1985, **30**, 77-79.

564 - VINES A., M.W. REEVES, S. HUNTER, B. SWAMINATHAN.
Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of Listeria monocytogenes.
Res. Microbiol., 1992, **143**, 281-294.

565 - VOGT R.L., C. DONNELLY, B. GELLIN, W. BIBB, B. SWAMINATHAN.
Linking environmental and human strains of Listeria monocytogenes with isoenzyme and ribosomal RNA typing.
Eur. J. Epidem., 1990, **6**, 229-230.

566 - VOIRIOT P., J.B. DUREUX.
Traitement des infections listériennes.
La Lettre de l'Infectiologue, 1988, **3** (12), 439-442.

567 - WANG C., L.A. SHELEF.
Factors contributing to antilisterial effects of raw egg albumen.
J. Food Sci., 1991, **56** (5), 1251-1254.

568 - WANG L.L., E.A. JOHNSON.
Inhibition of Listeria monocytogenes by fatty acids and monoglycerides.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (2), 624-629.

569 - WANG R.F., W.W. CAO, M.G. JOHNSON.
Development of a 16S rRNA-based oligomer probe specific for Listeria monocytogenes.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (12), 3666-3370.

570 - WANG R.F., W.W. CAO, M.G. JOHNSON.
16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect Listeria monocytogenes cells added to foods.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (9), 2827-2831.

571 - WANG R.F., W.W. CAO, H. WANG, M.G. JOHNSON.
A 16S rRNA-based DNA probe and PCR method specific for Listeria ivanovii.
FEMS Microbiol. Lett., 1993, **80** (1), 85-92.

572 - WARBUTON D.W., J.M. FARBER, A. ARMSTRONG, R. CALDEIRA, T. HUNT, S. MESSIER, R. PLANTE, N.P. TIWARI, J. VINET.
A comparative study of the "FDA" and "USDA" methods for the detection of Listeria monocytogenes in foods.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **13**, 105-117.

573 - WATSON G.W., T.J. FULLER, J. ELM, R. M. KLUGE.
Listeria cerebritis. Relapse of infection in renal transplant patients.
Arch. Intern. Med., 1978, **138** (1), 83-87.

574 - WEAGANT S.D., P.N. SADO, K.G. COLBURN, J.D. TORKELSON, F.A. STANLEY, M.H. KRANE, S.C. SHIELDS, C.F. THAYER.
The incidence of Listeria species in frozen seafood products.
J. Food Prot., 1988, **51**, 655-657.

575 - WEEKS I., I. BEHESHTI, F. McCAPRA, A.K. CAMPBELL, J.S. WOODHEAD.
Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay.
Clin. Chem., 1983, **29**, 1474-1479.

576 - WEI C.I., M.O. BALABAN, S.Y. FERNANDO, A.J. PEPLOW.
Bacterial effect of high pressure CO_2 treatment on foods spiked with Listeria or Salmonella.
J. Food Prot., 1991, **54** (3), 189-193.

577 - WEISBURG W.G., S.M. BARNS, D.A. PELLETIER, D.J. LANE.
16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.
J. Bcateriol., 1991, **173**, 697-703.

578 - WELCH D.F., C.P. SWORD, S. BREHM.
Relationship between superoxide dismutase and pathogenic mechanisms of Listeria monocytogenes.
Infect. Immun., 1979, **23**, 863-872.

579 - WELCH D.F.
Role of catalase and superoxide dismutase in the virulence of Listeria monocytogenes.
Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 1987, **138**, 265-268.

580 - WELSH J., M. McCLELLAND.
Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.
Nucl. Acids Res., 1990, **18**, 7213-7218.

581 - WELSHIMER H.J.
Vitamin requirements of Listeria monocytogenes.
J. Bacteriol., 1963, **85**, 1156-1159.

582 - WELSHIMER H.J., A.L. MEREDITH.
Listeria murrayi sp. n. : a nitrate reducing mannitol fermenting Listeria.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1971, **21**, 3-7.

583 - WENKEBACH G.K.
Zuchting von Listeria monocytogenes ans HARNOHRE des Mannes Rias.
Del. Commun. Intern. Congr. Microbiol. 6th, 1953, **2**, 406.

584 - WENZEL J.M., E.H. MARTH.
Behavior of Listeria monocytogenes in the presence of Steptococcus lactis in a medium with internal pH control.
J. Food Prot., 1990, **53** (11), 918-923.

585 - WENZEL J.M., E.H. MARTH.
Changes in populations of Listeria monocytogenes in a medium with internal pH control containing Streptococcus cremoris.
J. Dairy. Sci., 1990, **73**, 3357-3365.

586 - WERNARS K., C.J. HEUVELMAN, T. CHAKRABORTY, S.H. NOTERMANS.
Use of the polymerase chain reaction for direct detection of Listeria monocytogenes in soft cheese.
J. Appl. Bacteriol., 1991, **70** (2), 121-126.

587 - WERNARS K., K. HEUVELMAN, S. NOTERMANS, E. DOMANN, M. LEIMEISTER-WÄCHTER, T. CHAKRABORTY.
Suitability of the prfA gene, which encodes a regulator of virulence genes in Listeria monocytogenes, in the identification of pathogenic Listeria spp.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (2), 765-768.

588 - WESLEY I.V., J.H. BRYNER, M.J. VAN DER MAATEN, M. KEHRLI.
Effects of dexamethasone on shedding of Listeria monocytogenes in dairy cattle.
American Journal of Veterinary Research, 1989, **50** (12), 2009-2013.

589 - WESLEY I.V., R.D. WESLEY, J. HEISICK, F. HARRELL, D. WAGNER.
Characterization of Listeria monocytogenes isolates by Southern blot hybridization.
Vet. Microbiol., 1990, **24** (3-4), 341-353.

590 - WESLEY I.V., R.D. WESLEY, J. HEISICK, F. HARRELL, D. WAGNER.
Restriction enzyme analysis in the epidemiology of Listeria monocytogenes.
In J.L. RICHARD (ed.). Symposium on cellular and molecular modes of action of selected microbial toxins in foods and feeds. Plenum Publishing Corp., New York, 1990, 225-238.

591 - WESLEY I.V., F. ASHTON.
Restriction enzyme analysis of Listeria monocytogenes strains associated with food-borne epidemics.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (4), 969-975.

592 - WIDJOJOATMODJO M.N., A.C. FLUIT, R. TORENSMA, B. KELLER, J. VERHOEF.
The Magnetic Immuno PCR Assay (MIPA), a rapid and sensitive detection system for bacteria.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1991, **10**, 935-938.

593 - WIEDMANN M., J. CZAJKA, F. BARANY, C.A. BATT.
Discrimination of Listeria monocytogenes from other Listeria species by ligase chain reaction.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (11), 3443-3447.

594 - WIEDMANN M., F. BARANY, C.A. BATT.
Detection of Listeria monocytogenes with a nonisotopic polymerase chain reaction-coupled ligase chain reaction assay.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (8), 2743-2745.

595 - WILHELMS D., D. SANDOW.
Preliminary studies on monocine typing of Listeria monocytogenes strains.
Acta. Microbiol. Hung., 1989, **36**, 235-238.

596 - WILKINSON B.J., D. JONES.
A numeral taxonomic survey of Listeria and related bacteria.
J. Gen. Microbiol., 1977, **98**, 399-421.

597 - WILLIAMS J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI, S.V. TINGEY.
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers.
Nucl. Acids Res., 1990, **18**, 6531-6535.

598 - WILSON A.P., J.P. PROUSE, J.M. GUMPEL.
Listeria monocytogenes septic arthritis following intra-articular yttrium-90 therapy.
Ann. Rhum. Dis.,1984, **43** (3), 518-519.

599 - WINKOWSKI K., A.D. CRANDALL, T.J. MONTVILLE.
Inhibition of Listeria monocytogenes by Lactobacillus bavaricus MN in beef systems at refrigeration temperatures.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59** (8), 2552-2557.

600 - WINPFHEIMER L., N.S. ALTMAN, J.H. HOTCHKISS.
Growth of Listeria monocytogenes and competitive spoilage organisms in raw chicken packaged under modified atmospheres and in air.
Int. J. Food Microbiol., 1990, **11**, 205-214.

601 - WINSLOW D.L., J. DAMME, E. DIECKMAN.
Delayed bactericidal activity of betalactam antibiotics against Listeria monocytogenes : antagonism of chloramphenicol and rifampicin.
Antimicrobial Agents Chemother., 1983, **23**, 555-558.

602 - WONG H.C., W.L. CHAO, C.M. YU.
Detection of Listeria monocytogenes by non-radioactive RNA probe and polymerase chain reaction.
Chung. Hua. Min. Kuo. Wei. Sheng. Wu. Chi. Mien. I. Hsueh. Tsa. Chih., 1992, **25** (2), 101-107.

603 - WUENSCHER M.D., S. KOHLER, A. BUBERT, U. GERIKE, W. GOEBEL.
The iap gene of Listeria monocytogenes is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity.
J. Bacteriol., 1993, **175** (11), 3491-3501.

604 - YAMAMORI T, T. YURA.
Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in Escherichia coli K-12.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, **79**, 860-864.

605 - YOUNG K.M., P.M. FOEGEDING.
Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of Listeria monocytogenes Scott A and the effect on intracellular pH.
J. Appl. Bacteriol., 1993, **74** (5), 515-520.

606 - YOUSEF A.E., E.H.MARTH.
Behavior of Listeria monocytogenes during the manufacture and storage of Colby cheese.
J. Food Prot., 1988, **51**, 12-15.

607 - YOUSEF A.E., E.T. RYSER, E.H. MARTH.
Methods for improved recovery of Listeria monocytogenes from cheese.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54** (11), 2643-2649.

608 - YOUSEF A.E., M.A. EL-SHENAWY, E.H.MARTH.
Inactivation and injury of Listeria monocytogenes in a minimal medium as affected by benzoïc acid and incubation temperature.
J. Food Sci., 1989, **54** (3), 650-652.

609 - YOUSEF A.E., E.H.MARTH.
Fate of Listeria monocytogenes during the manufacture and ripening of Parmesan cheese.
J. Dairy. Sci., 1990, **73** (12), 3351-3356.

610 - YOUSEF A.E., R.J. GAJEWSKI, E.H. MARTH.
Kinetics of growth and inhibition of Listeria monocytogenes in the presence of antioxidants foods additifs.
J. Food Sci., 1991, **56** (1), 10-3.

611 - YOUSEF A.E., J.B. LUCHANSKY, A.J. DEGNAN, M.P. DOYLE.
Behavior of Listeria monocytogenes in wiener exudates in the presence of Pediococcus acidilactici H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (5), 1461-1467.

612 - YU V.L., W.P. MILLER, E.J. WING, J.M. ROMANO, C.A. RUIZ, F.J. BRUNS.
Disseminated listeriosis presenting as acute hepatitis. Case reports and review of hepatic involvement in listeriosis.
Am. J. Med., 1982, **73** (5), 773-777.

613 - ZADJEL J.L., P. CEGLOWSKI, W.T. DOBRZANSKI.
Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by Streptococcus cremoris 202.
Appl. Environ. Microbiol., 1985, **49**, 969-974.

614 - ZIEGLER H.K., C.A. ORLIN.
Analysis of Listeria monocytogenes with monoclonal antibodies.
Clin. Invest. Med., 1984, **7**, 239-242.

PLAN

INTRODUCTION. 9 à 10

1ère PARTIE :

HISTORIQUE. 11 à 13

2ème PARTIE :

LE GERME. 14 à 36

I. POSITION TAXONOMIQUE. 15 à 18

II. HABITAT. 18 à 19

III. CARACTERES BIOCHIMIQUES. 19 à 22

III. 1. METABOLISME GLUCIDIQUE. 19, 20

III. 2. METABOLISME AZOTE. 20

III. 3. METABOLISME LIPIDIQUE. 20

III. 4. AUTRES CARACTERES DE DIFFERENCIATION AVEC LES AUTRES ESPECES. 21, 22

IV. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE. 22 à 27

V. CARACTERES CULTURAUX ET CROISSANCE. 27 à 33

VI. STRUCTURE ANTIGENIQUE. 33 à 35

VII. BACTERIOCYNOTYPIE. 36

3ème PARTIE :

EPIDEMIOLOGIE. 37 à 60

I. CARACTERISTIQUES GENERALES. 38 à 44

I. 1. INCIDENCE. 38, 39

I. 2. MORTALITE. 39

I. 3. DUREE D'INCUBATION. 39

I. 4. DOSE INFECTANTE. 40

I. 5. FACTEURS DE RECEPTIVITE. 40 à 43

I. 6. REPARTITION. 43, 44

I. 6. 1. Dans l'espace géographique. 43

I. 6. 2. Dans le temps. 43, 44

II. RESERVOIRS. 44 à 47

II. 1. L'ENVIRONNEMENT. 44, 45

II. 2. LES DENREES ALIMENTAIRES. 46

II. 3. LES MALADES. 47

II. 4. LES PORTEURS DE GERMES CHRONIQUES, CONVALESCENTS, SAINS. 47

III. MODES DE CONTAMINATION. 48 à 53

III. 1. CONTAMINATION DIRECTE. 48 à 50

III. 1. 1. Contagion inter humaine. 48 à 50

III. 1. 2. Contagion inter animale. 50

III. 1. 3. Transmission de l'animal à l'homme. 50

III. 2. CONTAMINATION INDIRECTE. 50

IV. EVOLUTION. 54 à 60

IV. 1. SURVEILLANCE. 54 à 56

IV. 1. 1. En France. 54,55

IV. 1. 2. Dans les autres pays. 55, 56

IV. 2. CAS SPORADIQUES. 56

IV. 3. EPIDEMIES. 56 à 60
IV. 3. 1. Listérioses d'origine alimentaire. 56 à 58
IV. 3. 2. Listérioses nosocomiales. 58

4ème PARTIE :
PHYSIOPATHOLOGIE. 61 à 97

I. MECANISME DE LA MALADIE. 62 à 68
I. 1. PENETRATION DANS LES CELLULES. 63 à 65
I. 2. MULTIPLICATION CELLULAIRE. 66
I. 3. DISSEMINATION DE CELLULE A CELLULE. 66 à 68

II. FACTEURS DE VIRULENCE. 69 à 77
II. 1. HEMOLYSINE. 69 à 72
II. 2. AUTRES FACTEURS. 72 à 77

III. REPONSE IMMUNITAIRE. 77

IV. POUVOIR PATHOGENE NATUREL. 77 à 95
IV. 1. CHEZ L'ANIMAL. 77 à 82
IV. 1. 1. Bovins adultes. 78
IV. 1. 2. Ovins. 78, 79
IV. 1. 3. Porcs. 79
IV. 1. 4. Rongeurs. 80
IV. 1. 5. Oiseaux. 80
IV. 1. 6. Chevaux. 80
IV. 1. 7. Volailles. 80
IV. 1. 8. Lamas. 80
IV. 2. CHEZ L'HOMME. 82 à 95
IV. 2. 1. Sujets et terrains à risque. 82, 83

IV. 2. 2. Listériose de l'adulte. 83 à 89
IV. 2. 2. 1. Infections du système nerveux central ou atteinte neuroméningée. 83 à 87
IV. 2. 2. 1. 1. Symptomatologie. 84 à 87
IV. 2. 2. 1. 2. Evolution. 87
IV. 2. 2. 2. Autres infections listériennes. 87 à 89
IV. 2. 2. 2. 1. Les septicémies. 87
IV. 2. 2. 2. 2. Les atteintes cardio-vasculaires. 88
IV. 2. 2. 2. 3. L'hépatite. 88
IV. 2. 2. 2 .4. Autres troubles. 89
IV. 2. 3. Listérioses materno-fœtales. 90 à 95
IV. 2. 3. 1. Listériose de la femme enceinte. 90, 91
IV. 2. 3. 2. Transmissions mère-fœtus. 92
IV. 2. 3. 3. Listériose néonatale. 93 à 95
IV. 2. 3. 3. 1. Symptomatologie. 93, 94
IV. 2. 3. 3. 1. 1. La forme septicémique. 93, 94
IV. 2. 3. 3. 1. 2. La méningite. 94
IV. 2. 3. 3. 1. 3. Les formes respiratoires. 94
IV. 2. 3. 3. 1. 4. Autres formes. 94
IV. 2. 3. 3. 2. Evolution. 94, 95

V. POUVOIR PATHOGENE EXPERIMENTAL. 95 à 97
V. 1. VOIE CONJONCTIVALE. 95
V. 2. VOIE INTRAVEINAUSE. 95
V. 3. VOIE SOUS-CUTANEE. 96
V. 4. VOIE INTRAPERITONEALE. 96
V. 5. VOIE ORALE. 96
V. 6. VOIE CEREBRALE. 96

5ème PARTIE :
DIAGNOSTIC. 98 à 114

I. SIGNES DE SUSPICION. 99, 100

II. DIAGNOSTIC DES DIFFERENTES LISTERIOSES. 101 à 103
II. 1. LISTERIOSE DE L'ADULTE. 101, 102
II. 2. LISTERIOSE DE LA FEMME ENCEINTE. 102, 103
II. 3. LISTERIOSE DU NOUVEAU-NE. 103

III. IDENTIFICATION. 103 à 114
III. 1. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE. 103 à 105
III. 1. 1. Examen direct après coloration de Gram. 103
III. 1. 2. Mise en culture et identification. 104 à 105
III. 1. 3. Méthodes rapides. 105
III. 2. CARACTERISATION. 105 à 112
III. 2. 1. Méthodes phénotypiques. 105 à 111
III. 2. 1. 1. Sérotypie. 106
III. 2. 1. 2. Lysotypie. 107 à 111
III. 2. 2. Méthodes de typage moléculaire. 111, 112
III. 3. DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE. 113, 114

6ème PARTIE :
TRAITEMENT. 115 à 125

I. BASE BACTERIOLOGIQUE ET PHARMACOCINETIQUE DU CHOIX DES ANTIBIOTIQUES. 116 à 122
I. 1. ASPECT BACTERIOLOGIQUE OU SENSIBILITE. 116 à 120
I. 2. ASPECT PHARMACOCINETIQUE. 120 à 122

II. TRAITEMENTS DES DIFFERENTES SITUATIONS CLINIQUES. 122 à 125
II. 1. LISTERIOSE NEUROMENINGEE. 122, 123
II. 2. SEPTICEMIE A LISTERIA. 123
II. 3. LISTERIOSE NEONATALE. 123, 124
II. 4. LISTERIOSE DE LA FEMME ENCEINTE. 124, 125
II. 5. LISTERIOSE DE L'IMMUNODEPRIME. 125

7ème PARTIE :

PROPHYLAXIE. 126 à 133

I. MEDICALE. 127, 128

I. 1. VACCINATION. 127

I. 2. IMMUNITE. ALLERGIE. 127

I. 3. PREVENTION DE L'INFECTION GRAVIDIQUE. 127, 128

II. SANITAIRE. 128 à 133

II. 1. MESURES PARTICULIERES. 128 à 131

II. 2. MESURES GENERALES. 131 à 133

8ème PARTIE :

LISTERIA DANS LES DENREES ALIMENTAIRES. 134 à 257

I. CONTAMINATION DES DENREES ALIMENTAIRES. 135 à 143

I. 1. ORIGINE. 135 à 137

I. 2. FREQUENCE. 137 à 143

I. 2. 1. Produits carnés. 137 à 143

I. 2. 2. Produits laitiers. 143

I. 2. 3. Produits de la mer. 143

I. 2. 4. Végétaux. 143

II. INCIDENCE ET CROISSANCE
DANS LES DENREES ALIMENTAIRES. 144 à 162

II. 1. PRODUITS CARNES. 144 à 152

II. 2. LAIT ET PRODUITS LAITIERS. 152 à 156

II. 3. PRODUITS DE LA MER. 157, 158

II. 4. ŒUFS. 158, 159

II. 5. VEGETAUX. 159 à 162

III. THERMORESISTANCE. 162 à 166

III. 1. DANS LE LAIT. 162 à 165

III. 2. DANS LA VIANDE. 165,166

IV. CONGELATION. 166 à 168

V. CONTROLE DE LA CROISSANCE ET EFFETS ANTILISTERIA. 168 à 171

VI. METHODES D'ISOLEMENT ET DE DETECTION. 171 à 225

VI. 1. METHODES CONVENTIONNELLES. 171 à 201

VI. 1. 1. Enrichissement. 172

VI. 1. 2. Isolement. 172 à 175

VI. 1. 3. Confirmation du genre et identification de l'espèce. 175 à 187

VI. 1. 3. 1. Caractérisation biochimique et morphologique. 175 à 187

VI. 1. 3. 1. 1. Méthodes classiques. 176 à 179

- Tests de confirmation du genre. 176 à 177

- Tests d'identification d'espèce. 177 à 179

VI. 1. 3. 1. 2. Méthodes rapides. 179 à 187

- Galerie API 50CH. 179

- Système MAST-ID. 179,180

- Galerie API Listeria. 180 à 182

- MICRO-ID. 182

- AutoMicrobic. 183, 184

- RAP-ID. 184 à 187

VI. 1. 3. 2. Caractérisation phénotypique. 187

VI. 1. 3. 2. 1. Sérotypie. 187

VI. 1. 3. 2. 2. Lysotypie. 187

VI. 1. 4. Méthodes référencées. 187 à 201

VI. 1. 4. 1. Procédé à froid (CE). 188 à 190

VI. 1. 4. 2. Méthode FDA de LOVETT. 190, 191

VI. 1. 4. 3. Méthode USDA de McCLAIN et LEE. 191, 192

VI. 1. 4. 4. Comparaison des méthodes FDA et USDA. 192, 193

VI. 1. 4. 5. Comparaison des méthodes FDA et USDA avec le procédé CE. 194

- FDA et CE. 194

- USDA et CE. 194
- FDA, USDA et CE. 194
VI. 1. 4. 6. Etude comparative de trois protocoles de recherche de Listeria monocytogenes et Listeria spp. 194 à 198
VI. 1. 4. 7. Méthodes référencées en FRANCE. 198 à 201
VI. 2. METHODES RAPIDES. 201 à 221
VI. 2. 1. Méthodes immunologiques ou immunoenzymatiques. 201 à 205
VI. 2. 1. 1. Kits ELISA. 202, 203
- Kit Listeria Tek. 202, 203
- Kit Listeria Tecra. 203
VI. 2. 1. 2. TRANSIA. 203, 204
VI. 2. 1. 3. VIDAS Listeria (LIS). 204, 205
VI. 2. 2. Méthodes de typage moléculaire. 205 à 221
VI. 2. 2. 1. Méthodes basées sur l'ADN. 205 à 219
VI. 2. 2. 1. 1. Tests d'hybridation. 205 à 212
- Méthode conventionnelle. 205 à 207
- Méthode soustractive. 207
- Dosage de protection homogène en chimioluminescence (HPA). 208, 209
- Hybridation directe sur HGMF (Hydrophobic grid-membrane filter). 209
- Test Gene-Trak. 209, 210
- Test Gen-Probe. 210, 211
- ELISA-HNA. 211
- Hybridation DNA-DNA "optique". 211
VI. 2. 2. 1. 2. Analyse de restriction enzymatique (REA). 212 à 213
VI. 2. 2. 1. 3. Polymorphisme d'ADN ou PCR. 213 à 219
- PCR simple. 213, 214
- PCR immunomagnétique. 214, 215
- PCR dans laquelle une des amorces est biotinylée et la digoxigénine-11-dUTP est incorporée durant l'élongation. 215, 216
- PCR + LCR. 216
- PCR + REA appliquée aux RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). 217

- PCR + RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA). 218
VI. 2. 2. 1. 4. Typage des plasmides. 218, 219
VI. 2. 2. 2. Ribotypage. 219, 220
VI. 2. 2. 3. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE). 220, 221
VI. 3. AUTRES METHODES. 221 à 225
VI. 3. 1. Typage des monocines. 221
VI. 3. 2. Séparation immunomagnétique (IMS). 221, 222
VI. 3. 3. Cytométrie en flux (Flow Cytometry ou FCM). 222 à 224
VI. 3. 4. Biolumiscence (ATPmétrie). 224
VI. 3. 5. Impédancemétrie. 224
VI. 3. 6. Caractérisation de la listériolysine O. 225
VI. 3. 7. Activité Phospholipase C. 225

VII. MAÎTRISE DE LISTERIA MONOCYTOGENES. 226 à 257
VII. 1. NIVEAU ZERO EN LISTERIA : UNE SITUATION IRREALISTE. 226
VII. 2. CLASSIFICATION DES PRODUITS EN FONCTION DU "DANGER LISTERIA". 226 à 229
VII. 2. 1. Viandes et préparations de viande. 226, 227
VII. 2. 2. Produits crus à consommer en l'état. 227
VII. 2. 3. Produits conditionnés ayant reçu un traitement thermique dans leur conditionnement. 228
VII. 2. 4. Produits assainis par un traitement thermique et sujets à recontamination. 228, 229
VII. 3. REGLEMENTATION ET RECOMMANDATIONS. 229 à 241
VII. 3. 1. En France. 229
VII. 3. 2. Mesures nationales prises par certains états. 229 à 232
VII. 3. 2. 1. Suisse. 229, 230
VII. 3. 2. 2. Italie. 230
VII. 3. 2. 3. Canada. 231
VII. 3. 2. 4. Grande-Bretagne. 231
VII. 3. 2. 5. Allemagne. 232

VII. 3. 3. Réflexions de l'O.M.S. 232 à 235
VII. 3. 3. 1. Recommandations aux autorités sanitaires pour assurer la protection du consommateur. 232 à 234
VII. 3. 3. 2. Recommandations aux industries alimentaires. 234, 235
VII. 3. 4. Recommandations du Comité National d'Orientation sur les critères microbiologiques. 235 à 241
VII. 4. MOYENS DE LUTTE. 241 à 257
VII. 4. 1. Surveillance de l'environnement. 242 à 243
VII. 4. 2. Méthode HACCP. 242 à 248
VII. 4. 2. 1. Étape préliminaire. 244
VII. 4. 2. 2. Analyse des dangers. 245
VII. 4. 2. 3. Points critiques pour la maîtrise (PCM). 245, 248
VII. 4. 2. 4. Surveillance. 248
VII. 4. 2. 5. Evaluation de l'efficacité. 248
VII. 4. 3. Autres méthodes. 248 à 251
VII. 4. 3. 1. Lors de la préparation. 248 à 251
VII. 4. 3. 2. Lors de la commercialisation. 251
VII. 4. 3. 3. Lors de la conservation. 251
VII. 4. 4. Décontamination des aliments. 251 à 257

9ème PARTIE :

BESOINS DE LA RECHERCHE. 258 à 261

I. EPIDEMIOLOGIE. 259

II. VIRULENCE. PATHOGENICITE. 259, 260

III. METHODOLOGIE. 260

IV. CONTAMINATION DES DENREES CRUES ET ELABOREES. 260

V. ROLE DES TECHNIQUES DE FABRICATION. 261

VI. ROLE DES FACTEURS EXTRINSEQUES ET INTRINSEQUES. 261

VII. LISTERIA AUTRES QUE LISTERIA MONOCYTOGENES. 261

CONCLUSION. 262 à 264

ANNEXES

ANNEXE I :

Interprétation des données des analyses pour l'identification des espèces.

Toutes les espèces *Listeria* se présentent sous forme de petits bacilles Gram positif et leur mobilité est observée par examen d'un état frais et en milieu SIM. Elles sont catalase positive, n'hydrolysent pas l'urée et acidifient la pente et le culot d'une gélose TSI sans produire d'H_2S. Elles utilisent le mannitol, le rhamnose et xylose, avec production d'acide. Toutes les espèces, exceptée *L. denitrificans* (qui présente des réactions +/-) donnent des réactions +/+ en bouillon MR-VP (tests au rouge de méthyle et test de Voges-Proskauer).

Une culture utilisant le mannitol avec production d'acide correspond à *L. grayi* ou *L. murrayi*. La différenciation entre ces deux espèces est basée sur la réduction du nitrate: *L. murrayi* réduit le nitrate.

Une culture réduisant le nitrate peut correspondre à l'espèce *L. murrayi* ou *L. denitrificans*. L'utilisation du mannitol peut différencier ces deux espèces, *L. denitrificans* n'utilise pas le mannitol. De plus, *L. denitrificans* présente une réaction MR-VP différente.

L. monocytogenes, L. ivanovii et L. seeligeri (faiblement) produisent une hémolyse lors d'un ensemencement en piqûre dans la gélose au sang de mouton. Parmi ces 3 espèces, seule *L. monocytogenes* n'utilise pas le xylose et présente une réaction au rhamnose positive.
La difficulté concernant la différenciation entre *L. ivanovii* et *L. seeligeri* peut être résolue par l'épreuve de Camp ou le pouvoir pathogène sur la souris. *L. seeligeri* n'est pas pathogène pour la souris et présente une exaltation de l'hémolyse à proximité de la strie de *Staphylococcus*.

L. ivanovii est pathogène pour la souris et montre une exaltation de l'hémolyse à proximité de la strie de *Rhodococcus*. Parmi les espèces non hémolytiques, *L. innocua* peut donner des réactions rhamnose-xylose semblables à *L. monocytogenes*, mais n'est pas pathogène pour la souris. *L. innocua* est la seule espèce donnant parfois des résultats négatifs à la fois pour le rhamnose et le xylose. *L. welshimeri* qui est rhamnose négatif peut être confondue avec une souche de *L. seeligeri* faiblement hémolytique jusqu'à l'application de l'épreuve de Camp.

Lorsque tous les résultats sont disponibles, le sérotypage des cultures devient indispensable.

ANNEXE II :

Listériose en France en 1988, 1989 et 1990.

LA LISTÉRIOSE EN FRANCE EN 1988 :
étude à partir des souches adressées au centre national de référence

E. P. ESPAZE *, J. ROCOURT ** et A. L. COURTIEU *, Centre national de référence des *Listeria*

La surveillance épidemiologique de la listériose humaine est assurée en France [3] par un certain nombre d'organismes parmi lesquels figurent le Centre national de référence des *Listeria* (C.N.R.) et le Centre international de Lysotypie des *Listeria* (C.I.L.L.). La fonction essentielle de ces deux laboratoires est d'assurer la caractérisation des souches de *L. monocytogenes* par l'identification et la détermination du sérovar (C.N.L.) et du phagovar (C.I.L.L.). Les échanges hebdomadaires de souches et d'informations entre les deux laboratoires permettent donc une analyse régulière de l'évolution de cette infection.

En 1988, 2 699 souches de *Listeria* ont été adressées au C.N.R. soit une augmentation de 57 % du nombre de souches par rapport à 1987 [2] et de 111 % par rapport à 1986 [1]. L'origine de ces souches est la suivante : homme, 390 souches; animal, 111 souches, environnement, 105 souches; aliments et industrie alimentaire, 1 888 souches. Ce dernier chiffre, considérable et en constante augmentation depuis 1986, témoigne des préoccupations de l'industrie face à l'origine alimentaire de la listériose humaine.

1 CARACTÉRISTIQUE DES SOUCHES

1.1 Souches d'origine humaine

Les 390 souches reçues de France en 1988 correspondent à 390 cas de listériose, soit une augmentation de 7 % par rapport à 1987. Toutes les souches isolées appartiennent à l'espèce *L. monocytogenes* confirmant une nouvelle fois que seule cette espèce constitue un danger potentiel pour la santé publique.

Répartition géographique : pour la première fois cette année, des souches ont été adressées de toutes les régions de la France continentale traduisant l'intérêt général suscité par la listériose et permettant d'avoir une vision plus globale de son épidémiologie.

Répartition mensuelle : pour la première fois également, il a été possible de recueillir la totalité des dates d'isolement des souches. La répartition mensuelle globale des isolements est caractérisée par un nombre élevé de cas pendant les sept premiers mois de l'année, avec trois périodes d'augmentation perceptibles en janvier, mars et mai-juin-juillet.

Cette courbe de distribution des isolements diffère de celle observée en 1987 (fig. 1).

Répartition selon les formes cliniques :

La listériose foeto-maternelle (femmes enceintes et nouveau-nés) : 169 cas.

Mères ou femmes enceintes : 66 cas. Sang : 47, placenta : 57, prélèvement vaginal et lochies : 15.

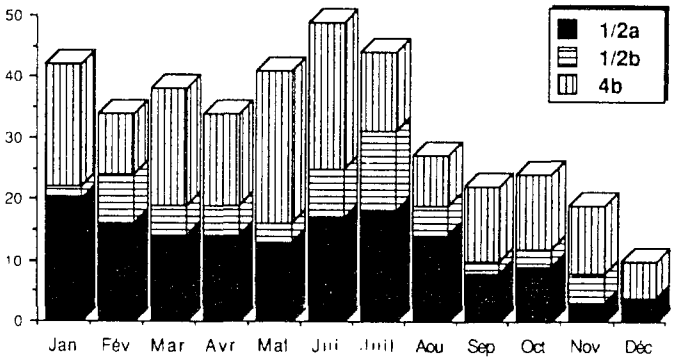
Nouveau-nés : 99 cas. L.C.R. : 14, sang : 37, liquide gastrique : 71, méconium ou selles : 41. La répartition selon le sexe est la suivante : sexe masculin : 54 %, sexe féminin : 46 %.

Souches reçues avec des informations insuffisantes : 4.

La listériose de l'enfant et de l'adulte : 221 cas.

L'inégale répartition des cas selon le sexe (sexe masculin : 64 %, sexe féminin : 36 %) est conforme à celle des années passées [1, 2]. Les tableaux cliniques se répartissent en méningites et/ou méningo-encéphalites isolées (45 %), associées à des septicémies (21 %) et en septicémies isolées (69 %). Les terrains les plus souvent retrouvés sont l'éthylisme, les cancers, les hémopathies, les traitements immunosuppresseurs, le diabète et les greffes d'organes. Une association listériose-SIDA a été signalée dans deux cas.

Figure 1
Répartition mensuelle des sérovars de *L. monocytogenes* isolées de 390 cas de listériose humaine en 1988



1.2. Souches d'origine alimentaire

2 305 souches d'origine non humaine ont été adressées au C.N.L. en 1988, soit une augmentation de 75 % par rapport à l'année précédente. Ce chiffre rend compte du fait que suite aux problèmes suscités par l'origine alimentaire de la listériose humaine, les denrées alimentaires font l'objet de nombreux contrôles dans notre pays.

Ne seront considérées ici que les 1 888 souches, adressées après isolement à partir de produits destinés à la consommation humaine et pourvues d'informations suffisantes quant à leur origine. Leur distribution selon les espèces est la suivante : *L. monocytogenes :* 1 221 souches, *L. innocua :* 609 souches, *L. seeligeri :* 34 souches et *L. welshimeri :* 24 souches. *L. monocytogenes* et *L. innocua* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées dans les denrées alimentaires, comme cela est aussi observé dans les autres pays.

2. ANALYSE DES SÉROVARS

2.1 Souches d'origine humaine

Les sérovars 1/2 *a*, 1/2 *b* et 4 *b* constituent à eux seuls 98,5 % des souches isolées (tabl. 1), les autres sérovars n'étant que très exceptionnellement rencontrés en pathologie humaine. En revanche, il est remarquable de constater

* Laboratoire de bactériologie, U.F.R. de médecine, 1, rue Gaston-Veil, 44035 Nantes Cedex et Unité d'écologie bactérienne.
** Institut Pasteur, 25 rue du Docteur-Roux, 75015 Paris.

que le sérovar 4 *b*, largement prédominant depuis l'ouverture du C.N.R. en 1982, enregistre un net recul en 1988 et ne représente plus que 45 % de la totalité des souches contre 63 % en 1987 ; à l'opposé, une nette augmentation du sérovar 1/2 *a* de 22 % à plus de 38 % est observée.

Tableau 1

Évolution des sérovars de *L. monocytogenes* isolées dans les cas de listériose humaine en 1986 (335 cas), 1987 (366 cas) et 1988 (390 cas)

Sérovars	1986	1987	1988
	%	%	%
1 2 *a*	15	22	38,5
1 2 *b*	14	13	15
4 *b*	69	63	45
Autres	2	2	1,5

Répartition géographique des sérovars : la distribution géographique selon le sérovar n'est pas homogène, montrant une grande variation d'une région à l'autre et une certaine tendance générale à la baisse des pourcentages du sérovar 4 *b* par rapport à ceux enregistrés en 1987. Rares sont les régions pour lesquelles ceux-ci dépassent 60 % (Alsace 65 %, Centre 79 %, Languedoc 78 % et Provence - Côte d'Azur 70 %). Les pourcentages du sérovar 4 *b* sont faibles en Haute-Normandie 18 %, Île-de-France 27 %, Limousin 37 %, Nord et Pays de la Loire 38 %. Dans certaines régions le pourcentage de sérovars 4 *b* et celui des autres sérovars sont totalement inversés par rapport à 1987 (Bretagne où il passe de 85 % à 45 %, Champagne - Ardenne de 81 à 43 %, Limousin de 80 à 37 % et Poitou-Charentes de 69 à 33 %). En général, dans la plupart des régions, le pourcentage de 4 *b* décroît par rapport à l'an passé. Toutefois, d'autres régions présentent une évolution inverse. Il en est ainsi pour l'Aquitaine et la Basse-Normandie où les pourcentages de sérovar 4 *b* passent respectivement de 36 % à 59 % et de 33 % à 54 % (fig. 2).

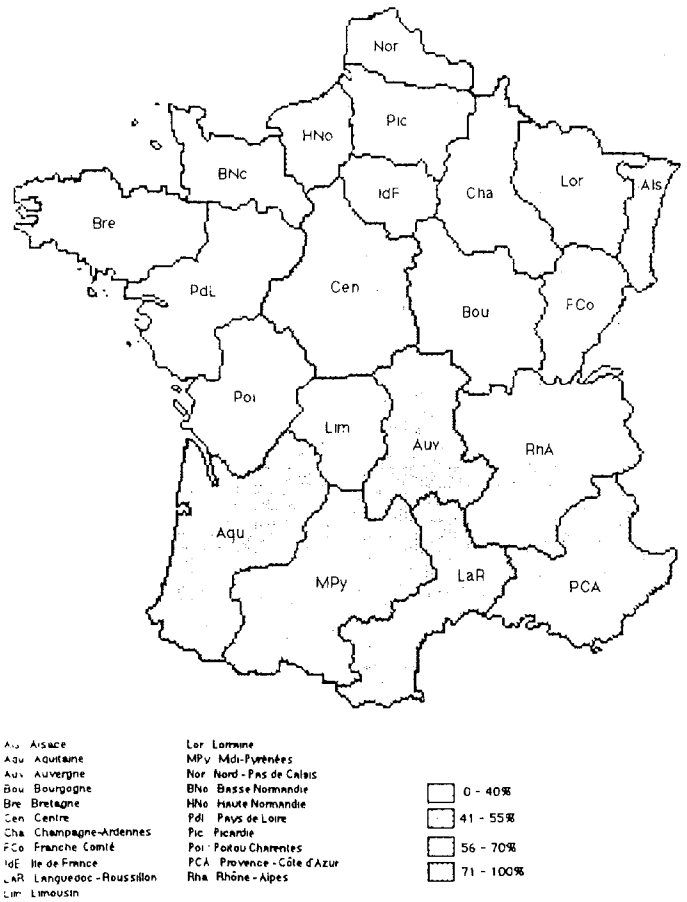
Répartition mensuelle des sérovars : plusieurs pics ont été observés à des époques différentes selon les sérovars : 1/2 *a* en janvier et juillet, 1/2 *b* en février et juillet, 4 *b* en janvier, mars et mai-juin (fig. 1).

2.2. Souches d'origine alimentaire

La répartition des sérovars de *L. monocytogenes* pour les produits carnés, les laits et les fromages est rapportée dans le tableau 2. L'étude de la répartition

Figure 2

Répartition régionale du sérovar 4 *b* de *L. monocytogenes* isolées dans 390 cas de listériose humaine en 1988



des sérovars de *L. monocytogenes* montre que 78 % des souches appartiennent au sérogroupe 1/2, contre seulement 18 % pour le sérovar 4 *b*. Cette importante proportion des souches de sérogroupe 1/2 dans les denrées alimentaires est tout à fait comparable aux chiffres obtenus en 1987 et ne peut donc expliquer à elle seule l'apparition brutale en 1988 du grand nombre de cas de listériose de ce sérogroupe.

Tableau 2

Répartition en pourcentages des sérovars de 1 185 souches de *L. monocytogenes* provenant de produits alimentaires destinés à la consommation humaine

Sérovars	Produits carnés	Laits	Fromages
	246 souches	183 souches	756 souches
	%	%	%
1 2 *a*	22	69	52
1 2 *b*	10	12	18
1 2 *c*	41	3	8
3 *a*	3		
3 *b*	1	1	4
3 *c*	1		
4 *b*	22	14	18
4 *c*		1	

3. ANALYSE DES LYSOVARS

3.1. Souches d'origine humaine

66 % des souches françaises d'origine humaine isolées en 1988 étaient typables, pourcentage supérieur de 8 % à ceux obtenus en France en 1987. Ce pourcentage demeure toutefois inférieur à celui obtenu dans d'autres pays durant la même période et pour la même catégorie de souches. Le pourcentage de souches typables varie également selon le sérovar : 1/2 *a*, 75 %, 1/2 *b*, 24 % ; 4 *b*, 71 %. Si la lysotypie est un typage particulièrement discriminant et donc utile lors d'enquêtes épidémiologiques, ce fort taux de souches non typables constitue parfois un handicap ; ce fut notamment le cas lors d'une bouffée épidémique regroupant 10 cas survenus dans la région parisienne, pour laquelle les souches isolées ne purent être typées par les phages avec cette méthode [3].

L'analyse des lysovars de ces souches montre, comme en 1987, une grande variété, ce qui suggère que la listériose humaine a principalement sévi sous forme de cas sporadiques. Certains lysovars rassemblent de deux à une dizaine de souches, sans qu'aucune association géographique ou temporelle puisse être mise en évidence.

Toutefois, trois lysovars ont été plus fréquemment retrouvés (un pour le sérovar 4 *b* et deux pour le sérovar 1/2 *a*). La distribution mensuelle de ces souches permet de penser que la listériose humaine a été caractérisée en 1988 par plusieurs pics épidémiques causés chacun par une souche unique comportant de 15 à 28 cas : au moins 3 en janvier et mai et un autre entre juin et août. La répartition géographique de ces cas englobe plusieurs départements. L'ensemble de ces résultats évoque l'existence de cas groupés, davantage dans le temps que dans l'espace, ce qui complique notablement les enquêtes épidémiologiques comme ce fut récemment souligné [3].

3.2. Souches d'origine alimentaire

La confrontation des résultats de la lysotypie des souches d'origine humaine avec ceux des souches d'origine alimentaire ne peut apporter d'éléments significatifs en dehors d'enquêtes épidémiologiques précises. En effet, la caractéristique de la lysotopie étant de grouper spécifiquement les souches à l'intérieur d'un même sérovar, associée par ailleurs à une distribution inégale des sérovars des souches d'origine humaine et alimentaire, rendent difficile la mise en évidence d'un lien entre ces deux catégories de souches dans l'absolu. Toutefois, la constitution d'une telle banque de données s'avère particulièrement utile lors de l'émergence d'une bouffée épidémique [3].

4. CONCLUSION

En matière de listériose humaine, l'année 1988 a donc été caractérisée par une inversion nette de la répartition des sérovars des souches : le sérovar 4 *b*, qui était en France et dans d'autres pays le sérovar dominant, n'a plus correspondu qu'à seulement 45 % des isolements. À notre connaissance, aucun phénomène similaire n'a été constaté dans d'autres pays durant cette période. L'observation de bouffées épidémiques causées par des souches du sérogroupe 1/2, plus nombreuses qu'auparavant, pourrait expliquer, tout au moins partiellement, cette répartition peu habituelle. La caractérisation fine des souches de *L. monocytogenes* responsables d'infections humaines ainsi que la centralisation des résultats apparaissent donc comme des éléments essentiels de la surveillance de la listériose humaine à l'échelle nationale. Aussi, convient-il de souligner combien l'envoi régulier au C.N.R. des souches de *L. monocytogenes* isolées par les biologistes est fondamental pour cette surveillance. Qu'ils en soient ici remerciés.

LITTÉRATURE CITÉE

[1] Espaze, E.P., Courtieu, A. L. **Rapport du Centre national de référence des *Listeria* 1986.** *Bull. épidemiol. hebd.* : 1987, 39, 153-155.

[2] Espaze, E.P., Rocourt, J., Courtieu, A. L. **La listériose en France en 1987. Étude à partir des souches adressées au Centre national de référence.** *Bull. epidemiol. hebd.* : 1989, 12, 46-47

[3] Lemagny F., Rebiere I., Rocourt J., Hubert B. **Listériose humaine : enquête épidémiologique de deux épisodes épidémiques en France, en 1988 et 1989.** *Bull. epidemiol. hebd.* : 1989, 38, 162-163

LA LISTÉRIOSE EN FRANCE EN 1989

Étude à partir des souches adressées au centre national de référence.

ESPAZE E.P.*, ROCOURT J.** et COURTIEU A.L.*

La surveillance épidémiologique de la listériose humaine est assurée en France par un certain nombre d'organismes parmi lesquels figurent le Centre National de Référence des *Listeria* (CNL) et le Centre National de Lysotypie et de Typage moléculaire des *Listeria* (IP). La fonction essentielle de ces deux laboratoires est d'assurer la caractérisation des souches de *L. monocytogenes* par l'identification et la détermination du sérovar (CNL) et du phagovar (IP). Les échanges hebdomadaires de souches et d'informations entre les deux laboratoires permettent donc une analyse régulière de l'évolution de cette infection.

En 1989, mille six cent quatre-vingts souches de *Listeria* ont été adressées au CNR. L'origine de ces souches est la suivante : homme, 420 souches ; animal, 70 souches ; environnement, 47 souches ; aliments et industrie alimentaire, 989 souches. Une souche provenait de l'alimentation animale et 143 souches d'origine non humaine nous étaient adressées sans informations.

I. CARACTÉRISTIQUE DES SOUCHES

1.1. Souches d'origine humaine

Parmi les souches reçues, 416 ont été isolées en France en 1989, correspondant à 416 cas de listériose, soit une augmentation de 7 % par rapport à 1988. Toutes les souches isolées appartiennent à l'espèce *L. monocytogenes* confirmant une nouvelle fois que seule cette espèce constitue un danger potentiel pour la santé publique.

– **Répartition géographique :** ces souches ont été adressées des 23 régions françaises et des DOM-TOM, les régions les plus peuplées fournissant le plus grand nombre de cas.

– **Répartition mensuelle :** la répartition mensuelle globale des isolements se caractérise par le petit nombre de cas retrouvés pendant le premier trimestre de l'année, particulièrement en janvier et février. Deux pics apparaissent l'un en avril, mai, juin, juillet qui culmine en juin et l'autre en octobre et novembre. La courbe de distribution mensuelle des isolements diffère de celle observée en 1988. (Fig. 1).

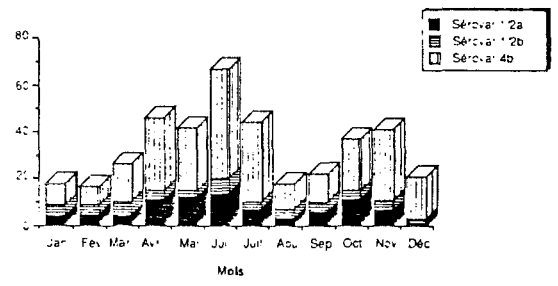


Figure 1

Répartition mensuelle des sérovars de *L monocytogenes* isolées en 1989 de 416 cas de listériose humaine.

– **Répartition selon les formes cliniques :**

La listériose foeto-maternelle (femmes enceintes et nouveau-nés) : 200 cas.

– Mères ou femmes enceintes : 93 cas. Sang : 55, placenta : 62, prélèvement vaginal ou lochies : 15.

– Nouveau-nés : 106 cas. LCR : 14, sang : 43, liquide gastrique : 71, méconium ou selles : 41. La répartition selon le sexe est la suivante : sexe masculin : 54 %, sexe féminin : 46 %.

– Souches reçues avec des informations insuffisantes : 1.

La listériose de l'enfant et de l'adulte : 215 cas.

L'inégale répartition des cas selon le sexe (sexe masculin : 64 %, sexe féminin : 36 %) est conforme à celle des années passées (1, 2). Les tableaux cliniques se répartissent en méningites et/ou méningo-encéphalites isolées (28 %) ou associées à des septicémies (23 %) et en septicémies isolées (47 %). Les terrains les plus souvent retrouvés sont les cancers, l'éthylisme, les traitements immuno-suppresseurs, les greffes d'organes, les hémopathies et le diabète et une association listériose-SIDA a été signalée dans 7 cas.

Une souche reçue sans aucun renseignement n'a pu être classée dans aucune des formes cliniques précédemment envisagées.

1.2. Souches d'origine alimentaire

Parmi les souches d'origine non humaine adressées au CNL en 1988, douze cent soixante ont pu être étudiées rendant compte du fait que les denrées alimentaires font l'objet de nombreux contrôles dans notre pays.

Ne seront considérées ici que les 957 souches, adressées après isolement à partir de produits destinés à la consommation humaine et pourvues d'informations suffisantes quant à leur origine. Leur distribution selon les espèces est la suivante : *L. monocytogenes* : 627 souches, *L. innocua* : 275 souches, *L. seeligeri* : 34 souches, *L. welshimeri* : 14 souches, *L. ivanovii* : 4 souches et *L. grayi* : 1 souche. *L. monocytogenes* et *L. innocua* demeurent les espèces les plus fréquemment rencontrées dans les denrées alimentaires, comme cela est aussi observé dans les autres pays.

II. ANALYSE DES SÉROVARS

2.1. Souches d'origine humaine

Les sérovars 1/2 a, 1/2 b et 4 b constituent à eux seuls 96 % des souches isolées (tableau 1), les autres sérovars n'étant que très rarement rencontrés en pathologie humaine. Le sérovar 4 b, largement prédominant depuis l'ouverture du CNR en 1982, mais qui avait enregistré un net recul en 1988 ne représentant plus que 45 % de la totalité des souches (2) contre 63 % en 1987 (1), remonte à 64 % en 1989. Le sérovar 1/2 a qui représentait 38 % des souches en 1988 n'en représente plus que 20 % en 1989.

– **Répartition géographique des sérovars**

La distribution géographique des sérovars n'est pas homogène, variant d'une région à l'autre. Contrairement à l'an passé, de nombreuses régions, une quinzaine au moins, ont des pourcentages d'isolement du sérovar 4 b supérieur à 60 %.

* Centre National de Référence de Lysotypie et de Typage moléculaire des *Listeria*. Laboratoire de Bacteriologie UFR de Médecine 1, rue Gaston-Veil, 44035 Nantes cedex.
** Centre National de Référence de Lysotypie et de Typage moléculaire des *Listeria*. Département de Bactériologie et de Mycologie. Institut Pasteur, 25 rue du Dr-Roux, 75015 Paris.

Tableau 1

Évolution des pourcentages des différents sérovars de *L. monocytogenes* isolées dans les cas de listériose humaine en 1987 (366 cas), 1988 (390 cas) et 1989 (416 cas).

Sérovars	1987	1988	1989
1 2a	22*	38,5	20
1 2b	13	15	12
4b	63	45	64
Autres	2	1,5	4

* Pourcentage

Parmi les régions pour lesquelles un nombre suffisant de souches a été isolé, les pourcentages les plus élevés de sérovar 4 b se retrouvent en Languedoc-Roussillon (100 %), Limousin (86 %), Alsace (75 %), Bourgogne (75 %) et Provence-Alpes-Côte d'Azur (74 %). Toutefois ils sont bas pour le Centre (17 %) et pour Poitou-Charentes (18 %).

Pour certaines régions le pourcentage de sérovar 4 b et ceux des autres sérovars s'inversent totalement par rapport à 1988. Il en est ainsi pour Bretagne (71/45), Champagne (64/43), Haute-Normandie (75/18), Ile-de-France (52/27), Limousin (86/37), Lorraine (71/43), Midi-Pyrénées (67/43), Nord (69/38) et Rhône-Alpes (67/48). Le pourcentage de sérovar 4 b reste bas en Pays de la Loire (42/38) et continue de baisser en Poitou-Charentes (18/33) (figure 2).

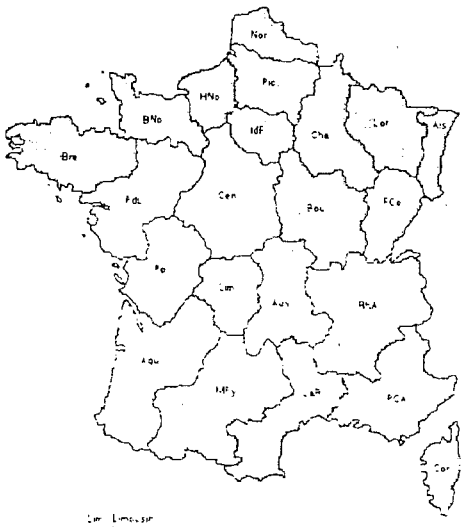


Figure 2

Répartition régionale du sérovar 4b de *L. monocytogenes* isolées dans 416 cas de listériose humaine en 1989.

– **Répartition mensuelle des sérovars** : les pics des divers sérovars concordent avec ceux de la distribution générale des isolements et sont retrouvés en avril, mai, juin, juillet d'une part et en octobre, novembre d'autre part. (figure 1).

2.2. Souches d'origine alimentaire

La répartition des sérovars de *L. monocytogenes* pour les produits carnés, les laits et les fromages est rapportée dans le tableau 2. L'étude de la répartition des sérovars de *L. monocytogenes* montre que 70 % des souches appartiennent au sérogroupe 1/2, contre seulement 14 % pour le sérovar 4 b. Le sérovar 3 b a été retrouvé dans 12 % des isolements. Le sérovar 1 2 c est le sérovar dominant retrouvé dans 42 % des isolements.

Tableau 2

Répartition en pourcentages des sérovars de 589 souches de *L. monocytogenes* provenant de produits alimentaires destinés à la consommation humaine.

Sérovars	Produits carnés	Laits	Fromages
	91 souches	47 souches	451 souches
1 2a	38*	75	35
1 2b	5	13	21
1 2c	43	2	8
3a	1		4
3b			16
3c	1		1
4b	12	10	15

* Pourcentage

III. ANALYSE DES LYSOVARS

3.1. Souches d'origine humaine

51 % des souches françaises d'origine humaine isolées en 1989 ont été lysotypables, ce pourcentage variant selon les sérovars : 1/2 a : 73 %, 1/2 b : 27 %, 4 b : 50 %. Le pourcentage total est respectivement inférieur de 6 % et de 15 % aux résultats de 1987 et de 1988 (1, 2), s'avérant également inférieur à ceux obtenus pour les souches de même origine provenant, durant la même période, des pays étrangers.

Deux grands pics épidémiques ont été observés en 1989, principalement causés :

– l'un, situé entre la mi-mars et juillet, qui s'est caractérisé :

1) par l'émergence de souches du sérovar 2425 :

Les 15 infections provoquées par les souches de lysovar 2425 correspondaient à des formes cliniques variées, disséminées dans 12 départements différents. Onze cas ont fait l'objet d'investigations épidémiologiques immédiates par la Direction Générale de la Santé et le Laboratoire National de la Santé : interrogatoire précis recherchant une transmission alimentaire avec analyses cas témoins. Toutefois l'origine, possiblement commune de ces cas, puisque les souches étaient identiques quant au sérovar et au lysovar n'a pu être mise en évidence en raison d'un certain nombre d'éléments parmi lesquels : large dispersion géographique, trop courte durée du pic épidémique, trop faible nombre de cas (3).

2) l'émergence de souches du lysovar 1444-312 :
Les infections causées par le lysovar 1444-312 ont été essentiellement retrouvées dans les régions Provence-Alpes-Côte d'Azur et Rhône-Alpes.

3) enfin par une remarquable augmentation, durant cette même période, du nombre de cas de listériose, enregistrée à Strasbourg (4) : 14 cas entre le 30 mars et le 13 juillet, correspondant à 6-8 fois le nombre attendu en fonction des observations concernant les années précédentes. Cette bouffée épidémique s'est caractérisée par des souches de sérovars et de lysovars très variées. Ceci permet de penser que ces infections pourraient avoir des origines diverses et que l'apparition subite de ces divers cas en une courte période pourrait être liée à un ou plusieurs facteurs prédisposants non encore identifiés, hypothèse précédemment avancée par Schwartz et al. (5).

– l'autre, situé entre Septembre et Décembre, par des souches non lysotypables (responsables pour ce sérovar du faible pourcentage de souches lysotypables en 1989).

3.2 Souches d'origine alimentaire

Les souches de *Listeria* provenant de denrées alimentaires sont lysotypées afin de constituer une banque de données immédiatement exploitable lors de l'émergence d'une bouffée épidémique. Ces souches sont également surveillées afin de détecter l'éventuelle apparition en nombre anormal de souches appartenant à un lysovar précédemment observé lors d'une épidémie. Toutefois, la confrontation des résultats de la lysotypie des souches d'origine alimentaire avec ceux des souches d'origine humaine ne peut apporter d'éléments significatifs en dehors d'enquêtes épidémiologiques.

CONCLUSION

En 1988, la listériose humaine s'était caractérisée, en France, par une inversion nette de la répartition des sérovars des souches, le sérovar 4 b ne représentant plus que 45 % des isolements. Dès 1989, la situation antérieure s'est rétablie, le sérovar 4 b correspondant à 64 % des isolements contre 20 % pour le sérovar 1 2 a. La situation transitoirement observée en 1988 était probablement due à la survenue de plusieurs bouffées épidémiques causées par des souches appartenant au sérovar 1 2 a.

L'épidémiologie de la listériose en France, utilisant le sérovar et le lysovar comme moyen d'appréciation, apparaît comme étant extrêmement complexe. Observés à l'échelle nationale, les pics quoique distribués sur plusieurs départements apparaissent tributaires de l'émergence d'une ou plusieurs souches « épidémiques », tandis qu'à l'échelle locale une bouffée peut être causée par des souches très différentes comme en témoigne celle de Strasbourg (4). Parmi les systèmes assurant la surveillance de la listériose dans divers pays, celui dont nous disposons en France est particulièrement bien adapté ainsi qu'en témoigne l'analyse des bouffées épidémiques survenues en 1989. Si une de ces bouffées avait évolué en une épidémie, il est évident que cette dernière aurait pu être analysée dès son début.

LITTÉRATURE CITÉE

[1] Espaze, E.P., Rocourt, J., Courtieu, A.L. – **La listériose en France en 198[illegible] – Étude à partir des souches adressées au Centre National de Référence.** *B.E.H.* : 1989, 12, 46-47.

[2] Espaze, E.P., Rocourt, J., Courtieu, A.L. – **La listériose en France en 198[illegible] – Étude à partir des souches adressées au Centre National de Référence.** *B.E.H.* : 1990, 1, 1-2.

[3] Lemagny, F., Rebière, I., Rocourt, J., Hubert, B. – **Listériose humaine : enquête épidémiologique de deux épisodes épidémiques en France, en 1988 et 1989.** *B.E.H.* : 1989, 38, 162-163.

[4] Rocourt, J., Espaze, E.P., Minck, R., Catimel, B., Hubert, B., Courtieu, A.L. – **Cluster of listeriosis isolates with different serovar and phagovar characteristics.** *Lancet* : 1989, 2, 1217-1218.

[5] Schwartz, B., Hexter, D., Broome, C.V., Hightower, A.W., Hirschhorn, R.B., Porter, J.D., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Lorber, B., Faris, D.G. – **Investigation of an outbreak of listeriosis : new hypothesis for the etiology of epidemic Listeria monocytogenes infections.** *J. Infect Dis.*, 1989, 159, 680-385.

LA LISTÉRIOSE EN FRANCE EN 1990
Étude à partir des souches adressées au Centre national de référence

J. ROCOURT **, E. P. ESPAZE *, A. F. MIEGEVILLE *, B. CATIMEL *, A. L. COURTIEU *

La surveillance épidémiologique de la listériose humaine est assurée en France, depuis plusieurs années [1], par un certain nombre d'organismes parmi lesquels figurent le Centre national de référence des *Listeria* (C.N.R.) et le Centre national de lysotypie et de typage moléculaire des *Listeria* (C.N.L.T.M.L.). La fonction essentielle de ces 2 laboratoires est d'assurer la caractérisation des souches de *L. monocytogenes* par l'identification et la détermination du sérovar (C.N.L.) et du phagovar (C.N.R.L.T.M.L.). Les échanges hebdomadaires de souches et d'informations entre les 2 laboratoires permettent une analyse régulière de l'évolution de cette infection.

En 1990, 1 617 souches de *Listeria* ont été adressées et étudiées au C.N.R. L'origine de ces souches est la suivante : homme, 311 souches ; animal, 64 souches ; environnement, 191 souches ; aliments et industrie alimentaire, 1 036 souches.

CARACTÉRISTIQUE DES SOUCHES

Souches d'origine humaine

311 des souches reçues, ont été isolées en France en 1990 : 309 souches de *L. monocytogenes* correspondent à 309 infections et 2 souches de *Listeria innocua* isolées d'un prélèvement vaginal et d'un méconium n'ont aucune signification clinique. On observe donc une diminution de 25 % du nombre de cas par rapport à 1989 (N = 416). Il n'y a pas d'explication évidente à cela, aucun biais dans le recueil des souches n'ayant été observé et plus de 400 souches ayant été, par la suite, reçues en 1991.

Répartition géographique

Ces souches ont été adressées de 21 des régions françaises et des D.O.M.-T.O.M. Les régions les plus peuplées ont fourni, cette année encore, le plus grand nombre de souches.

Répartition mensuelle

La répartition mensuelle globale des isolements se caractérise par le petit nombre de cas observés pendant les 4 derniers mois de l'année. 2 pics ont été observés, l'un en janvier (25 cas) l'autre culminant en juin (22 cas). La courbe de distribution des isolements diffère de celle observée en 1989 (fig. 1).

Répartition selon les formes cliniques

La listériose fœto-maternelle (femmes enceintes et nouveau-nés) : 110 cas.

Mères ou femmes enceintes : 54 cas. Sang : 27, placenta : 47, prélèvement vaginal ou lochies : 11.

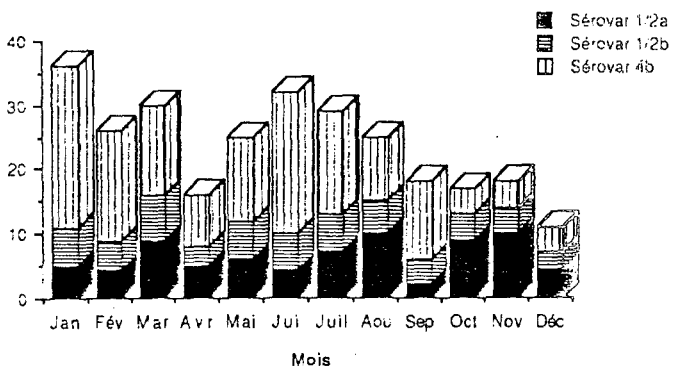
Nouveau-nés : 56 cas. L.C.R. : 7, sang : 20, liquide gastrique : 42, méconium ou selles : 18. La répartition selon le sexe est la suivante : sexe masculin : 47 %, sexe féminin : 53 %.

La listériose de l'enfant et de l'adulte : 196 cas.

L'inégale répartition des cas selon le sexe (sexe masculin : 62,5 %, sexe féminin : 37,5 %) est conforme à celle des années passées [1]. Les tableaux cliniques se répartissent en méningites et méningo-encéphalites isolées (27 %), ou associées à des septicémies (14 %), et en septicémies isolées (51 %). Les terrains les plus souvent communiqués sont les cancers (46 fois), les traitements immuno-suppresseurs (29 fois), l'éthylisme

Figure 1

Répartition mensuelle des sérovars de *L. monocytogenes* isolées en 1990 de 299 cas de listériose humaine



(24 fois), les hémopathies (14 fois), le diabète (13 fois) et les greffes d'organes (12 fois). Une association listériose-SIDA a été signalée 3 fois.

Il semble que la diminution des cas répertoriés en 1990, par rapport à 1989, correspondent essentiellement à une baisse des formes périnatales (110 contre 200), le nombre de formes de l'adulte évoluant peu (196 contre 215). 3 fois il n'a pas été possible, faute de renseignements, de classer les cas dans l'une des formes cliniques envisagées.

Souches d'origine alimentaire

Les 1 036 souches étudiées en 1990 par le C.N.L. rendent compte des nombreux contrôles dont font l'objet les denrées alimentaires dans notre pays. Ne seront considérées ici que 900 souches, adressées après isolement à partir de produits destinés à la consommation humaine pourvues d'informations suffisantes quant à leur origine. Ces souches appartiennent à 4 espèces, leur distribution est la suivante : *L. monocytogenes :* 620 souches, *L. innocua :* 233 souches, *L. seeligeri :* 22 souches, *L. welshimeri :* 26 souches. *L. monocytogenes* et *L. innocua* demeurent les espèces les plus fréquemment rencontrées dans les denrées alimentaires, comme cela est aussi observé dans les autres pays depuis de nombreuses années.

ANALYSE DES SÉROVARS

Souches d'origine humaine

Les sérovars 1/2a, 1/2b et 4b constituent à eux seuls 95 % des souches isolées, les autres sérovars n'étant que rarement rencontrés en pathologie humaine. Une nette modification de la répartition des sérovars est observée en 1990 par rapport à 1989 et 1988 : diminution du nombre de 1/2a par rapport à 1988 et diminution du nombre de 4b par rapport à 1988.

* Centre national de référence des *Listeria*. Laboratoire de bactériologie, U.F.R. de médecine, 1, rue Gaston-Veil, 44035 Nantes Cedex et Centre national de référence de lysotypie et de typage moléculaire des *Listeria*.
** Département de bactériologie et de mycologie, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris.

Répartition géographique des serovars

La distribution géographique des sérovars n'est pas homogène, variant d'une région à l'autre. L'année 1990 se caractérise par une diminution concernant la plupart des régions, du pourcentage de cas humains dus à *L. monocytogenes* 4b. Parmi les régions ayant adressé au moins 10 souches au C.N.L., seules Limousin, Alsace, Picardie et Rhône - Alpes, Haute-Normandie et Île-de-France présentent des pourcentages de sérovars 4b supérieurs à 50.

Répartition mensuelle des sérovars

La répartition mensuelle du sérovar 4b correspond à la distribution générale avec des pics en janvier et juin et une nette diminution des cas au dernier trimestre. Cet effondrement des isolements de souches du sérovar 4b explique très vraisemblablement la baisse du nombre de cas enregistrés au dernier trimestre de l'année 1990. En ce qui concerne le sérovar 1/2a, les plus grands nombres d'isolements ont été enregistrés aux mois de mars, août, octobre et novembre (en octobre et novembre, le sérovar 1/2a a représenté plus de la moitié des subcultures de *L. monocytogenes* reçues) (fig. 1).

Souches d'origine alimentaire.

La répartition des sérovars de *L. monocytogenes* pour les produits carnés, les laits et les fromages est rapportée dans le tableau 1. Globalement 74 % des souches appartiennent au sérogroupe 1/2, contre seulement 17,5 % au sérovar 4b. Le sérovar 1/2c est retrouvé dans 38 % des isolements provenant de produits carnés. Les souches de *L. monocytogenes*, provenant de produits végétaux (29 isolements) et piscicoles (30 isolements) appartiennent aux sérovars du groupe 1/2 et 4b dans respectivement 45 et 45 % des produits végétaux et dans 71 et 10 % des produits piscicoles. Chez ces derniers un pourcentage élevé (19 %) du sérovar 3a a été observé.

ANALYSE DES LYSOVARS

Souches d'origine humaine

65 % des souches de *L. monocytogenes* isolées chez l'homme en 1990 ont été lysotypables, ce pourcentage variant selon les sérovars (1/2a : 78 %, 1/2b : 36 %, 4b : 75 %). Ces résultats corroborent ceux obtenus durant les 3 dernières années. L'analyse de ces données confirme sans ambiguïté celles de la sérotypie, à savoir qu'aucune grande épidémie, comparable à celles observées durant la dernière décennie sur le continent nord-américain ou en Suisse n'est apparue en France en 1990. Plus précisément encore, à la différence des années précédentes aucune bouffée épidémique de 10 à 20 cas n'a pu être nettement individualisée, notamment durant le pic du printemps - été. Tout au plus, 17 souches de sérovar 4b non lysotypables ont-elles été observées en janvier (contre seulement 2 à 5 les autres mois), traduisant très certainement la fin du pic de l'automne 1989 [1]. Aucun phagovar particulier n'a donc significativement émergé durant l'année 1990. Les souches des lysovars responsables des bouffées épidémiques précédemment notées en 1987, 1988 et 1989 [1,2] n'ont été retrouvées que sous forme de quelques cas sporadiques disséminés sur plusieurs départements et dispersés sur plusieurs mois. L'absence de pic épidémique objectivée par les résultats de la sérotypie et de la lysotypie des souches pourrait vraisemblablement expliquer la diminution du nombre de souches étudiées en 1989. Afin de pallier les difficultés d'interprétation de la lysotypie, rencontrées notamment avec les souches non typables, des méthodes de typage moléculaire seront dans l'avenir appliquées aux souches de *L. monocytogenes* isolées lors de bouffées épidémiques.

CONCLUSION

L'analyse fine de l'épidémiologie de la listériose en France grâce à la détermination conjointe du sérovar et du lysovar des souches responsables d'infections humaines est régulièrement effectuée depuis 1987. De nettes variations dans la distribution des sérovars 1/2a et 4b ont été observées durant ces 4 années, alors que la proportion et le nombre de souches du sérovar 1/2b varient peu (tabl. 1). Il apparaît que :

– les années 1988 et 1990 se caractérisent par une diminution du pourcentage des souches appartenant au sérovar 4b, 1988 se distinguant de 1990 par un plus grand nombre d'isolements de 1/2a (150 vs. 80) qui s'explique par les bouffées causées par ce sérovar en 1988;

– l'année 1989 se distingue de 1990 par un plus grand nombre de souches 4b (266 vs. 153), différence liée là encore à des bouffées épidémiques provoquées par ce sérovar [1,2], les nombres de souches appartenant au sérovar 1/2a sont voisins (84 vs 80);

– la répartition et les nombres de souches des sérovars 1/2a et 4b isolées au cours des années 1987 et 1989 sont semblables [1,2].

Tableau 1

Répartition des sérovars de 556 souches de *L. monocytogenes* provenant de produits alimentaires destinés à la consommation humaine

Sérovars de *L. monocytogenes*	Produits carnés (133 souches)	Laits (93 souches)	Fromages (330 souches)
	%	%	%
1/2 im*	–	2,1	0,9
1/2 a	25,6	51,6	48,8
1/2 b	15	15	22,1
1/2 c	37,6	0	4,2
1/2 ag	0	0	0,3
3 a	0	2,1	0,6
3 b	3	1,1	4,9
3 c	6	0	0,3
4 b	12,8	26	17
4 c	0	0	0,3
4 d	0	2,1	1

* 1/2 im : 1/2 immobile.

En conclusion, l'année 1990, caractérisée par le plus faible nombre de cas de listériose et l'absence de bouffées épidémiques, pourrait constituer une année de référence concernant les cas sporadiques (nombre et répartition des sérovars). Les sérovars 1/2a et 4b apparaissent en conséquence comme des indicateurs essentiels pour la surveillance de la listériose humaine.

Ces observations démontrent qu'il existe de grandes fluctuations dans l'épidémiologie de la listériose humaine, ce qui justifie une surveillance constante et attentive. Nous remercions vivement tous les biologistes qui, par l'envoi rapide et régulier des souches qu'ils isolent, participent activement à la surveillance de cette infection.

BIBLIOGRAPHIE

[1] ESPAZE E.P., ROCOURT J., COURTIEU A.L. – **La listériose en France en 1989.** Étude à partir des souches adressées au Centre national de référence. *B.E.H.*, n° 3, 1991, p. 9-10.

[2] LEMAGNY F., REBIÈRE I., ROCOURT J., HUBERT B. – **Listériose humaine** : enquête épidémiologique de deux épisodes épidémiques en France, en 1988 et 1989. *B.E.H.*, n° 38, 1989, p. 162-163.

ANNEXE III :

Surveillance épidémiologique en France.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'ECONOMIE, ET DES FINANCES	MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA FORET	MINISTERE DE LA SANTE ET DE L'ACTION HUMANITAIRE
Direction générale de la concurrence de la consommation et de la répression des fraudes	Direction générale de l'alimentation	Direction générale de la santé

Le Ministre de l'Economie et des Finances,
le Ministre de l'Agriculture et de la Forêt
et le Ministre de la Santé et de l'Action humanitaire,

à

Mesdames et Messieurs les Préfets

Objet : épidémie de listériose.

Depuis le 18 mars dernier, nous assistons à une flambée épidémique de listériose occasionnée par la même souche de ***Listeria monocytogenes*** : souche sérovar 4b, lysovar 2389/2425/3274/2671/47/100/340. Le nombre de cas signalés à ce jour est de 147, dont 32 décès et 8 avortements ; la distribution géographique est très large : 57 départements. L'agent causal n'a pu être mis en évidence pour l'instant.

Une cellule de crise réunissant les trois directeurs généraux de la santé, de l'alimentation, de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes assure le suivi de l'épidémie et coordonne les investigations pour en déterminer l'origine.

Dans le cadre de cette épidémie, un dispositif particulier, faisant intervenir les services extérieurs de la santé (DDASS), de la direction générale de l'alimentation (directions des services vétérinaires) et de la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, a été mis en place.

Cette note rappelle ce dispositif, que nous vous demandons de coordonner, et précise certains points.

1- La DDASS est chargée de l'enquête sur chaque nouveau cas de listériose signalé.

Pour cela, il conviendra :

- d'alerter de nouveau par un courrier tous les laboratoires d'analyse biologique privés de votre département (les laboratoires publics et hospitaliers ont été informés par ailleurs) en leur demandant de signaler les nouveaux cas de listériose à la DDASS, dès l'isolement d'une souche de *Listeria monocytogenes*. Ces cas pourraient être communiqués par téléphone à un numéro réservé à cet effet. Par ailleurs, toute souche de *Listeria monocytogenes* isolée devra être envoyée à l'Institut Pasteur de Paris, service de lysotypie des Listeria, pour identification complète de la souche ;

- d'assurer une relance bi-hebdomadaire des laboratoires hospitaliers pour vérifier que tous les cas ont bien été signalés aux services de la DDASS.

- de réaliser l'enquête, qui consistera :

* d'une part en un interrogatoire du patient sur ses habitudes alimentaires, à l'aide du questionnaire envoyé aux DDASS au mois de juin l'attention des médecins étant appelée sur la précision des réponses apportées en ce qui concerne la dénomination des aliments consommés, leur marque commerciale, leur présentation (préemballé ou "à la coupe"), les coordonnées précises du lieu d'achat, afin d'orienter les investigations des deux autres services concernés ;

* d'autre part, en une information immédiate des services vétérinaires afin que ceux-ci réalisent des prélèvements au domicile des malades, et de la direction départementale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes pour ce qui concerne les lieux d'approvisionnement des malades.

Il importe que les services de la DDASS demandent au patient ou à ses proches de conserver les aliments présents dans le réfrigérateur du domicile et attirent l'attention des médecins traitants sur la nécessité de cette conservation.

2- La direction des services vétérinaires, dès que les services de la DDASS lui auront communiqué les éléments nécessaires (nom et adresse du malade), effectuera des prélèvements de <u>tous</u> les aliments présents dans le réfrigérateur du malade et fera procéder à leur analyse. Dans la mesure du possible, elle veillera à ce que soit réalisée une estimation du nombre de *Listeria monocytogenes* présent dans l'aliment (< ou > 100/g). Les souches isolées seront aussitôt adressées à l'Institut Pasteur de Paris pour lysotypage; il est conseillé d'adresser un minimum de 5 colonies par aliment positif.

3- La direction départementale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, lorsque les services de la DDASS lui auront transmis, suite à l'exploitation du questionnaire des malades, la liste des produits alimentaires et les lieux d'achat habituels du malade, accompagnés d'une identification du malade concerné, réalisera sans délai des prélèvements alimentaires (PBI) dans ces lieux d'approvisionnement et fera procéder à des dénombrements de *Listeria monocytogenes* dans ces aliments par les laboratoires interrégionaux de Massy, Rennes, Bordeaux, Montpellier, Marseille et Strasbourg, conformément aux instructions des 24 et 26 juin dernier. Les souches isolées seront immédiatement adressées à l'Institut Pasteur de Paris pour lysotypage, à raison de 5 colonies par aliment positif. En plus des informations sur l'identité des produits prélevés (nature, marque, fabricant, numéro de lot, date limite), les enquêteurs devront recueillir des éléments sur les circuits d'approvisionnement, sur les conditions de conservation et les délais de rotation de ces produits dans les divers magasins signalés.

Par ailleurs, il importe que, dans cette situation épidémique, les professionnels intensifient les contrôles et vérifications auxquels ils sont tenus en application de l'article 11-4 de la loi modifiée du 1er août 1905 et de l'article 1er de la loi n°65-543 du 8 juillet 1965 modifiée. A cette fin, nous demandons que les directeurs départementaux des services vétérinaires et de la direction de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes adressent une lettre commune aux producteurs et aux importateurs de produits alimentaires (produits laitiers, produits de charcuterie, viandes et viandes hâchées, produits de saurisserie, pâtisseries à la crème industrielles, produits végétaux dits de IVe et de Ve gammes), afin que ces opérateurs fassent parvenir à l'Institut Pasteur de Paris (Centre national de référence pour le lysotypage des Listeria) 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cédex 15 - téléphone : 45 68 83 31 - téléfax : 45 68 89 53, pour une identification précise, toute souche de *Listeria monocytogenes* qui aura été isolée dans le cadre de leurs contrôles. Vous trouverez en annexe la lettre-type qu'il convient de leur adresser.

En outre, les services compétents procéderont au retrait de la consommation des aliments ou des lots d'aliments dans les circuits de production, d'importation et de distribution, lorsque les denrées présenteront une contamination avérée par *Listeria monocytogenes*.

Enfin, compte-tenu de cette situation épidémique, il vous est demandé de faire en sorte que, dans chacun des 3 services départementaux concernés, soit assurée durant cette période de vacances une permanence par une personne compétente en hygiène alimentaire. En outre, vous vous assurerez que se tienne régulièrement une réunion de ces 3 services, soit sous votre autorité, soit directement entre eux, afin de faire le point sur l'investigation des nouveaux cas ; chacun d'eux adressera à son ministère de tutelle un bilan descriptif.

Nous vous remercions de veiller à une stricte application de ces instructions, dont la mise en place est immédiate.

pour le ministre
de l'économie et
des finances

pour le ministre
de l'agriculture et
de la forêt

Jean-François GUTHMANN

pour le ministre
de la santé et de
l'action humanitaire

Le Directeur Général de la

Jean-François GIRARD

MINISTERE DE LA SANTE ET DE L'ACTION HUMANITAIRE
LABORATOIRE NATIONAL DE LA SANTE - DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

DOSSIER MEDICAL

LISTERIOSE NON MATERNO-NEONATALE

N°CNR :

NOM : Prénom : Date de naissance : __/__/__ Sexe :

Date des premiers signes cliniques d'infection à Listeria : __/__/__
Préciser ces signes :

Date d'hospitalisation : __/__/__

Terrain

Ethylisme (__) Hépatopathie (__) laquelle :

Diabète (__) Insulinodépendant (__)

Cancer, hémopathie maligne (__) préciser :

Transplantation (__) laquelle : Date : __/__/__

Hémodialyse (__)

Autre Immunodépression (__) laquelle :

Traitement immunodéprosseur ou corticothérapie dans les 3 mois avant le début de la maladie ?
OUI (__) NON (__) Si OUI, lequel :

Forme clinique de listériose

Septicémie (__) Méningite (__) Méningoencéphalite (__)
localisée (__) où :

Sites de prélèvement positifs à Listeria monocytogenes:

LCR (__) Hémoculture (__) Autre (__) préciser :

Date du premier prélèvement positif à Listeria monocytogenes : / /

Sérovar : Lysotype :

Evolution : Décès (__) date : __/__/__ Guérison (__) Inconnu (__)
Séquelles (__) préciser :

MINISTERE DE LA SANTE ET DE L'ACTION HUMANITAIRE
LABORATOIRE NATIONAL DE LA SANTE - DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

DOSSIER MEDICAL

LISTERIOSE MATERNO-NEONATALE

N°CNR :

MERE ou FEMMME ENCEINTE

NOM : Prénom : Date de naissance : __/__/__ Sexe :

Y-a-t-il eu des signes cliniques évoquant une infection ? OUI (__) NON (__)
Si OUI, date des premiers signes cliniques : __/__/__
Préciser ces signes :

Date des dernières règles : __/__/__

Date de l'accouchement ou de l'avortement : __/__/__

Sites de prélèvement positif à Listeria monocytogenes :
Hémoculture (__) Placenta (__) Lochies (__) Vagin (__)
Autres (__) préciser:

Date du premier prélèvement positif à Listeria monocytogenes : __/__/__

Sérovar : Lysotype :

NOUVEAU - NE

NOM : Prénom : Date de naissance : __/__/__ Sexe :

Accouchement vivant (__) Mort-né (__) Avortement (__)

Terme (nombre de semaines d'aménorrhée) : Poids de naissance :

Etat de santé pendant la première semaine de vie :
Pas de manifestations cliniques (__) Syndrome infectieux (__)
Syndrome méningé (__) Autres signes (__) lesquels :

Sites de prélèvements positifs à Listeria monocytogenes :
Hémoculture (__) L.C.R (__) L. amniotique (__) L. gastrique (__)
Prélèvements périphériques (__) lesquels :
Autres (__) préciser :

Date du premier prélèvement positif à Listeria monocytogenes : __/__/__

Sérovar : Lysotype :

Evolution : Décès (__) date: __/__/__ Guérison (__) Inconnue (__)
Séquelles (__) préciser :

Ministère de la Santé et de l'Action Humanitaire
Laboratoire National de la Santé, Epidémiologie, 1 rue Lacretelle, 75015 PARIS Tél:(1) 48 28 28 69
Direction Générale de la Santé, Bureau 1C, 1 place Fontenoy, 75007 PARIS Tél:(1) 46 62 45 50

QUESTIONNAIRE LISTERIA , ENQUETE CAS-TEMOIN

MALADE (__) **TEMOIN** (__) Date du questionnaire :___ /___/___

Pour les témoins, références du malade sur lequel il est apparié :
NOM: Date d'isolement : ___ /___ /___ Age : Sexe : N°CNR :

NOM : Prénom : Age : Sexe :

Département du domicile : Terrain favorisant l'immunodépression:
Téléphone : Profession :

Questionnaire complété: Téléphone (__) Courrier (__) Hôpital (__) Domicile (__)
Hôpital : Service : Téléphone:
Nom de l'enquêteur : Coordonnées :
Prélèvements dans Réfrigérateur du Malade : demandés (__) effectués (__)

Avez-vous pris récemment des médicaments contre les maux d'estomac ? OUI(__) NON(__)
Si OUI, lesquels : .....
Avez-vous pris des laxatifs depuis 2 mois ? OUI(__) NON(__) Quand :
Avez-vous eu récemment de la fièvre (__), une diarrhée (__) ?
Avez-vous effectué un séjour hors de votre département ? OUI(__) NON(__) Si OUI, lieu:.....
Date:..../..../.... Durée :.....

ALIMENTATION PENDANT LE MOIS PRECEDANT LA DATE D'ISOLEMENT

Avez-vous pris des repas en dehors de chez vous? OUI (__) NON (__)
Si OUI, où et fréquence.....
.....

Dans quels établissements effectuez-vous régulièrement vos achats?
Grandes surfaces (__) Lesquelles (nom et localité)? : .....
Epiceries (__) Marché (__) Traiteur (__) Chaînes "Surgelés" (__)

CHARCUTERIE-POISSONS-VIANDES

	Consommation*	Conditionnement**	Marque	Lieu d'achat
PATÉ (PRÉCISEZ LA VARIÉTÉ)	___	_____	_____	_____
	___	_____	_____	_____
RILLETTES	___	_____	_____	_____
CHIPOLATAS	___	_____	_____	_____
CHAIR A SAUCISSE	___	_____	_____	_____
SAUCISSES type STRASBOURG	___	_____	_____	_____
consommées après cuisson (__)		froides (__)		
SAUMON FUME	___	_____	_____	_____
Autres POISSONS FUMES	___	_____	_____	_____
CHAIR DE CRABE, SURIMI	___	_____	_____	_____
JAMBON***	___	_____	_____	_____

**fréquence : 0 jamais, 1:<1 fois/sem, 2:> 1 fois/sem*
***pour le conditionnement, indiquer l'initiale: Pré-(E)mballé, à la (C)oupe, (F)abrication maison*
***** Si à la Coupe, Précisez (P)ré-tranché à l'étal, (T)ranché devant vous**

STEACK HACHE fréquence:___ lieu d'achat:_____
de Boeuf (__) de Cheval (__) Acheté Congelé (__) En barquettes (__) Hâché devant vous (__)
Consommé ; Saignant (__) A point (__) Très cuit (__)

POULET fréquence:___
Poulet entier (__) Poulet en morceaux (cuisses ou ailes) (__)
Vous est-il arrivé de consommer le poulet un peu rosé? OUI (__) NON (__)

OEUFS fréquence:___ consommés crus (__) à la coque (__) sur le plat (__)
pochés (__) omelette ( ) autre ( ) précisez:.....
Lieu d'achat :.....

EAU EMBOUTEILLEE OUI (__) NON (__) Marque :

PRODUITS 4EME GAMME (Salade épluchée prête à l'emploi; Carottes, Choux, Céleri et Autres Crudité rapées, en sachet, prêtes à l'emploi) OUI(__) NON(__) Si oui, Marque:_____

PLATS PREPARES (rayon charcuterie des supermarchés ou traiteur) OUI(__) NON(__)
Si oui, Lieu d'achat: _____

PATISSERIES INDUSTRIELLES Lesquelles? .....
fréquence:___ Lieu d'achat:.....

PRODUITS LAITIERS

	Consommation*	Conditionnement	Marque(s) et Lieu d'achat si diff. habituel
LAIT	___	_____	_____
LAIT CRU	___	_____	_____
CREME FRAICHE consommée crue	___	_____	_____
FROMAGES BLANCS	___	_____	_____
YOGHOURTS	___	_____	_____
DESSERTS à base de lait	___	_____	_____

**fréquence : 0 jamais, 1:<1 fois/sem, 2:> 1 fois/sem*

FROMAGES
Jamais (__) rarement (__) 1 fois/sem (__) 3-4 fois/sem (__) tous les jours ( )
Mangez-vous les fromages: peu fait (__) moyennement fait (__) très fait (__)
Mangez-vous la croûte de certains fromages? OUI(__) NON(__)
Lieu d'achat habituel :

Pouvez-vous cocher les fromages que vous vous souvenez avoir consommés dans le mois précédant la maladie

CAMEMBERT (__) au lait pasteurisé (7-11 Frs) (__) au lait cru (12-20 Frs) (__)

Entourer les MARQUES consommées :
Lanquetot Lepetit Vallée Isigny sainte mère Le Rustique Charles VII Lescure
Chatelain Président Coeur de Lion Coeur de Normandie Paquerettes Bertrand Le Médiéval
Ligueil Bonhomme-Normand Bridel Le Racé Gault et Millau Le Saint Normand Le Gillo
L'Etendard Normand Grand Terroir Marque spécifique au magasin (ex: FORZA à Prisunic), précisez:.....

Autres marques: .....

FROMAGES (suite)

Pour le conditionnement, indiquer l'initiale: (B)oite, Pré-(E)mballé, à la (C)oupe, (R)apé.
Fréquence : 0 jamais, 1:<1 fois/sem, 2:> 1 fois/sem,

	Consommation	Conditionnement, Marque Lieu d'achat si diff. habituel, Croûte consommée
BRIE		
SAINT-MARCELLIN		
CAPRICE DES DIEUX		
SAINT-ALBREY		
MUNSTER		
VACHERIN		
GRUYERE,EMMENTHAL		
G. RAPE EN SACHET		
PARMESAN		
COMTE		
BEAUFORT		
BLEU D'AUVERGNE		
BLEU DES CAUSSES		
FOURME D'AMBERT		
FOURME MONTBRISON		
BLEU DE BRESSE		
ROQUEFORT		
GOUDA		
EDAM		
BONBEL		
MIMOLETTE		
SAINT-PAULIN		
TOME DE SAVOIE		
PYRENEES		
COULOMMIERS		
PONT L'EVEQUE		
CANTAL		
CHAOURCE		
MAROILLES		
BOURSAULT		
LIVAROT		
SAINT-NECTAIRE		
REBLOCHON		
RACLETTE		
TOURE DE L'AUBIER		
MORBIER		
CHEVRE		
BREBIS		
FROMAGES FONDUS		

AUTRES FROMAGES ou préparation en contenant :
REMARQUES

ANNEXE IV :

Epidémie de 1992.

ÉPIDÉMIE DE LISTÉRIOSES EN FRANCE

A. LEPOUTRE *, C. MOYSE *, C. ROURE *, J. ROCOURT **, V. GOULET ***, A.-L. COURTIEU ****

Entre le 18 mars 1992 et le 22 juin 1992, 90 souches de *Listeria monocytogenes* sérovar 4 B et lysovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340 ont été identifiées au sein des souches humaines adressées au Centre national de référence des *Listeria* (fig. 1). Ces souches ont toutes le même sérovar 4 B. Il s'agit d'une augmentation anormalement élevée de ces souches, puisque seulement 15 souches de ce type avaient été enregistrées chaque année entre 1987 et 1990. Dans l'état actuel des connaissances, il s'agit de la plus importante bouffée épidémique enregistrée en France depuis 1987.

Cette épidémie se caractérise par une proportion relativement faible de cas fœto-maternels : 29 %, habituellement les cas fœto-maternels représentent la moitié des formes cliniques). Ces listérioses ont entraîné 20 décès dont 17 adultes et 3 nouveau-nés, et 5 avortements.

La répartition géographique des cas est assez large, 42 départements étant pour l'instant impliqués (carte 1).

Ce lysovar particulier a déjà été incriminé dans des phénomènes épidémiques :

- en Suisse (1983-1987), épidémie due au vacherin Mont d'Or ;
- en Californie (1985), épidémie due à un fromage de type mexicain ;
- au Danemark (1987), origine alimentaire non identifiée.

Bien que ce lysovar ait été impliqué à 3 reprises dans des phénomènes épidémiques le niveau de sa virulence est varié.

D'un point de vue analytique, la concentration des cas dans le temps, et dans une moindre mesure dans l'espace, et le fait que les souches soient toutes du même lysovar suggèrent fortement **une origine alimentaire commune.** Les aliments les plus souvent incriminés dans l'apparition d'épidémies de listérioses d'origine alimentaire sont les fromages à pâte molle, en particulier les fromages au lait cru, les pâtés et rillettes, la viande hachée et les produits de la quatrième gamme (légumes crus prêts à l'emploi et vendus sous vide).

L'enquête alimentaire des cas signalés par le C.N.R. a été entreprise, 58 patients ont été interrogés. Les témoins appariés sur une pathologie sous-jacente éventuelle, l'âge et le lieu d'habitation, sont interrogés dans un deuxième temps. Des recherches microbiologiques sur les aliments conservés dans le réfrigérateur des cas récents ont également été entreprises.

L'importance de cette bouffée épidémique et la gravité de la listériose (la létalité de l'affection est de 22 % à 33 %) incitent à tout mettre en œuvre pour stopper cette épidémie, d'une part en insistant sur les règles hygiéno-diététiques (cf. recommandations ci-jointes), en particulier auprès des personnes à risque, d'autre part en améliorant le recensement des cas.

Les médecins cliniciens ou biologistes qui auraient connaissance de cas de listérioses sont invités à le signaler :

- à la D.D.A.S.S. de leur département ;
- à la D.G.S., Bureau des maladies transmissibles, Dr A. Lepoutre. Tél. : (1) 46 62 45 50 ;
- au Laboratoire national de la Santé, Dr V. Goulet. Tél. : (1) 48 28 28 69.

Enfin, les souches doivent être envoyées au Centre national de références des *Listeria,* Laboratoire de bactériologie de la Faculté de médecine de Nantes (****).

PRÉVENTION DE LA LISTÉRIOSE D'ORIGINE ALIMENTAIRE

Particulièrement pour les personnes à risque
(femmes enceintes, personnes âgées ou immunodéprimées)

① Éviter les fromages à pâte molle ou persillée et les bleus ; **ne pas en consommer la croûte.**

② Cuire soigneusement les aliments d'origine animale.

③ Laver soigneusement les légumes crus et les herbes aromatiques.

④ Éviter la consommation de lait cru (non pasteurisé) ou d'aliments au lait cru.

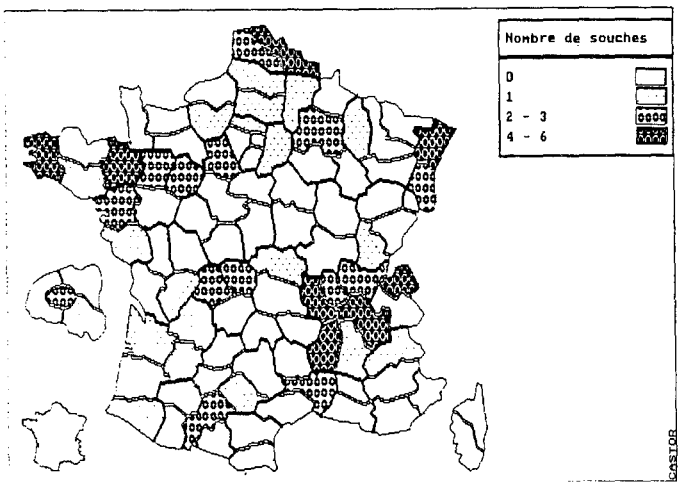
⑤ Les restes alimentaires ou les plats cuisinés devraient être réchauffés soigneusement avant consommation.

⑥ Conserver les viandes non cuites séparément des légumes et des aliments cuits ou prêts à être consommés.

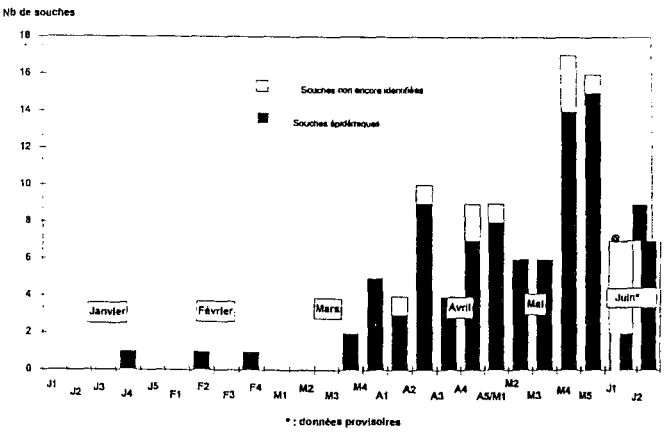
⑦ Se laver les mains, nettoyer couteaux et planches à découper après la manipulation d'aliments non cuits.

* D.G.S., Bureau des maladies transmissibles.
** Centre national de référence de lysotypies des *Listeria,* Institut Pasteur, Paris.
*** Laboratoire national de la Santé, Unité épidémiologie.
**** C.N.R. des *Listeria,* Laboratoire de bactériologie, Faculté de médecine, Hôtel-Dieu, place Alexis-Ricordeau, 44035 Nantes Cedex.

Répartition géographique des souches épidémiques adressées au CNR (15/3-22/6)



Distribution hebdomadaire des souches épidémiques de L. monocytogènes



L'ÉPIDÉMIE DE LISTÉRIOSE EN FRANCE

(SITUATION AU 13 AOÛT 1992 [D.G.S.-L.N.S.-C.N.R.])

À cette date, 173 malades ont été recensés chez lesquels la souche épidémiologique de *L. monocytogenes* a été isolée. On compte à ce jour 55 cas de forme materno-néonatale, soit 32 %, les autres cas étant des formes non materno-néonatales. 40 décès ont été signalés dont 5 nouveau-nés. 12 avortements ont été notifiés.

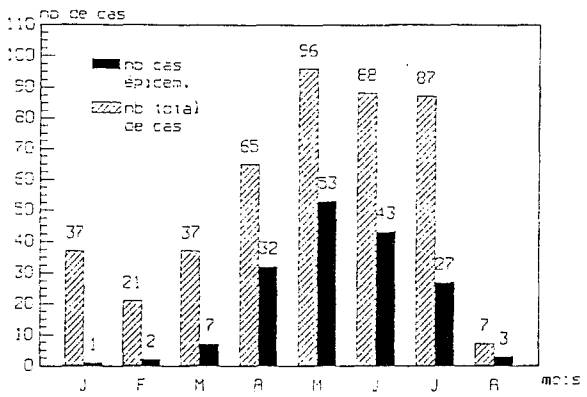
Parmi les 118 cas de forme non materno-néonatale on a retrouvé 73 fois la notion d'un terrain favorisant l'immunodépression.

Le tableau suivant donne la répartition en fonction de l'âge (précisé dans 117 cas) et l'existence ou non d'une immunodépression.

Classe d'âge	1-64 ans	> 64 ans	Total
Nombre de cas total	58	59	117
Decès	12 (20,7 %)	23 (39,0 %)	35 (29,9 %)
Cas avec terrain favorisant	36	37	73
Decès	11 (30,6 %)	17 (45,9 %)	28 (38,4 %)
Cas sans terrain favorisant	22	22	44
Decès	1 (4,5 %)	6 (27,3 %)	7 (15,9 %)

La distribution mensuelle des cas de listériose épidémique est présentée dans la figure 1, avec une référence au nombre total de cas adressés au Centre de référence pour la lysotypie.

Figure 1. – **Distribution mensuelle des cas de listériose** (10 août 1992)



Source : Institut Pasteur.

La figure 2 montre la distribution hebdomadaire des formes épidémiques materno-néonatales et autres.

Enfin, on trouvera une répartition géographique des cas de listériose épidémique par département (fig. 3); à noter un premier cas épidémique en Guadeloupe.

L'enquête se poursuit, en étroite collaboration avec les services concernés :

– au niveau central : D.G.S. et L.N.S., Direction générale de l'Alimentation et Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes;

– sur le terrain : D.D.A.S.S., Directions des services vétérinaires et de la Répression des fraudes.

Les services de l'Institut Pasteur assurent les analyses bactériologiques (lysotypie) des prélèvements humains et alimentaires (après isolement par les laboratoires régionaux, pour les prélèvements alimentaires).

Figure 2. – **Distribution hebdomadaire des cas de listériose [Lysovar épidémique]** (L.N.S., 13 août 1992)

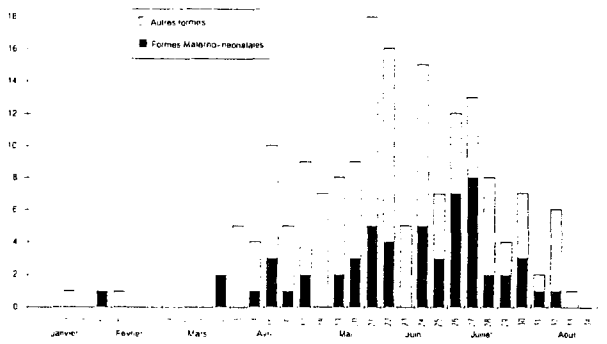
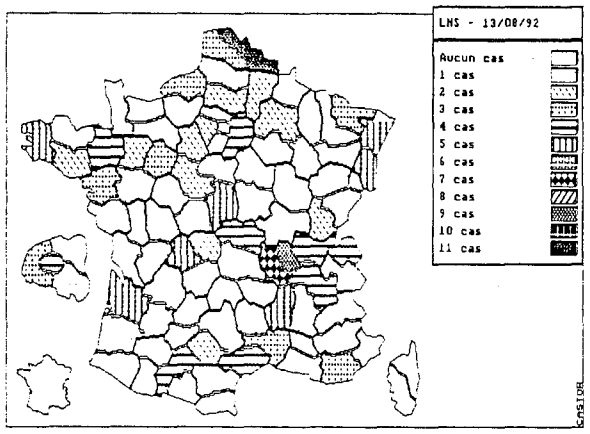


Figure 3. – **Répartition géographique des cas épidémiques** (15 mars - 13 août 1992)



Plus de 1 000 prélèvements alimentaires ont été réalisés par les D.S.V. entre le 29 juin et le 28 juillet 1992; 1 500 établissements de produits laitiers sont contrôlés régulièrement et 400 autres l'ont été depuis le début de l'épidémie.

À la date du 4 août, les directions de la Répression des fraudes avaient déjà prélevé et examiné 650 échantillons alimentaires provenant des magasins où se fournissent habituellement les malades.

L'origine de l'épidémie n'a pu encore être mise en évidence, mais la multiplication des prélèvements devrait aboutir à des orientations plus précises.

Il semblerait que nous assistions à une diminution du nombre de cas déclarés chaque semaine; cependant, il convient d'être vigilants. Rappelons l'importance de signaler immédiatement à la D.D.A.S.S. du département tout nouveau cas identifié par les services de bactériologie et d'adresser en urgence les souches pour lysotypie à l'Institut Pasteur de Paris, seule certitude du caractère épidémique.

La mise en place dans chaque département d'une cellule d'intervention regroupant les services des trois ministères concernés et placée sous l'autorité du préfet, montre, s'il en était besoin, l'intérêt que portent les pouvoirs publics à identifier l'origine de cette épidémie.

Ministère de la Santé et de l'Action Humanitaire
Laboratoire National de la Santé
UF Epidémiologie
1 rue Lacretelle 75015 Paris
48 28 28 69

FLAMBEE DE LISTERIOSE EN FRANCE

Situation au 20 août 1992

NOMBRE DE MALADES (souche épidémique) : 182 depuis le 18 mars 1992

dont Forme materno-néonatale : *55 (31 %)*
Autres cas : *125 (69 %)*
Non précisé : 2

DISTRIBUTION MENSUELLE DES CAS : (1 "non précisé")

mars : 7 cas
avril : 33 cas
mai : 53 cas
juin : 43 cas
juillet : 30 cas
août : 15 cas

selon la forme : (2 "non précisé")

	MATERNO-NEO	AUTRES
MARS	2	5
AVRIL	7	26
MAI	14	39
JUIN	18	25
JUIL	13	17
AOUT	1	13

DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES CAS : 67 départements concernés
dont 1 DOM (Guadeloupe)

FORME MATERNO-NEONATALE : 55 cas concernant 58 foetus ou nouveau-nés (3 grossesses gémellaires)

5 décès + 12 avortements.

AUTRES FORMES : 125 cas dont 74 cas pour lesquels il existe la notion d'un terrain favorisant l'immunodépression

39 DECES (31%).

62 MENINGITES ou MENINGOENCEPHALITES (souche isolée dans le liquide céphalo-rachidien)

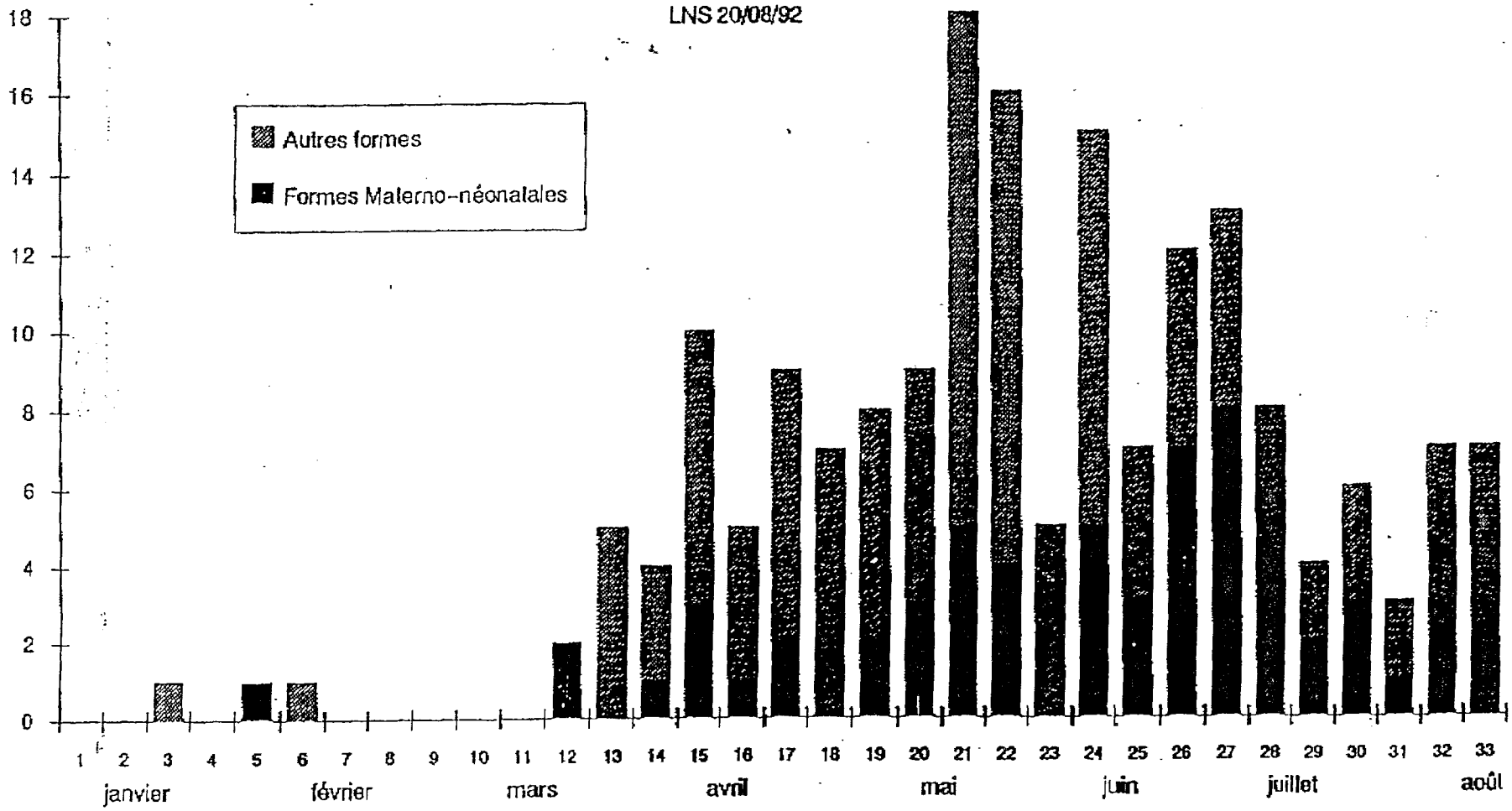
Répartition selon l'âge et l'existence ou non d'une immunodepression connue :

Classe d'âge	1-64 ans	> 64 ans	Total
Nb total de cas	58	59	117
Décès	16 *(27,6%)*	23 *(39,0%)*	39 *(33,3%)*
Cas avec terrain	36	37	73
Décès	15 *(41,7%)*	17 *(45,9%)*	32 *(43,8%)*
Cas sans terrain	22	22	44
Décès	1 *(4,5%)*	6 *(27,3%)*	7 *(15,9%)*

ENQUETE CAS/TEMOINS :

Nombre de questionnaires "alimentaires" de malades (souche épidémique) reçus : 128
Nombre de questionnaires appariés (1 cas/2 témoins): 81

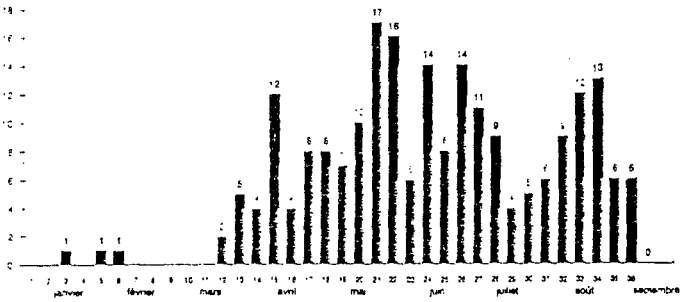
DISTRIBUTION HEBDOMADAIRE DES CAS DE LISTERIOSE (Lysovar épidémique)



L'ÉPIDÉMIE DE LISTÉRIOSE EN FRANCE
Situation au 10 septembre 1992 (D.G.S. - L.N.S. — C.N.R.)

Depuis le 13 août 1992, date du dernier point présenté dans le *B.E.H.* (n° 33, 1992), 43 nouveaux cas de listérioses dus à la même souche de *Listeria monocytogenes* (même sérovar 4 B et même lysovar) ont été recensés. Cela porte à 216 le nombre de cas connus depuis le 18 mars 1992, et situe l'épidémie actuelle à la troisième place des épisodes épidémiques de listérioses d'origine alimentaire, décrits dans la littérature. Le nombre de cas incidents qui semblait diminuer au début du mois d'août a réaugmenté depuis; l'épidémie est toujours évolutive actuellement (fig. 1). Ces cas de listérioses dues à la même souche de *Listeria monocytogenes* représentent 43 % de l'ensemble des cas de listérioses recensés entre le 18 mars et le 10 septembre 1992.

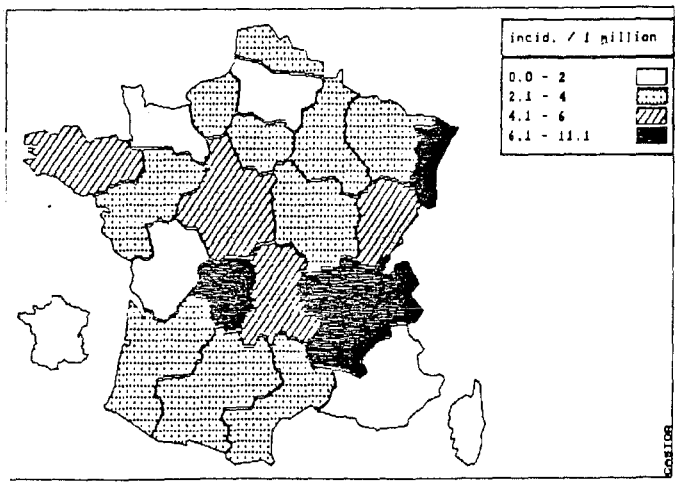
Figure 1. — Distribution hebdomadaire des cas de listériose (lysovar épidémique) L.N.S. 10-09-1992 (semaine 37)



Directement ou indirectement ces cas de listériose ont entraîné 50 décès, 5 décès et 13 avortements parmi les formes materno-néonatales, 45 décès chez l'adulte. Les formes materno-néonatales représentent 31 % des cas depuis le début de l'épidémie. Parmi les cas adultes, 90 (60 %) avaient un terrain favorisant l'immunodépression.

73 départements dont la Guadeloupe, ont eu au moins un cas de listériose épidémique depuis le 18 mars bien qu'il n'y ait pas de regroupement spatial clair des cas, certaines régions comme la région Rhône - Alpes, l'Alsace, et le Limousin ont une incidence particulièrement élevée (fig. 2).

Figure 2. — Incidence des cas de listériose de souche épidémique (au 3 septembre 1992)



consommait tout les matins du jambon cuit fabriqué par un petit producteur cal. Ce jambon distribué localement ne peut pas être à l'origine de la contamination des autres cas épidémiques. L'entreprise a néanmoins été fermée.

ar ailleurs les services vétérinaires ont effectué des prélèvements systématiques dans les entreprises productrices de fromage et de charcuterie (*B.E.H.* 33-1992). Bien que la présence de *Listeria monocytogenes* ait été retrouvée dans près de 10 % des entreprises, 5 souches de *Listeria* provenant de produits différents, sur 695 (0,7 %), appartenaient à la souche épidémique. Cette proportion est identique à celle qui était observée dans les années précédentes pour cette même souche de *Listeria monocytogenes*. Les 5 souches provenaient de 3 fromages différents qui n'étaient distribués que localement.

Les analyses réalisées à la distribution (1 400 prélèvements et 965 analyses réalisées) sur les produits habituellement consommés par les malades ont permis de retrouver une *Listeria monocytogenes* dans 231 prélèvements (4 % des prélèvements analysés). Une trentaine de produits était contaminée par la souche épidémique de *Listeria monocytogenes*. Il s'agissait de produits de charcuterie pour la plupart (pâté, jambon cuit) mais aussi de fromages.

Ces produits de provenance différente ont été retrouvés contaminés par la souche épidémique dans 5 rayons de vente. La contamination croisée de ces aliments lors de leur manipulation dans le magasin est probable au moins pour une partie des produits. Ces premiers résultats s'ils ne permettent pas de prendre des mesures d'interdiction vis-à-vis d'un produit ont conduit à réaliser une série de prélèvements chez les fabricants des produits où une souche de *Listeria* épidémique a été retrouvée. Les premiers résultats communiqués par les services vétérinaires sont négatifs, mais toutes les analyses n'ont pas encore été réalisées actuellement.

Les précautions alimentaires (*B.E.H.* n° 33/1992) destinées aux femmes enceintes, aux patients immunodéprimés et aux personnes âgées sont toujours d'actualité. De plus il faut recommander d'éviter les produits de charcuterie consommés sans cuisson et achetés à la coupe, y compris le jambon cuit.

LE DISPOSITIF D'INVESTIGATION

Depuis le mois de juin 1992, une investigation épidémiologique et bactériologique a été mise en place, pour tenter de retrouver l'origine de cette épidémie. L'identité de la souche bactérienne d'un patient à l'autre et l'augmentation rapide dans le temps du nombre de cas, plaident fortement en faveur d'une origine alimentaire commune à l'ensemble des cas. La large répartition des cas sur le territoire a conduit l'ensemble des médecins de santé publique des D.D.A.S.S., des services vétérinaires et des services de la répression des fraudes à participer à l'enquête.

Le dispositif est le suivant :

— les bactériologistes signalent les cas au médecin de la D.D.A.S.S., dès l'isolement d'une *Listeria monocytogenes*, et envoient la souche pour lysotypage à l'Institut Pasteur de Paris;

— le médecin de D.D.A.S.S. réalise l'enquête cas-témoins sur les habitudes alimentaires en utilisant un questionnaire adapté à l'épidémie actuelle. La D.D.A.S.S. prévient également les services vétérinaires (D.S.V.) et les services de la répression des fraudes (D.D.C.C.R.F.);

— ceux-ci réalisent des prélèvements, au domicile du malade pour la D.S.V., et dans les magasins d'alimentation où le malade effectue habituellement ses achats, pour la répression des fraudes. Ces prélèvements sont réalisés le plus rapidement possible à partir du signalement des cas, afin d'augmenter les chances de retrouver un aliment contaminé.

L'investigation des cas est faite avant la confirmation par l'Institut Pasteur de la nature épidémique ou non de la souche. Le résultat du typage de la bactérie est communiqué secondairement à la D.D.A.S.S.

LE POINT SUR LES INVESTIGATIONS

L'enquête cas-témoins

À l'heure actuelle (9 septembre), le ou les produits à l'origine de la contamination n'ont pas été retrouvés, mais les résultats de l'enquête permettent déjà d'orienter les recherches.

L'analyse des questionnaires de l'enquête cas-témoins (plus des 3/4 des patients ont été interrogés actuellement) ne met pas en évidence de différence significative de consommation alimentaire entre les patients et les témoins, l'enquête alimentaire permet cependant de constater que seuls certains produits, tels que le jambon cuit, sont consommés par plus de 50 % des malades.

Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer l'absence de différence observée entre les patients et les témoins :

— le produit fait partie des aliments pour lesquels les patients ne savent pas préciser les marques consommées (un camembert ou un pâté à la coupe par exemple), dans ce cas les résultats de l'analyse sont biaisés car le questionnaire ne mesure pas réellement l'exposition au risque ;

— plusieurs produits différents sont à l'origine des contaminations des patients. Dans ce cas il existe probablement un lien entre ces différents produits. Le point commun entre différents aliments peut être un produit adjuvant (emballage, gelée...) qui se retrouve dans plusieurs aliments différents ; il peut être une contamination croisée des aliments dans les rayons à la coupe des magasins, une introduction de la souche épidémique chez plusieurs producteurs à partir d'un point commun. Toutes ces hypothèses sont possibles, et c'est l'analyse minutieuse des résultats des enquêtes microbiologiques qui permettra d'en retenir certaines plutôt que d'autres.

Les prélèvements bactériologiques

Les prélèvements réalisés au domicile des malades n'ont permis de retrouver la souche épidémique que dans 1 seul cas. Il s'agissait d'un patient qui

ÉPIDÉMIE DE LISTÉRIOSE EN FRANCE

Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique

V. GOULET*, A. LEPOUTRE**, J. ROCOURT***, A.-L. COURTIEU****, P. DEHAUMONT*****, P. VEIT******

1. INTRODUCTION

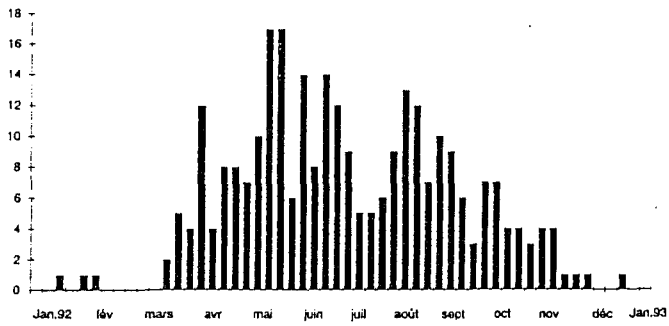
Fin mai 1992, le Centre national de référence de lysotypie des *Listeria* (institut Pasteur) a détecté une augmentation anormale de cas humains causée par une souche unique de *Listeria monocytogenes* (sérotype 4b, lysovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340). Dès que l'épidémie a été confirmée, les pouvoirs publics ont alerté le corps médical en leur recommandant de diffuser les mesures de prévention pour les personnes à risque (*B.E.H.* n° 25). Les données sur cette épidémie ainsi que les recommandations ont été périodiquement réactualisées (*B.E.H.* n^{os} 33 et 38).

2. ENQUÊTE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

2.1. Description de l'épidémie

Du 18 mars au 23 décembre 1992, 279 cas de listériose dus à cette souche épidémique ont été identifiés en France. Ces cas représentent 41,5 % de l'ensemble des cas de listérioses humaines recensés sur la même période alors que cette souche n'était responsable que de quelques cas sporadiques antérieurement (2 à 9 % selon les années). Depuis le mois de septembre, le nombre de cas a diminué régulièrement (fig. 1). Seuls 2 cas ont été identifiés en décembre. Depuis le 1er janvier 1993, aucun cas n'a été recensé. L'épidémie semble donc terminée.

Figure 1. — Épidémie de listériose : distribution hebdomadaire des cas (lysovar épidémique)



Dans 92 cas (33 %), il s'agissait d'une femme enceinte ou d'un nouveau-né. 22 femmes ont eu un avortement. Sur les 73 nouveau-nés (3 grossesses gémellaires), 7 sont décédés, soit un taux de létalité de 9,6 %.

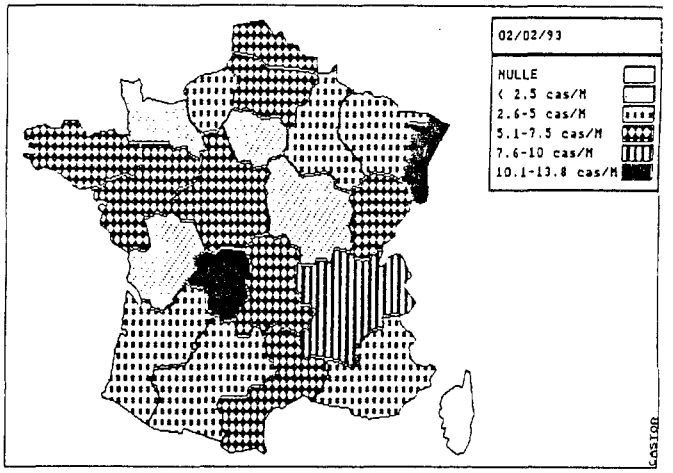
Parmi les 187 autres cas (5 enfants et 182 adultes), 61 % avait une pathologie sous-jacente connue. Des signes de méningite ont été signalés pour 53 % des cas. La létalité a été beaucoup plus forte chez les malades fragilisés (36 %) que chez les autres (18 %). Au total, cette épidémie aura entraîné directement ou indirectement 63 décès et 22 avortements.

Les cas étaient répartis dans 79 départements métropolitains (fig. 2) avec une prédominance dans les régions Limousin, Alsace et Rhône - Alpes. Cette dispersion des cas a compliqué l'enquête et a nécessité la mise en place d'un dispositif exceptionnel.

2.2. Enquête cas-témoin

Le dispositif était basé sur la collaboration des services extérieurs de 3 ministères (Santé [D.G.S.], Consommation [D.G.C.C.R.F.], Agriculture [D.G.A.L.]). Les médecins des D.D.A.S.S. étaient chargés de mener une enquête cas-témoins, les vétérinaires des D.S.V. d'effectuer des prélèvements au niveau des réfrigérateurs des malades et les agents D.D.C.C.R.F. d'effectuer les prélèvements au niveau de la distribution dans les établissements où s'approvisionnaient les malades. Parallèlement, la D.G.A.L. et la D.G.C.C.R.F. avaient demandé de renforcer les contrôles dans les entreprises de production et de distribution.

Figure 2. — Épidémie de listériose en France
Incidence par million d'habitants



Étape 1

L'objectif de l'enquête cas-témoin était de rechercher une association entre la consommation d'un aliment et la maladie. Pour chaque malade, 2 témoins étaient appariés sur le terrain (grossesse, cancer, diabète...), le lieu d'habitation, l'âge, et le sexe. Ne disposant pas d'emblée d'éléments d'orientation, le champ d'investigation était très large. Le questionnaire a été élaboré en prenant en compte tous les produits pouvant être le véhicule de cette épidémie c'est-à-dire essentiellement les produits laitiers et carnés. 228 malades ont été interrogés (soit 82 %) et 324 témoins. L'interrogatoire n'a pu être mené auprès de certains malades dans le coma ou décédés. Pour la plupart des produits, il a été impossible de connaître les marques achetées par les malades.

L'enquête a été complète dans 144 cas (interrogatoire du malade et de 2 témoins). Les taux de consommation de ces 144 malades ne différant pas de ceux obtenus chez les 228 malades, l'analyse statistique a été effectuée sur ces 144 triplets (tabl. 1). Elle n'a pu identifier, de façon significative, d'aliments consommés plus fréquemment par les malades que les témoins. Toutefois, la proportion de personnes ayant consommé de la charcuterie était

* Réseau de Santé publique (hôpital national de Saint-Maurice.
** Direction générale de la Santé.
*** Institut Pasteur (Paris).
**** Faculté de médecine (Nantes).
***** Direction générale de l'alimentation.
****** Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes.

Tableau 1. — Enquête cas-témoin 1

	Analyse statistique (cas appariés)		
	Malades $n = 144$	Témoins $n = 288$	Mantal-Hænzel p
	%	%	
Charcuterie	97,9	94,8	0,26
Charcuterie à la coupe	89,5	84,7	0,17
Pâté	63,2	54,2	0,07
Rillettes	26,6	27,1	0,91
Jambon	92,3	90,6	0,56
Fromage	93,8	94,1	0,58
Pâte molle, croûte fleurie	70,1	80,9	0,02
Pâte molle, croûte lavée	21,5	26,4	0,26
Pâte pressée non cuite	42,4	38,5	0,44
Pâte pressée cuite	79,2	82,6	0,38
Pâte persillée	43,8	51,0	0,15

plus élevée chez les malades que chez les témoins alors que les témoins étaient plus fréquemment des consommateurs de fromage. Les résultats de cette enquête cas-témoin n'ont pas permis d'incriminer un aliment particulier mais ont permis d'orienter l'enquête vers les produits de charcuterie.

Étape 2

La souche épidémique a été isolée dans plusieurs aliments prélevés à la distribution. Il s'agissait principalement de produits de charcuterie vendus à la coupe. Devant les résultats de l'enquête cas-témoin et ceux de l'enquête microbiologique, un nouvel interrogatoire des cas et des témoins a été effectué.

Un interrogatoire, basé sur une liste détaillée de tous les produits de charcuterie pouvant être tranchés à l'étal, a été mené chez 140 malades et 164 témoins. Le pourcentage de malades consommant de la langue en gelée (46,5 %) était significativement plus élevé que celui des témoins (8,4 %). L'association épidémiologique entre listériose et consommation de langue de porc en gelée, est élevée (Odds ratio : 9,2; I.C. : 3,8-22,4). Cette association est plus forte dans le groupe des femmes enceintes (tabl. 2). L'analyse des résultats au cours du temps met en évidence une association entre consommation de langue en gelée et infection avec la souche épidémique de *Listeria monocytogenes* pendant toute la durée de l'épidémie.

Tableau 2. — Enquête cas-témoin 2

	Analyse stratifiée selon la forme de listériose						
	Langue de porc en gelée				Mantel-Hænzel	Odds ratio avec appariement	
	Malades		Témoins		p	O.R.	I.C.
	N	%	N	%			
Forme maternelle/néonatale	60	60,0	82	6,1	< 0,00001	16,8	(3,8-73,7)
Autres formes :							
Total	80	37,5	82	11,0	< 0,0001	5	(1,6-15,9)
Sans pathologie sous-jacente	44	50,0	52	9,6	< 0,0001	9,5	(2,1-45,0)
Avec pathologie sous-jacente	36	22,2	30	13,3	0,35	1,4	(0,2-10,0)

2.3. Prélèvements alimentaires

Dans le cadre de cette investigation, plus de 12 000 souches de *Listeria monocytogenes* ont été isolées dans les aliments. Toutes ces souches ont été adressées à l'Institut Pasteur pour lysotypie. 203 aliments contaminés par le lysovar épidémique ont été ainsi identifiés. Il s'agissait principalement de jambons, pâtés, produits en gelée et de quelques fromages. Une sensibilisation de l'ensemble des professionnels concernés (producteurs et distributeurs) a été réalisée à plusieurs reprises au cours de l'enquête. Une investigation a été faite chez tous les fabricants de produits où la souche épidémique a été retrouvée. Dans ces établissements, les procédés de fabrication ont été revus et des mesures de désinfection ont été prises.

La langue de porc en gelée faisait partie des produits contaminés par la souche du lysovar épidémique, avec un niveau de contamination élevé au stade de la distribution. Les souches de *Listeria monocytogenes* isolées à partir des prélèvements de langue de porc en gelée ont le même profil génomique que 93 % des souches humaines du lysovar épidémique.

Au cours de l'enquête, la souche épidémique a été isolée sur différents aliments vendus dans un même rayon de vente à la coupe ainsi que sur des ustensiles servant à trancher ces produits. Ceci suggère la possibilité de contamination croisée entre différents produits vendus dans le même rayon. Les malades ont donc pu se contaminer en ingérant soit des produits contaminés à la production, soit des produits secondairement contaminés lors de manipulation à la distribution.

3. MESURES DE PRÉVENTION MISES EN ŒUVRE DANS LE CADRE DE CETTE ÉPIDÉMIE

Des recommandations d'hygiène alimentaire tenant compte des résultats de cette investigation ont été diffusées, à plusieurs reprises, à l'attention des consommateurs à risque. De la même façon, les organisations professionnelles des différents secteurs de la production et de la distribution ont été alertés sur le risque *« Listeria »* et sur la nécessité de le prendre en compte dans le cadre de leurs auto-contrôles. Ainsi, plus de 2 000 établissements laitiers et plus de 1 000 établissements de charcuterie ont fait l'objet d'investigations poussées (révision des plans d'hygiène, validation des procédés de fabrication). Les D.D.C.C.R.F. ont opéré 800 interventions dans les centres de distribution. À cette occasion, les bonnes pratiques d'hygiène dans les rayons à la coupe ont été rappelées aux responsables des magasins.

4. CONCLUSION

Malgré la dispersion géographique de l'épidémie, l'alerte a pu être donnée grâce à la sensibilié du système de surveillance. Cela a permis aux pouvoirs publics de mettre rapidement au point un dispositif d'investigation et d'émettre des recommandations auprès de la population à risque. Grâce à la mobilisation des différents partenaires en particulier les médecins de D.D.A.S.S., les vétérinaires des D.S.V. et les agents des D.D.C.C.R.F., l'enquête a pu aboutir à la maîtrise de cette épidémie. L'enquête cas-témoin a montré son efficacité en identifiant un produit suspect d'être à l'origine de près de la moitié des cas de cette épidémie. Les prélèvements effectués dans des magasins identifiés par l'interrogatoire des malades ont été décisifs dans cette enquête. En repérant les produits contaminés à la distribution, ils ont permis de prendre des mesures à la production. Ces mesures ont dû être déterminantes puisque depuis leur mise en œuvre, l'épidémie s'est arrêtée.

Pour éviter qu'une telle situation ne se reproduise et pour limiter les cas sporadiques, il faut que le « risque *Listeria* » soit pris en compte par les producteurs de façon permanente en mettant en place au sein de leur entreprise des systèmes de contrôle efficaces. Les distributeurs doivent veiller à ce que l'hygiène des rayons à la coupe soit revue en tenant compte du risque de contamination croisée. Le consommateur doit lui aussi veiller à respecter quelques règles d'hygiène élémentaire en évitant la contamination des aliments entre eux dans le réfrigérateur et en évitant de conserver longtemps des aliments qui seront consommés sans recuisson ultérieure. Même en dehors d'un contexte épidémique, le risque de listériose sporadique demeure, aussi il est souhaitable que les personnes à risque continuent de suivre les recommandations émises par le ministère de la Santé (tabl. 3).

Tableau 3. — Recommandations pour la prévention des cas de listériose chez les femmes enceintes, les patients immunodéprimés et les personnes âgées

- Pour les achats de produits de charcuterie consommés en l'état (pâté, rillettes, produits en gelée, jambon...) préférer les produits préemballés aux produits vendus à la coupe; si ces produits sont achetés à la coupe, ils devront être consommés rapidement après leur achat.
- Éviter la consommation de lait cru et de produits à base de lait cru.
- Cuire soigneusement les aliments crus d'origine animale.
- Laver soigneusement les légumes crus et les herbes aromatiques.
- Les restes alimentaires et les plats cuisinés doivent être réchauffés soigneusement avant consommation immédiate.
- Conserver les aliments crus (viande, légumes, etc.) séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés.
- Se laver les mains, nettoyer les ustensiles de cuisine après la manipulation d'aliments non cuits.
- Nettoyer fréquemment (2 fois par mois), et désinfecter ensuite avec de l'eau javellisée votre réfrigérateur.

ANNEXE V :

Identification sérologique des Listeria.

DOMAINE D'UTILISATION

Les sérums anti-Listeria O Types 1, 4 et Poly sont recommandés pour l'identification de *Listeria monocytogenes* par la technique d'agglutination sur lame et en tube.
Les anticorps fluorescents Listeria Poly sont utilisés en technique directe d'immunofluorescence, pour l'identification de *Listeria monocytogenes*, de sérotypes 1 ou 4. Ces conjugués permettent la détection des *Listeria* dans 98% des cas.

RESUME/PRINCIPE DU TEST

Dès 1910, Helphers pensait que *L.monocytogenes* pouvait être pathogène pour l'animal [1]. En 1924, Murray, Webb et Swann [2] confirmèrent cette observation. En 1929, Nyfeldt isola *L.monocytogenes* chez l'homme et la listériose est encore considérée comme la dernière infection humaine reconnue [3]. De nombreuses infections à *Listeria* étaient alors attribuées à d'autres microorganismes. Des échantillons contenant *Listeria monocytogenes* étaient souvent considérés comme négatifs et quand une croissance était observée, elle était, en général, attribuée à des contaminants du laboratoire.

Gray [4] constata que, chez l'animal comme chez l'homme, les listérioses se manifestaient sous différentes formes, telles que les méningites, les septicémies, les bactériémies, les avortements, les endocardites et les conjonctivites. Winn, Cherry et King [5] notèrent une augmentation du nombre de cas de listérioses recensés, simultanément à la mise en évidence de la pathogénicité potentielle de *L.monocytogenes*. Selon Hood [6], il est important que les laboratoires restent vigilants concernant ces infections.

Les *Listeria* sont de petits bacilles mobiles, à Gram positif, asporulés et non-capsulés. Leur mobilité est plus prononcée à +20°C. Ce sont des germes microaérophiles qui par conséquent, se développent mieux sous une tension réduite en oxygène. *Listeria monocytogenes* a été retrouvée chez la plupart des animaux à sang chaud (domestiques ou sauvages), lors d'états infectieux ou asymptomatiques. Les *Listeria* sont largement répandues dans la nature [7]. L'identification des *Listeria* repose sur leur isolement, leur caractérisation biochimique suivie d'une confirmation sérologique.

Il existe 4 types connus de *Listeria monocytogenes*, numérotés de 1 à 4, suivant les antigènes somatiques. L'analyse sérologique effectuée par Gray [4] aux USA indiqua que 32,8% des *L.monocytogenes* étaient du type 1, 65,3% du type 4 et que les types 2 et 3 représentaient moins de 1%.

La culture des *Listeria* est souvent délicate et lente, surtout lors d'un isolement primaire. Des isolements directs réalisés à partir d'un échantillon positif, peuvent parfois échouer. La croissance peut être facilitée après une pré- incubation à 4°C. Cette technique requiert plusieurs semaines, voire plusieurs mois, avec des repiquages hebdomadaires ou mensuels, avant d'obtenir une culture positive. Cependant, la gravité de la Listériose nécessite une identification rapide du germe. Pour cela, la technique directe par immunofluorescence est particulièrement intéressante. Des frottis réalisés à partir du liquide céphalorachidien ou des tissus, peuvent être examinés directement grâce à cette technique. De plus, elle permet de détecter directement les micro-organismes non-viables ou de mettre en évidence des germes à partir d'un échantillon dont la culture est impossible.

REACTIFS

Test en tube et test rapide sur lame:

- **Les sérums anti-Listeria O Types 1,4 et Poly** sont des antiglobulines de lapin, de titre élevé, stables et déshydratées. Ils ont été préparés selon la méthode recommandée par Gray [8] et Eveland [9].
  Les sérums anti-Listeria O Types 1 et 4 sont spécifiques de ces sérotypes tandis que le Poly contient les agglutinines des sérotypes 1 et 4 de *Listeria monocytogenes*.

  Pour réhydrater les antisérums, ajouter 1 ml d'eau distillée stérile dans chaque flacon et agiter doucement par rotation jusqu'à dissolution complète. Conservés entre 2 et 8°C, ils sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

- **Les antigènes Listeria O Types 1 et 4**, pour tests en tube ou sur lame, sont des suspensions de *Listeria monocytogenes*, de sérotypes correspondants, ajustées au pH et à la densité recommandés [10]. Ils sont utilisés comme contrôles positifs pour le test en tube ou pour le test rapide sur lame.

- **Le tampon déshydraté IF pH 7,2** est un tampon phosphate dont le pH est égal à 7,2. Réhydraté, il est utilisé pour préparer une suspension de l'antigène.
  Pour réhydrater le tampon, additionner le contenu d'un flacon de 10 g à 1 litre d'eau distillée ou le contenu d'un flacon de 100 g à 10 litres d'eau distillée. Agiter jusqu'à dissolution complète. Conserver le tampon réhydraté entre 2 et 8°C. Ne pas utiliser une solution trouble ou contaminée.

Technique directe d'Immunofluorescence:

- **Les anticorps fluorescents Listeria Poly** sont des antiglobulines *Listeria* de lapin, stables, déshydratées, de titre élevé et conjuguées à la fluoresceïne, comme recommandé par Eveland [11,12]. Conservés entre 2 et 8°C, les anticorps, à l'état déshydraté, sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

  Pour réhydrater les anticorps conjugués, ajouter 5 ml d'eau distillée stérile dans chaque flacon et agiter doucement jusqu'à dissolution complète. Conserver entre 2 et 8°C. Les anticorps sont prêts à l'emploi et ne nécessitent aucune dilution.

- **L'anti-globuline fluorescente de lapin** est utilisée comme contrôle dans la technique directe d'immunofluorescence. Ce conjugué permet de détecter le marquage non spécifique de microorganismes tels que *Staphylococcus*.

  Pour réhydrater ce conjugué, ajouter 5 ml d'eau distillée dans un flacon et agiter doucement jusqu'à dissolution complète. Préparer seulement la quantité suffisante d'anti-globulines nécessaire pour une journée.

- **Tampon déshydraté IF pH 7,2** : voir paragraphe précédent.

- **Le Milieu de montage** est un réactif à gradient de glycérine standardisé, de pH 7,2. Conservé entre 15 et 30°C, celui-ci reste stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

PRECAUTIONS

Usage in vitro

L'utilisateur doit être familiarisé avec les techniques d'immunofluorescence. Pour plus d'informations sur les avantages et les inconvénients de la technique d'immunofluorescence, sur les différentes techniques de marquage et sur les précautions générales à prendre, demander la Fiche INFO 0173 "Méthode d'immunofluorescence".

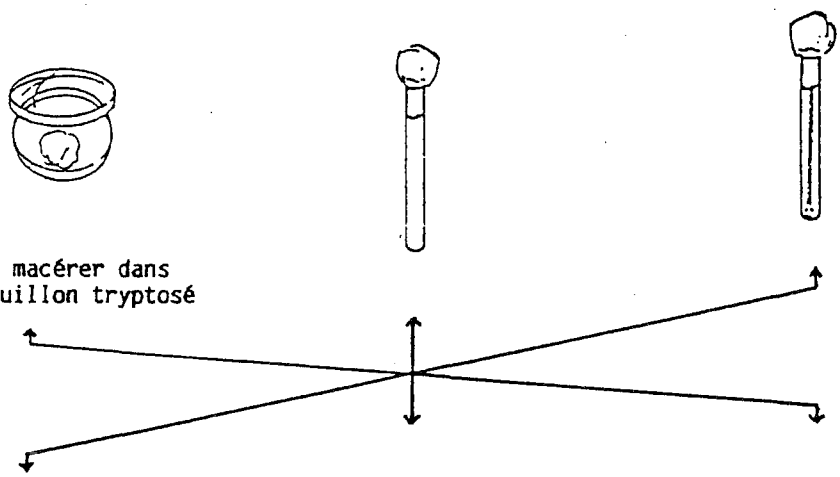
PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le schéma suivant montre les méthodes d'isolement et d'identification des *Listeria*.

MODE D'ISOLEMENT DE LISTERIA MONOCYTOGENES

Echantillons cliniques

Tissus | Liquide | Ecouvillon



Faire macérer dans un bouillon tryptosé

Test directe IF

Inoculer
Bouillon ou gélose tryptosé
Gélose McBride Listeria

Incuber 24 heures à 37°C.
Observer les colonies bleues-vertes, à l'aide d'un microscope ou d'une loupe binoculaire et faire une nouvelle culture sur une gélose tryptosée.

Tests de fermentation dans un bouillon au Rouge de Phénol + 0,1% du sucre à tester

Faire une étude sérologique

Conserver le reste de l'échantillon à 4°C

Si la culture est négative, ré-ensemencer périodiquement, tous les deux ou trois mois.

Après l'isolement des *Listeria*, il est préférable de réaliser des tests biochimiques, en suivant le protocole type indiqué ci-dessous [10].

Fermentation en 24-48 heures avec production de gaz	Fermentation plus tardive ou négative	Pas de fermentation
glucose	arabinose	dulcitol
lévulose	galactose	inositol
maltose	glycérol	inuline
salacine	sorbitol	mannitol
tréhalose	saccharose	raffinose

Nitrate -	Catalase +
M.R. généralement +	Gélatine -
VP +	Amidon -
Indole -	Uréase -

Macrotechnique en tube

1. Réaliser une culture de l'échantillon à tester dans un bouillon ou sur une gélose tryptosée.
2. Faire une suspension du microorganisme à tester dans du **tampon déshydraté IF pH 7,2** réhydraté et contenant 0,3% de formaldéhyde.
3. Ajuster à une densité approchant celle d'une solution de Sulfate de Barium standardisée n°3 de McFarland.

Technique rapide sur lame

1. Réaliser une culture de l'échantillon à tester dans un bouillon ou sur une gélose tryptosée.
2. Faire une suspension du microorganisme à tester dans du **tampon déshydraté IF pH 7,2.**
3. Chauffer cette suspension à 80°C au bain-marie pendant 1 heure.
4. Centrifuger la suspension et éliminer grossièrement le surnageant.
5. Remettre en suspension les microorganismes dans le surnageant résiduel.

TECHNIQUE D'AGGLUTINATION EN TUBE OU SUR LAME

A) Macrotechnique en tube

Matériel fourni

- Sérums anti-Listeria O Types 1,4 et Poly
- Antigènes Listeria O Types 1 et 4 (pour test en tube)
- Tampon déshydraté IF pH 7,2

Matériel nécessaire mais non fourni

- Tubes de Kahn et portoir
- Pipette sérologique
- Bain-marie à 50°C
- Réfrigérateur 2-8°C

Technique

1. Préparer une rangée de 9 tubes sérologiques de Kahn, sur un portoir, pour chacune des suspensions à tester. Ajouter 0,9 ml de tampon contenant du formaldéhyde, dans le premier tube et 0,5 ml dans les autres tubes. A l'aide d'une pipette de 1 ml, ajouter dans le premier tube 0,1 ml de **sérum anti-Listeria O Types 1,4 ou Poly** réhydraté et mélanger doucement. Transférer 0,5 ml du tube 1 dans le tube 2 et mélanger doucement. Procéder de la même façon jusqu'au tube 8 et jeter les 0,5 ml prélevés du tube 8 après avoir mélangé. Le tube 9 sert de contrôle négatif.
2. Ajouter 0,5 ml de la suspension d'antigène (échantillon ou contrôle) dans les 9 tubes et agiter le portoir pour bien mélanger. Après addition de l'antigène, les dilutions finales de l'antisérum vont du 1/20 au 1/2560, du tube 1 au tube 8 respectivement.
3. Incuber dans un bain-marie à 50°C pendant 2 heures. Laisser les tubes toute une nuit au réfrigérateur entre 2 et 8°C.
4. Relever les résultats comme suit:

4+	100% de cellules agglutinées
3+	75% de cellules agglutinées
2+	50% de cellules agglutinées
1+	25% de cellules agglutinées
-	0% de cellules agglutinées

Contrôle

Contrôle positif : Antigène Listeria O avec l'antisérum correspondant.
Contrôle négatif : 1 tube contenant du tampon phosphate réhydraté avec une suspension du microorganisme à tester (tube 9).

Pour la méthode, se référer au chapitre précédent: "Technique".

Résultats

Le contrôle négatif (tube 9) ne doit pas donner d'agglutination. Dans le cas contraire, l'antigène n'est pas satisfaisant. Avec le sérum anti-Listéria O, aucune agglutination ne doit être observée pour des dilutions supérieures au 1/640.

B) Test rapide sur lame

Matériel fourni

- Sérums Anti-Listeria O Types 1,4 et Poly
- Antigènes Listeria O Types 1 et 4 (pour test sur lame)
- Tampon déshydraté IF pH 7,2

Matériel nécessaire mais non fourni

- Lame en verre
- Compte-gouttes
- Bain-marie à 80°C

Technique

1. Mélanger 1 goutte de la suspension de microorganismes chauffée avec 1 goutte d'antisérum dilué au 1/20 dans une solution saline, sur une lame en verre et agiter pendant 1 à 2 minutes en exerçant un mouvement d'avant en arrière.
2. De même, mélanger sur une lame de verre, 1 goutte de la suspension de bactéries avec 1 goutte de tampon contenant 0,3% de formaldéhyde. Mélanger pendant 1 à 2 minutes. Lire l'agglutination.

Contrôle

Contrôle positif : Sérum anti-Listeria O avec l'antigène correspondant sur lame.
Contrôle négatif : Tampon phosphate IF pH 7,2 contenant 0,3% de formaldéhyde, avec 1 goutte de la suspension de microorganismes.

Résultats

La suspension de bactéries dans le tampon ne doit pas donner d'agglutination alors qu'avec l'antisérum correspondant, une agglutination doit être observée.

TECHNIQUE DIRECTE D'IMMUNOFLUORESCENCE

La technique directe d'immunofluorescence peut se réaliser à partir de frottis tissulaires, de cultures isolées, de liquide céphalorachidien, ou de méconium.
Dans le cas d'un frottis tissulaire, il est recommandé de colorer les lames avec du Noir d'Eriochrome.

Matériel fourni

- Anticorps fluorescents Listeria O Poly
- Milieu de montage
- Tampon déshydraté IF pH 7,2
- Anti-globuline fluorescente de lapin
- Noir d'Eriochrome

Matériel nécessaire mais non fourni

- Lames de microscope
- Bâtonnets applicateurs
- Chambre humide
- Papier buvard
- Lamelles
- Microscope à fluorescence

Technique

1. Préparer des frottis de l'échantillon sur une lame, ou déposer une goutte de la culture mise en suspension dans du tampon phosphate IF pH 7,2. Eviter d'utiliser une solution saline pour diluer les cultures de *Listeria*.
2. Laisser sécher à l'air libre.
3. Fixer le frottis, par immersion de la lame dans une solution d'éthanol à 95%, pendant 1 minute.
4. Sur un frottis réalisé à partir de l'échantillon et sur un frottis réalisé à partir d'une souche connue, déposer quelques gouttes **d'anticorps conjugué.**
5. Ajouter plusieurs gouttes **d'anti-globulines fluorescentes de lapin** sur un second frottis de l'échantillon.
6. Répartir le conjugué sur toute la surface du frottis à l'aide d'un bâtonnet applicateur, sans abîmer le frottis.
7. Incuber les lames 30 minutes à température ambiante, dans une chambre humide. Pour quelques lames seulement, il est possible d'utiliser une boîte de Pétri contenant un papier filtre humide et de retourner cette boîte sur les lames.
9. Eliminer l'excès de conjugué et immerger les lames dans du tampon phosphate pendant 10 minutes, en renouvelant le tampon 2 fois. Rincer les lames dans l'eau distillée.
10. Sécher les lames doucement à l'aide d'un papier buvard. Laisser sécher à l'air libre.
11. Ajouter une petite goutte de **Milieu de montage** au centre de la zone marquée et poser la lamelle.
12. Examiner chaque frottis et noter l'intensité ou l'absence de fluorescence.

Résultats

Une fluorescence importante doit être observée avec le contrôle positif. Pour le frottis avec l'anti-globuline fluorescente de lapin, la fluorescence observée doit être faible voire nulle. Dans le cas de résultats identiques pour les contrôles positifs et négatifs, le test est invalide car le marquage a été non spécifique.

Il est préférable de colorer l'échantillon au Noir d'Eriochrome, si le marquage de cet échantillon par l'anti-globuline fluorescente de lapin n'est pas interprétable en raison du bruit de fond.

Technique de coloration en contraste

Il est recommandé de colorer en contraste, au Noir d'Eriochrome, les frottis tissulaires marqués ou contenant des matières étrangères en excès (Hall et Hansen [13]).
Après addition de **l'anticorps fluorescent Listeria** sur le frottis, rincer la lame avec une solution de Noir d'Eriochrome diluée au 1/10 et laisser colorer pendant 10 à 15 secondes. Réaliser la dilution à l'aide du tampon phosphate. Cette solution doit être utilisée le jour même. Eliminer l'excès de colorant, sécher la lame, déposer une goutte de **Milieu de montage** et déposer la lamelle. La lame est alors prête pour l'observation. Les tissus et les matières étrangères sont colorés en rose-rouge ce qui contraste avec la couleur jaune-verte de la fluorescence spécifique.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

Les techniques sérologiques utilisant les antisérums *Listeria* pour l'identification de *L.monocytogenes*, permettent de mettre en évidence l'agent étiologique de l'infection. Une identification complète de la bactérie ne peut être faite sans prendre en compte les caractéristiques morphologiques, sérologiques et biochimiques. La technique directe d'IF ne permet qu'une identification présomptive de *L.monocytogenes*. Les résultats obtenus par cette méthode doivent être confirmés par un isolement à partir d'une culture pure et par une étude des caractères biochimiques.

REFERENCES

[1] Svenk. Vet. Tidskr., 2:265,1911
[2] J. Path. & Bact., 29:407,1926
[3] Gray, M.L. and Killinger, H.H., Bact. Revs., 30:309-382,1966
[4] Second Symposium on Listeric Infection, Montana State Coll., 1962
[5] Annals N.Y. Acad. Sci., 70:624,1958
[6] Am. J. Clin. Path., 28:18,1957
[7] Paper presented APHA, 1961
[8] Personal Communication, 1963
[9] Personal Communication, 1964
[10] Listeriosis, Hafner Publ. Co., N.Y., 1961
[11] Paper presented APHA, 1963
[12] Paper presented APHA, 1964
[13] Zbl. Bakt. Para. Inf. & Hyg., 184:548,1962

ANNEXE VI :

Listeria agglutinotest® Tetrakit.

PRESENTATION DES REACTIFS

1. Flacon de 2 ml d'antigène quantité suffisante pour 50 réactions.
2. Flacon de 1 ml de solution adsorbante (extrait antigénique de staphylococcus aureus).
3. Flacon de 1 ml de sérum de contrôle positif.
4. Flacon de 1 ml de sérum de contrôle négatif.
5. Flacon de 30 ml de solution tampon à pH 8,2. A utiliser pour la dilution des sérums.

AVERTISSEMENT: Conserver à 4+8 °C. Ne pas congeler. Avant l'emploi porter les réactifs à température ambiante (22-25 °C) et bien agiter l'antigène pour obtenir une suspension homogène.

A) METHODE QUALITATIVE

1. Mettre sur la lame une goutte du sérum à contrôler et une goutte d'antigène latex.
2. Mélanger avec un bâtonnet en bois et agiter soigneusement la lame.
3. Si le sérum est positif, dans les 5 minutes il sera observé une agglutination.
4. Pour la confirmation de la positivité mettre sur la lame une goutte du sérum à contrôler, ajouter une goutte de solution adsorbante (extrait antigénique de staphylococcus aureus) et bien mélanger pendant 30 secondes.
5. Ajouter une goutte d'antigène latex et continuer comme pour la réaction précédente.
6. Après 5 minutes lire le résultat en considérant que:
   a) Si après l'adsorption on observe encore une agglutination évidente, le sérum à contrôler peut être considéré positif spécifique pour la Listeria;
   b) Au contraire si aucune positivité n'est démontrée, le sérum doit être classé comme négatif.

B) METHODE QUANTITATIVE

La technique pour le test quantitatif est la même que pour le test qualitatif, à l'exception près que l'agglutination est faite à partir d'une série de dilution du sérum.

INTERPRETATION DES RESULTATS

L'Agglutinotest Listeria est constitué par une suspension stabilisée de particules de latex de polystyrène sur lesquelles sont adsorbés les déterminants antigéniques les plus significatifs du genre Listeria c'est-à-dire les antigènes 1, somatique (O) et flagellaire (H) et 4, somatique (O) et flagellaire (H).
Un résultat positif signifie que le sujet possède un niveau significatif d'anticorps anti Listeria (correspondant à un titre supérieur à 1:160 dans la séroagglutination en éprouvette); donc probablement une infection en cours. On conseille de confirmer le diagnostic par une recherche en culture.
Le rapport de titres élevés anti Listeria devrait être contrôlé avec une suspension de Staphylococcus aureus (1) (2) en répétant le test après une adsorption préliminaire du sérum à contrôler.
Il est intéressant de se rappeler que pendant la grossesse l'infection par Listeria peut passer absolument asymptomatique jusqu'à l'avortement ou avec une gestation à terme ou avec la naissance d'un nouveau-né atteint de leptoméningite. Dans quelques cas d'avortement on a pu vraiment démontrer un titre élevé d'anticorps avec une recherche en culture négative (3) même si souvent une telle recherche donne des résultats positifs (4).
Vue la possibilité d'exécuter un traitment antibiotique et le rétablissement immédiat de la possibilité d'une grossesse à terme, le dépistage des cas d'infection devrait devenir routinier (5).

BIBLIOGRAPHIE

(1) Neter E., Angral H., Gorzynski E.A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105 131 1960.
(2) Seeliger H.P.R., Listeriosa ed. 2 New York 1961 Hafner Publ. Co.
(3) Rost H.F., Paul H., Seeliger H.P.R., Deutsch Med. Wschr 83 1983 1958.
(4) Rappaport F., Robinovitz M., Toaf R., Krochik N., Lancet 1 1273 1960.
(5) Toaf R., Krochick R., Robinovitz M., Lancet 2 482 1962

ANNEXE VII :

Galerie API 50 CH.

PRINCIPE

La galerie **API 50 CH** permet l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. Elle est constituée de 50 microtubes API comportant chacun une zone d'anaérobiose (le tube), pour les études de fermentation, et une zone d'aérobiose (la cupule), pour les études d'oxydation et d'assimilation.

Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif. Les tubes suivants contiennent chacun une quantité définie de substrat déshydraté, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Ces substrats peuvent être métabolisés par plusieurs voies :

- L'ASSIMILATION se traduit par une CROISSANCE du microorganisme dans la CUPULE quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.
- l'OXYDATION se traduit par un changement de COULEUR dans la CUPULE, dû à une production d'acide en aérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.
- la FERMENTATION se traduit par un changement de COULEUR dans le TUBE, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.

NOTE : La galerie **API 50 CH** peut être utilisée pour étudier l'une de ces trois voies. Le milieu employé pour l'inoculation de ces galeries doit être choisi en fonction du métabolisme étudié, et des exigences du groupe microbien étudié.

MODE OPERATOIRE

- voir également la méthodologie recommandée pour l'utilisation des milieux **API 50 CHL Medium**, **API 50 CHB Medium**, **API 50 CHE Medium**, **API 50 CHS Medium**

1 **Préparation de l'inoculum.**

- Cultiver le microorganisme sur un milieu adapté à sa croissance
- Vérifier la pureté de la souche
- Récolter cette culture par écouvillonnage d'un milieu solide, ou par centrifugation d'un milieu liquide
- Préparer l'inoculum dans le milieu approprié

2 **Préparation de la galerie**

Chaque galerie est constituée de 5 bandes (N°1 à 5) comprenant chacune 10 tubes numérotés.

- préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle)
- inscrire la référence de la souche sur la languette latérale
- répartir environ 10 ml d'eau dans les alvéoles du fond
- sortir une galerie de son emballage, et la déposer dans le fond de la boîte d'incubation

- Le coffret **API 50 CH** (≈ 5 030 0) permet la réalisation de 10 tests. Il se compose de :
  - 10 galeries **API 50 CH**
  - 10 boîtes d'incubation
  - 10 feuilles de résultats
  - 1 notice technique **API 50 CH**

- Pour utiliser les galeries **API 50 CH**, il est nécessaire de disposer de :
  - Milieu d'inoculation
    API 50 CHE Medium (≈ 5 040 0),
    API 50 CHL Medium (≈ 5 041 0),
    API 50 CHS Medium (≈ 5 042 0),
    API 50 CHB Medium (≈ 5 043 0),
    ou autre milieu adapté.
  - **Huile de paraffine** (≈ 7 010 0)
  - **Portoir à ampoules** (≈ 7 020 0)
  - **Pipettes Pasteur stériles** (≈ 9 756 0) ou **PSIpettes** (≈ 7 025 0)
  - McFarland Standard (≈ 7 090 0)
  - **Écouvillons stériles** (≈ 7 061 0)

  Plus le matériel de laboratoire :
  - étuve
  - bec Bunsen
  - crayon marqueur
  - réfrigérateur (+ 2°C + 8°C)

CONSERVATION

Les galeries **API 50 CH** se conservent à 2–8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

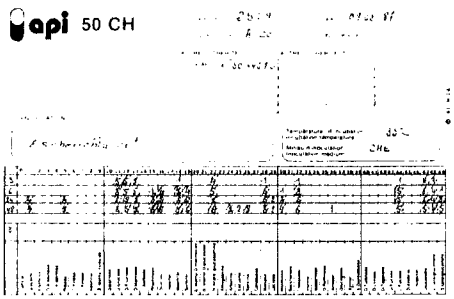
3 **Inoculation**

- Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes
  - Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation
  - Tenir la pointe de la pipette contre le bord de la cupule à la jonction du tube et de la cupule.
  - Lorsque le tube seul doit être inoculé, ne pas dépasser la limite supérieure du tube afin de conserver une bonne anaérobiose
  - Lorsque le tube et la cupule doivent être complètement remplis, éviter la formation d'un ménisque concave ou convexe.
  - Incuber les galeries à la température optimum de croissance du groupe de microorganismes étudiés 25°C, 30°C, 37°C

BANDE n°1 tube/ substrat	BANDE n°2 tube/ substrat	BANDE n°3 tube/ substrat	BANDE n°4 tube/ substrat	BANDE n°5 tube/ substrat
0 TEMOIN	10 GALactose	20 α-Methyl-D Mannoside	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcerol	11 GLUcose	21 α-Methyl-D Glucoside	31 SACcharose/ Sucrose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N Acetyl Glucosamine	32 TREhalose	42 D TAGatose
3 D ARAbinose	13 MaNnosE	23 AMYgdaline	33 INULine	43 D FUCose
4 L ARAbinose	14 SorBosE	24 ARButine	34 MeLeZitose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCuline	35 RAFfinose	45 D ARabitoL
6 D XYLose	16 DULcitol	26 SALicine	36 AMiDon	46 L ARabitoL
7 L XYLose	17 INOsitol	27 CELlobiose	37 GLycoGene	47 GlucoNaTe
8 ADOnitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XyLiTol	48 2 Keto Gluconate
9 6 Methyl-D Xyloside	19 SORbitol	29 LACtose	39 GENtiobiose	49 5 Keto Gluconate

4. **Lecture de la galerie**

- Deux paramètres comptent pour la lecture des réactions observées :
  - l'intensité (croissance ou acidification)
  - la vitesse d'apparition.
- La lecture des galeries doit se faire :
  - à des temps d'incubation définis (3 H, 6 H, 24 H, 48 H par exemple), dépendant du microorganisme et du type de réaction étudié (fermentation ou assimilation).
  - de façon semi-quantitative: On donne la note 0 aux réactions négatives et 5 aux réactions positives d'intensité maximale. Les notes 1, 2, 3, ou 4 sont données aux réactions intermédiaires (3, 4 et 5 sont considérées comme positives).
  - Les résultats sont notés sur les feuilles de résultats comme indiqué dans l'exemple. Ils constituent le profil biochimique du microorganisme.
    On peut aussi noircir la colonne de la feuille de réponse correspondant à chaque caractère à partir de l'heure où une note positive (≥3) est enregistrée.



5. **Interprétation des résultats**

Ce Profil Biochimique peut servir :

- à l'identification du microorganisme par comparaison à des profils types
- au typage épidémiologique de ce microorganisme s'il a été montré que des biotypes épidémiologiques existaient.
- à l'analyse taxonomique d'un groupe de microorganismes,
- à la classification d'une population bactérienne inconnue en groupes homogènes.

6. **Contrôle**

Les milieux et galeries font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique est de plus réalisable au laboratoire avec les souches suivantes :

7. **Elimination du matériel usagé**

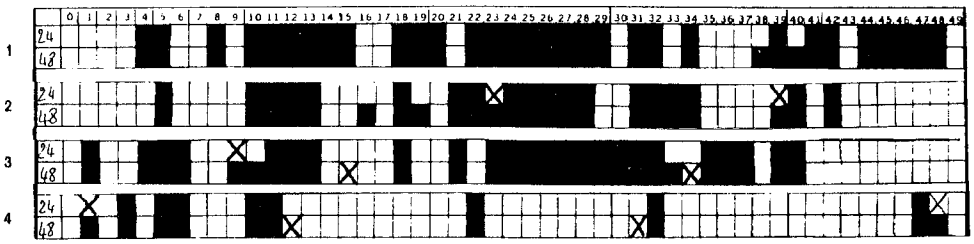
Après utilisation, ampoules, boîtes, pipettes et galeries doivent être incinérées ou décontaminées par autoclavage ou immersion dans de l'eau de Javel avant d'être jetées.

APPLICATIONS

Pour certaines bactéries, des méthodologies et des bases de données sont proposées :

- Entérobactéries et autres bacilles Gram négatif : **API 50 CHE Medium** (n° 5 040 0)
- Bactéries lactiques : **API 50 CHL Medium** (n° 5 041 0)
- Streptocoques : **API 50 CHS Medium** (n° 5 042 0)
- Bacillus : **API 50 CHB Medium** (n° 5 043 0).

Pour les autres applications, voir la bibliographie.



1. *Streptococcus avium* ATCC 35 665 (avec **API 50 CHS Medium**)
2. *Lactobacillus casei* var *alactosus* NCFB 206 (avec **API 50 CHL Medium**)
3. *Bacillus polymyxa* ATCC 43 865 (avec **API 50 CHB Medium**)
4. *Proteus mirabilis* ATCC 35 659 (avec **API 50 CHE Medium**)

■ reaction positive ✕ réaction variable

ANNEXE VIII :

Galerie API Listeria.

API LISTERIA est un système d'identification des ***Listeria*** utilisant des tests standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données spécifique. Il permet également la caractérisation du genre ***Listeria*** par élimination des espèces n'appartenant pas au genre ***Listeria.***

Principe

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.

Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des changements de coloration spontanés ou révélés par l'addition de réactif. Après incubation 18-24 heures à 35-37° C, la lecture des réactions est realisée visuellement avec le Tableau de Lecture et l'identification obtenue grâce à la Liste des Profils de la Notice Technique.

- Le coffret **API LISTERIA** permet de réaliser 10 tests. Il se compose de :
  - 10 galeries **API LISTERIA**
  - 10 ampoules de **Suspension Medium,** 2 ml
  - 1 réactif **ZYM B**
  - 10 boîtes d'incubation
  - 10 fiches de résultats
  - 1 notice technique
- Pour utiliser **API LISTERIA**, il faut en outre disposer de :
  - **McFarland Standard** (# 70 900), point 0.5 ou ***Densitomètre ATB Expression*** (# 15 500)
  - **Pipettes** (# 97 560) ou **PSIpettes** (# 70 250)
  - **Portoir pour ampoules** (# 70 200)

Et également le matériel de laboratoire : étuve à 37° C, réfrigérateur, bec Bunsen, crayon marqueur.

Conservation

Les galeries, le réactif **ZYM B** se conservent à 2-8° C et les milieux de suspension entre 2 et 30° C, jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

Le réactif **ZYM B** est sensible à la lumière : entourer les flacons d'une feuille d'aluminium. Toute teinte rose traduit son altération. Ne sortir ce réactif que le temps de son utilisation et ne pas le laisser longtemps sur la paillasse.

Composition des milieux et réactifs

- **Suspension Medium**
  Eau distillée stérile 2 ml
- Réactif **ZYM B**
  Fast Blue BB 0,35 g
  2-méthoxy-ethanol qsp 100 ml

Mode opératoire

1. Sélection des colonies

- Vérifier l'appartenance de la souche à étudier au genre ***Listeria*** (courts bacilles à Gram positif, polymorphes, mobiles à 25° C mais pas à 37° C, catalase positive et oxydase négative).
- Les prélèvements contenant souvent des mélanges de plusieurs espèces de ***Listeria***, il est préférable de réaliser une subculture sur gélose au sang à partir d'une colonie bien isolée. Incuber la boîte 24 heures à 35-37° C.

NOTE : les milieux suivants peuvent être utilisés pour prélever les colonies avant utilisation de la galerie **API LISTERIA :**

- milieux gélosés au sang non sélectifs, à base Columbia ou TSA, avec ou sans antibiotiques
- milieux sélectifs pour ***Listeria*** à l'exception du milieu McBride qui inhibe l'expression enzymatique des bactéries sur la galerie **API LISTERIA.** Si ce milieu est employé pour l'isolement, réaliser une subculture sur gélose au sang.

2. Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Jeter le sachet déshydratant.

3. Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule de **Suspension Medium**, 2 ml (ou eau distillée stérile sans additif).
- A l'aide d'une **Pipette** ou d'une **PSIpette**, prélever quelques colonies bien isolées et réaliser une suspension d'opacité égale à celle de l'étalon 0,5 de McFarland.
- Observer le type de hémolyse et le noter sur la fiche de résultats, ce caractère constituant un test additionnel.

4. Inoculation de la galerie

- Répartir la suspension bacterienne précédente dans les cupules en évitant de faire des bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la **Pipette** ou la **PSIpette** sur le côté de la cupule) :
- Remplir tube et cupule du test DIM (100 µl environ, soit 2 gouttes de pipette Pasteur ou 5 gouttes de **PSIpette**), **en veillant à ne pas créer un ménisque convexe.**
- Remplir uniquement la partie tube des tests **ESC** à **TAG** (50 µl environ, soit 1 goutte de pipette Pasteur ou 2 gouttes de **PSIpette**).

N.B. : La qualité du remplissage est très importante : des tubes insuffisamment ou trop remplis sont source de résultats faussement positifs ou négatifs.

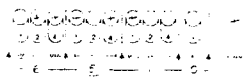
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber 18-24 heures à 35-37° C en atmosphère aérobie.

5. Lecture de la galerie

- Ajouter 1 goutte de réactif **ZYM B** au test DIM
- Lire dans les 3 minutes toutes les réactions en se référant au Tableau de Lecture de la Notice Technique.
- Noter les réactions en +/- sur la fiche de résultats.
- Noter également le type d'hémolyse.

6. Interprétation

- Coder les réactions obtenues en un profil numérique : sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 or 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, un profil numérique à 4 chiffres est obtenu.
- L'identification est obtenue en recherchant le profil numérique dans la Liste des Profils de la Notice Technique.



6510 *Listeria monocytogenes*

7. Elimination du matériel utilisé

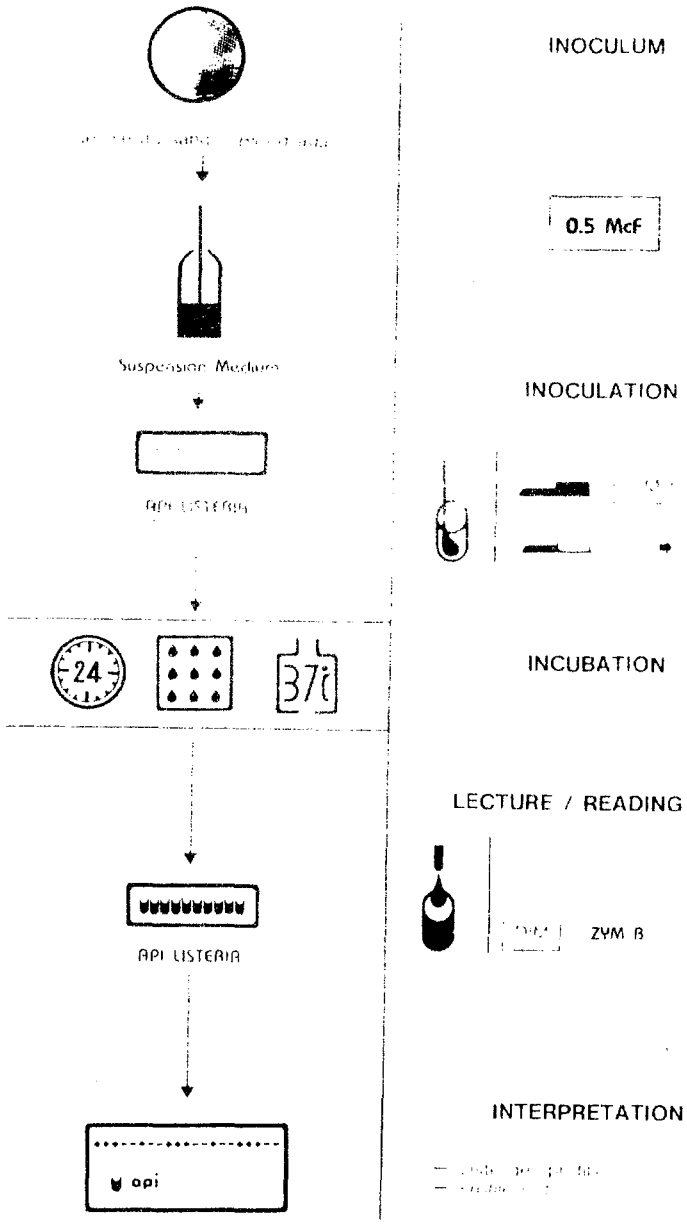
Après utilisation, ampoules, pipettes et galeries doivent être incinérées ou décontaminées, par autoclavage ou immersion dans l'eau de javel, avant d'être jetées.

Limitations

Le système **API LISTERIA** est destiné à l'identification des bactéries du genre ***Listeria***, et à elles seules.

L'interprétation des résultats de la galerie doit être faite par un biologiste compétent qui prendra en compte l'origine du prélèvement, les aspects micro et macroscopiques et éventuellement les tests additionnels réalisés.

METHODOLOGIE / PROCEDURE



api LISTERIA TABLEAU DE LECTURE

TESTS	REACTIONS	RESULTATS	
		NEGATIF	POSITIF
		ZYM B < 3 mn	
DIM	Différenciation *L. innocua/L. monocytogenes*	orange pâle rose beige gris beige	orange
ESC	ESCuline (Hydrolyse)	jaune pâle	noir
αMAN	α-MANnosidase	incolore	jaune
DARL	D-ARabitoL (Acidification)		
XYL	D-XYLose (Acidification)		
RHA	RHAmnose (Acidification)	rouge	jaune
MDG	α-Méthyl-D-Glucoside (Acidification)	rouge orangé	jaune orangé
RIB	RIBose (Acidification)		
G1P	Glucose-1-Phosphate (Acidification)		
TAG	D-TAGatose (Acidification)		

TABLEAU D'IDENTIFICATION/IDENTIFICATION TABLE

api LISTERIA (V1.0)

	DIM	ESC	MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
Listeria grayi/murrayi	99	100	99	100	1	16	33	100	0	0
Listeria monocytogenes	0	100	98	97	1	98	100	1	5	0
Listeria innocua	99	100	98	100	2	66	98	1	0	0
Listeria seeligeri	97	100	5	99	99	0	99	1	0	0
Listeria ivanovii	88	100	0	99	97	4	99	33	91	0
Listeria welshimeri	90	100	96	100	98	76	99	1	0	97

% de réactions positives après 18-24 heures à 35-37° C
% of positive reactions after 18-24 hours at 35-37° C

LISTE DES PROFILS NUMERIQUES/NUMERICAL PROFILE LIST

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

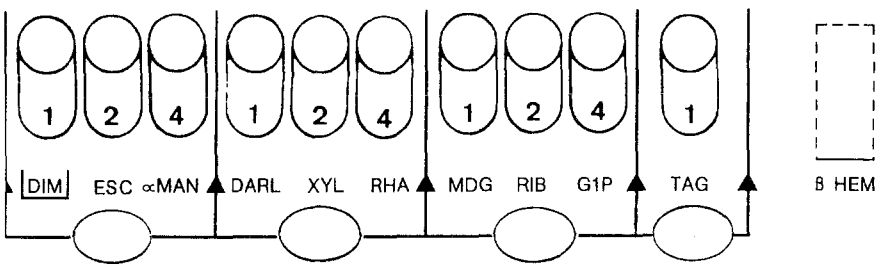
*Listeria grayi : nitrate (-)
Listeria murrayi : nitrate (+)

api LISTERIA

REF. : .....

___ / ___ / ___

Origine/ *Source*/**Herkunft**/ Origen/ *Prelievo*



β HEM

Autres tests/ *Other tests*/**Weitere Tests**/ Altri tests/ *Otros tests*

Ident.

BIO MÉRIEUX SA / 69280 Marcy-l'Etoile / France

Schéma d'identification des espèces Listeria avec la galerie API Listeria.

Tests	Listeria monocytogenes	Listeria innocua	Listeria seeligeri	Listeria ivanovii spp. ivanovii	Listeria ivanovii spp. londoniensis	Listeria welshimeri	Listeria grayi
DIM	-	+	+	V	V	V	+
Hydrolyse de l'esculine	+	+	+	+	+	+	+
α-Mannosidase	+	+	-	-	-	+	V
Acidification de :							
D-Arabitol	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	+	+	+	+	-
L-Rhamnose	+	V	-	-	-	V	-
α-Méthyl-D-glucoside	+	+	+	+	+	+	V
D-ribose	-	-	-	+	-	-	+
Glucose-1-phosphate	-	-	-	+	V	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	+	-

1. DIM Différenciation *L.innocua/L.monocytogenes*

Ce test enzymatique met en évidence une arylamidase.

I. PRINCIPE CHIMIQUE

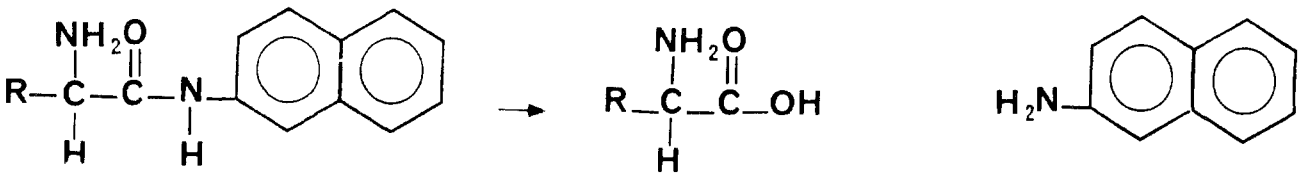
a) Activité enzymatique

Le test est fondé sur l'hydrolyse d'un substrat naphtylamide par une arylamidase.
L'arylamidase dégrade un composé amino-acide-β-naphtylamide, par la reconnaissance de la liaison $CO\text{-}NH_2$ et libére un acide aminé et une molécule de β-naphtylamine.

réaction générale :

E
R-β-naphtylamide ----------> β-naphtylamide + R

R = radical amino-acide
E = arylamidase



Amino Acide β-naphtylamide — Acide Aminé libre — β-naphtylamine

b) Détection

La β-naphtylamine libérée est non chromogénique. Sa présence est révélée par un sel de diazonium, le Fast Violet BB (réactif ZYM B) pour former un composé azoïque coloré en orange.

II. INTERET

Ce test original breveté permet de séparer *L. monocytogenes* (-) de *L. innocua* (+), ou des autres *Listeria* (+) ou V.

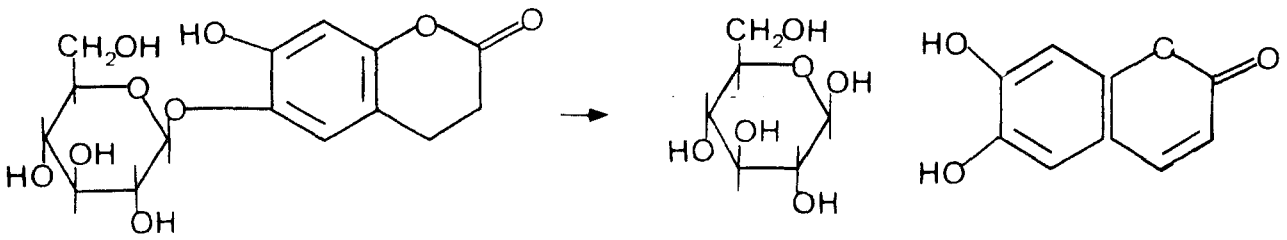
2. ESC Esculine

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

I. PRINCIPE CHIMIQUE

a) Activité enzymatique

L'esculine est un glucoside composé d'une partie non glucidique ou aglycone (esculétine) et de glucose, fixé par une liaison beta. Sous l'action de la β glucosidase, l'esculine est hydrolysée en esculétine et en glucose.



Esculine
(6- β-Glucosidohydroxycoumarine)

D-glucose + Esculétine
(6,7 dihydroxycoumarine)
+
Fe+++

b) Détection

L'esculétine réagit avec le sel de fer présent dans la cupule pour former un complexe marron foncé à noir.

II. INTERET

Toutes les *Listeria* sont ESC (+).
Ce test permet de confirmer l'appartenance des bactéries étudiées au genre *Listeria*.

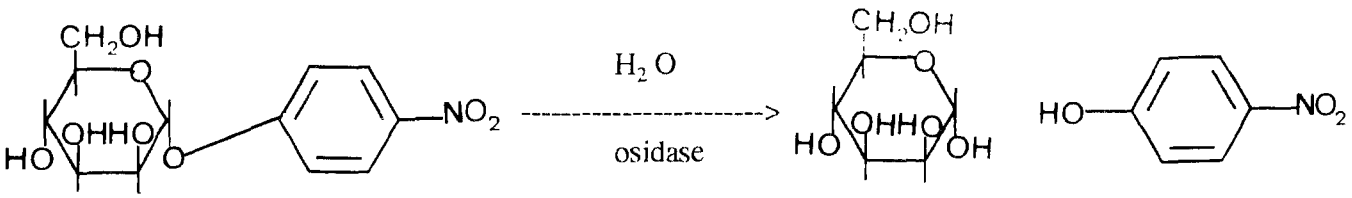
3. αMAN alpha mannosidase

Ce test met en évidence une osidase.

PRINCIPE CHIMIQUE

a) Activité enzymatique

Il s'agit d'un test chromogénique fondé sur l'hydrolyse d'un substrat osidique, le mannoside couplé à un radical nitrophénol, la liaison entre le radical mannose et le p-nitrophénol, ainsi que le mannose sont reconnus spécifiquement par l'α mannosidase correspondante.



para-nitrophényl αD-mannopyranoside αD-mannose para-nitrophénol

b) Détection

L'α mannosidase hydrolyse le substrat pour libérer du p-nitrophénol, spontanément coloré en jaune, sans addition de réactif.

4.	**DARL**	**D-Arabitol**
5.	**XYL**	**D-Xylose**
6.	**RHA**	**Rhamnose**
7.	**MDG**	**alpha méthyl-D-glucoside**
8.	**RIB**	**Ribose**
9.	**G1P**	**Glucose-1-Phosphate**
10.	**TAG**	**D-Tagatose**

Sept substrats glucidiques sont testés en fermentation.

I. PRINCIPE CHIMIQUE

a) Activité enzymatique

La fermentation se déroule en anaérobiose et entraîne une série de clivages glycolytiques enzymatiques. Les sucres sont transformés en 1, 2, 3 ou 4 composés carbonés. Le pyruvate est l'intermédiaire central entre les hydrates de carbone et les produits finaux du métabolisme. Il peut également être un précurseur de l'acide lactique ou d'autres produits de fermentation tels que l'éthanol ou le butanediol.
L'acide lactique est le produit final de la fermentation du glucose associé à de petites quantités d'éthanol et de gaz carbonique.
La séquence chimique est connue sous le nom de voie d'Embden et Meyerhof :

Hydrate de carbone ----------> dihydroxyacétone phosphate

Voie de Embden Meyerhof +

glycéraldéhyde ---------> acide pyruvique --------> acide lactique

b) Détection

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

II. INTERET

Les *Listeria* sont DARL (+).
Ce test permet de confirmer l'appartenance des bactéries étudiées au genre *Listeria*.
Elles sont également MDG (+) (seules *L. grayi* et *L. murrayi* sont variables pour ce test).

ANNEXE IX :

MICRO-ID Listeria.

I. PRINCIPE DU TEST

Le Micro-ID listeria contient des disques de papier filtre imprégnés par les réactifs qui permettent de détecter la présence d'enzymes spécifiques et/ou des produits du métabolisme de Listeria permet tant une rapide différenciation du genre Listeria au niveau des espèces.

Les réactifs incluent les substrats qui réagissent avec les enzymes bactériennes et le système de détection qui réagit avec les produits terminaux du métabolisme formés au cours de l'incubation, pour produire un changement de couleur facilement lisible. Les quantités de réactifs sont appliquées de telle sorte que les matériaux incompatibles soient séparés jusqu'à ce que la galerie soit inoculée.

Les réactions chimiques du Micro-ID sont données par le tableau suivant.

TEST	REACTION CHIMIQUE
VP Vosges-Proskauer Production d'acétoine	Le glucose et le pyruvate sont convertis en acétylmé - thylcarbinol (AMC Acétoine), lequel est oxydé en diacétyl avec KOH. Il constitue un complexe coloré avec l'arginine et l'alpha-naphtol (rose à rouge).
N Nitrate réductase	Le nitrate est réduit en nitrite formant un complexe avec l'acide sulfanilique, celui-çi s'associe avec un dérivé de l'alpha-naphtyl-amine pour constituer un complexe coloré (rouge).
PD Phénylalanine désaminase	La phénylalanine est désaminée en phénylpyruvate, lequel se colore en présence d'ions ferriques (vert).
H_2S Sulfure d'hydrogène	Le thiosulfate de sodium est réduit en H_2S lequel réagit avec l'acétate de plomb pour produire un sulfure de plomb de coloration noire. (*)

(*)Toute coloration brune de la partie supérieure du disque indique une réaction positive. Cette réaction peut être assez faible pour Micro-ID Listeria.

I Indole	Le tryptophane est métabolisé en indole, lequel forme un complexe coloré avec le P-Diméthyl-aminebenzaldéhyde (rose à rouge).
OD Ornithine Décarboxylase	L' ornithine est décarboxylée en putrescine, laquelle augmente le pH de la suspension et change la couleur de l'indicateur, le pourpre de bromocrésol (pourpre à rouge).
LD Lysine Décarboxylase	La lysine est décarboxylée en cadavérine, laquelle augmente le pH de la suspension et change la couleur de l'indicateur, le pourpre de bromocrésol (pourpre à rouge).
M Utilisation du malonate	Le malonate est oxydé en produits alcalins,lesquels changent la couleur de l'indicateur , le bleu de bromothymol (vert bleu).
U Uréase	L' urée est hydrolysée en ammonium et dioxyde de carbone. Ceci entraîne une augmentation du pH qui modifie la couleur de l'indicateur, le rouge crésol (orange à pourpre).
E Hydrolyse de l'esculine	L' esculine est hydrolysée en glucose et esculétine. L'esculétine réagit avec l'ion ferrique pour donner une coloration noire.
ONPG Béta-galactosidase	L' o-nitrophényl-béta-D-galactosidase est hydrolysée par la béta-galactosidase en béta-D-galacto se et en o-nitrophénol, de couleur jaune ou jaune pâle.
XYL Fermentation du xylose	L'acidité produite par la fermentation du xylose change la couleur de l' indicateur, le pourpre de bromocrésol (jaune).
RHAM Fermentation du rhamnose	L'acidité produite par la fermentation du rhamnose change la couleur de l' indicateur, le poupre de de bromocrésol (jaune).
MANN Fermentation du mannitol	L'acidité produite par la fermentation du mannitol change la couleur de l' indicateur, le pourpre de de bromocrésol. (jaune).
SORB Fermentation du sorbitol	L'acidité produite par la fermentation du sorbitol change la couleur de l' indicateur, le pourpre de de bromocrésol (jaune).

II. PROCEDURE

1. Sélectionner une colonie suspecte isolée et l'ensemencer en stries sur milieu TSA-YE pour confirmer la pureté. Incuber le TSA-YE à 37°C pendant 24 heures ou jusqu'à ce que la croissance soit satisfaisante.
2. Quand une culture pure est obtenue, effectuer les tests Gram, oxydase et catalase. Seules les bacéries Gram positif, oxydase négative, catalase positive doivent être testées sur le Micro-ID.
3. Mettre en suspension les colonies dans 4,6 ml de solution saline stérile dans un tube à essai.

   Les bactéries en suspension doivent avoir une turbidité égale au standart n° 1 de Macfarland. Utiliser cet inoculum pour le CAMP test et pour l'inoculation de l' unité de Micro-ID Listeria.
4. Ouvrir l'emballage métallisé et placer l'unité de Micro-ID Listeria à plat sur la paillasse. Il ne faut pas enlever la bande plastique couvrant les puits.
5. Inscrire le numéro d' échantillon sur l'espace prévu sur le coté droit du couvercle.
6. Ouvrir le couvercle et pipeter approximativement 0,3 ml de la suspension bactérienne dans chaque puits d' inoculation (puits supérieurs).
7. Fermer le couvercle et placer la galerie verticalement sur son support. S' assurer que les bactéries en suspension soient en contact avec les disques de substrat et ne pas coucher la galerie (les disques de détection doivent rester secs).
8. Incuber à 35-37°C .
9. Après 4 heures, noter les réactions de l' esculine (E) et du rhamnose (RHAM). Si les deux sont positives, L. monocytogenes est suspecté et la galerie doit être incubée pendant 20 heures supplémentaires. Si ces tests sont négatifs, la bactérie n' est pas L. monocytogenes
10. Après 24 heures d'incubation, placer l'unité à plat sur la paillasse, ouvrir le couvercle et ajouter deux gouttes (0,1 ml à peu près) de KOH à 20% dans le puits d'inoculation du test de VP uniquement. Ne pas ajouter de KOH dans les autres puits d'inoculation.
11. Fermer le couvercle et mettre la galerie en position verticale. Il faut être sûr que le KOH a coulé dans la solution du test VP. Ensuite faire tourner l' unité de Micro-ID Listeria de 90° dans le sens des aiguilles d'une montre de telle sorte que les disques dans les cinq premiers puits soient humidifiés.

    Remettre la galerie en position verticale et s'assurer par tapotement que la solution n'est pas piégée sous les disques d'identification.
12. Lire toutes les réactions immédiatement à l'exception du test VP (Laisser la couleur se développer pendant 10 minutes approximativement dans le puits et, ensuite, lire le résultat).

    Lire la couleur des disques supérieurs pour les 5 premiers tests et la couleur des suspensions pour les 10 tests restant.

Effectuer un CAMP test avec S. aureus béta-hémolytique et R. equi et un test d'hémolyse sur gélose au sang

III. IDENTIFICATION

La différenciation des espèces du genre Listeria est basée sur un code à 8 chiffres (octal code).

1. Reporter les résultats du test (positif ou négatif) dans les espaces appropriés sur la feuille de résultat. Les chiffres pour chaque test positif sont indiqués au dessus de "test result".

   Dans chaque groupe de 3 tests, les chiffres pour une réaction positive sont de 4 pour le coté gauche, 2 pour la position centrale et 1 à droite.

   Le chiffre pour un test négatif est 0 quelque soit la position.

2. Additionner les chiffres pour chaque groupe de 3 tests et noter la somme dans l' espace approprié sur " Sum of positives values "

	Octal Code	CAMP Reaction		ID	β-hemolysis
		S. aureus	*R. equi*		
Art.	04044	+	-	*L. monocytogenes*	+
	44040	-	-	*L. innocua*	-
	44041	-	-	*L. innocua*	-
	44042	-	-	*L. murrayi or L. grayi*	-
	44043	-	-	*L. murrayi or L. grayi*	-
	44044	+	-	*L. monocytogenes*	+
	44044	-	-	*L. innocua*	-
	44045	+	-	*L. monocytogenes*	+
	44045	-	-	*L. innocua*	-
	44046	-	-	*L. murrayi*	-
	44047	-	-	*L. murrayi*	-
	44050	-	+	*L. ivanovii*	+++
	44050	-	-	*L. welshimeri*	-
	44050	+	-	*L. seeligeri*	+
	44050	-	-	*L. seeligeri*	+
	44051	+	-	*L. seeligeri*	+
	44051	-	-	*L welshimeri*	-
	44051	-	+	*L. ivanovii*	+++
	44054	-	-	*L. welshimeri*	-
	44055	-	-	*L. welshimeri*	-
	44064	+	-	*L. monocytogenes*	+
	44065	+	-	*L. monocytogenes*	+

Résultats du test MICRO-ID.

Souches	CAMP Sa	CAMP Re	Hémo-lyse	VP	N	PD	H_2S	I	OD	LD	M	U	E	ONPG	XYL	RHAM	MANN	SORB
L. monocytogenes	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	V	-	+	-	V
L. seeligeri	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	V
L. ivanovii	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	V
L. grayi	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	V
L. murrayi	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	V	+	V
L. welshimeri	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	V	-	V
L. innocua	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	V

ANNEXE X :

AutoMicrobic.

Tests biochimiques de la fiche d'identification Gram-positif en microaérophilie

Contrôle de la croissance	Urée	Tréhalose
Bacitracine	Rouge de tétrazolium	Arabinose
Opticine	Novobiocine	Pullulane
Hémicellulose	Dextrose	Pyruvate
NaCl 6 %	Lactose	Inuline
Bile 10 %	Mannitol	Mélibiose
Bile 40 %	Raffinose	Mélézitose
Esculine	Salicine	Cellobiose
Arginine contrôle négatif	Sorbitol	Ribose
Arginine	Saccharose	Xylose

Tests biochimiques de la fiche d'identification Gram-négatif

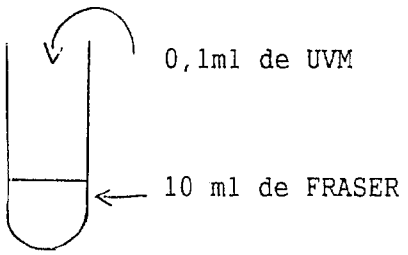
Aérobie	Microaérophilie
DP-300 (2, 4, 4'-Trichloro-2'-hydroxydiphényl éther)	Raffinose
Glucose (voie oxydative)	Sorbitol
Contrôle de la croissance	Saccharose
Acétamide	Inositol
Esculine	Adonitol
"Plant indican"	Acide para-coumarique
Urée	H_2S
Citrate	ONPG
Malonate	Rhamnose
Tryptophane	Arabinose
Polymyxine B	Glucose (voie fermentative)
Lactose/Lactose 10 %	Arginine
Maltose	Lysine
Mannitol	Contrôle de base
Xylose	Ornithine

ANNEXE XI :

Schéma d'analyse des produits carnés.

Enrichissement : 25g d'échantillon dans 225ml de UVM
+ la solution d'acriflavine
incubation 24H à 30°c

Enrichissement secondaire :



incubation 24H à 30°c

Isolement : étalement sur gélose Oxford
incubation 24-48H à 37°c

Repiquage des colonies suspectes sur TSA + YE
incubation 24H à 30°c

Examen des colonies en lumière oblique suivant la technique d'HENRY

Repiquage d'une colonie suspecte dans un bouillon TSB + YE
incubation 24H à 37°c

Réaction de confirmation : coloration de Gram
catalase
mobilité
épreuve de CAMP
attaque des hydrates de carbone

ANNEXE XII :

Schéma d'analyse des produits laitiers.

DIAGRAMME DU MODE OPERATOIRE

Enrichissement : 25 g ou 25 ml dans 225 ml de bouillon EB
incuber à 30°C pendant 48 h en général
24 h et 48 h pour lelait cru,
48 h et 7 jours pour les fromages

↓

Isolement : gélose Ox, ou PALCAM ou MOx

↓

confirmation : sélectionner 5 colonies typiques
isoler sur gélose TSAou TSA+YE
incuber à 30°C pendant 24 h
identification des colonies

Echantillon de fromage : Prise d'essai

La recherche de listeria monocytogenes est effectuée sur un échantillon moyen de 25 g de fromage. Il s'obtient en prélevant sur chacun des 5 fromages d'une fabrication identique, une prise d'essai de 5 g. La prise d'essai de 5 g est réalisée de la manière suivante :
Déballer le fromage, puis à l'aide d'une sonde à fromage de préférence, prélever aseptiquement sans éliminer la croute ; le rapport pâte - croute doit être d'environ 2/3 - 1/3.
Rassembler les 5 prises d'essai de 5 g dans le bol stérile d'un agitateur rotatif ou dans un sac plastique stérile (cas du Stomacher).
Transférer aseptiquement 225 ml du bouillon d'enrichissement sélectif. Puis homogénéiser pendant 2 min.
Si nécessaire, transférer aseptiquement dans un récipient stérile de capacité appropriée.
Incuber à 30°C pendant 48 h et 7 jours.

ANNEXE XIII :

Méthode pour la recherche de Listeria monocytogenes du 24 Juin 1993.

1 Domaine d'application

La présente norme décrit le protocole pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans tous les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par enrichissement, isolement sur milieux sélectifs puis identification des colonies.
Cette méthode est la méthode bactériologique préconisée dans le cadre des contrôles officiels et des autocontrôles. (note [1])

2 Définitions

Listeria spp : Microorganisme formant des colonies typiques sur un milieu sélectif solide et présentant les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques décrites ci-après lorsque les essais sont effectués conformément à la présente méthode.

Listeria monocytogenes : Espèce de *Listeria* considérée comme pathogène et qui peut être différenciée des autres espèces non pathogènes pour l'homme grâce à ses caractères biochimiques spécifiques.(note [2])

Recherche de *Listeria monocytogenes* : Détermination de la présence ou de l'absence de ce microorganisme dans une masse ou un volume déterminé, en effectuant les essais par la présente méthode.

3 Principe

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

3.1 Enrichissement primaire en milieu sélectif liquide.
Ajouter la prise d'essai dans le bouillon Fraser-demi, de façon à obtenir un rapport prise d'essai / milieu d'enrichissement égal à 1/10 (masse à volume ou volume à volume). Puis incubation à 30°C pendant 18h à 24 h.

3.2 Isolement de l'enrichissement primaire sur un milieu sélectif gélosé
A partir de la culture obtenue en (3.1), ensemencement d'une des deux géloses suivantes : Oxford ou PALCAM. Incuber à 37°C pendant 20 h à 24 h et, si nécessaire 48 h.

3.3 Enrichissement secondaire en milieu sélectif liquide
Réalisation d'une subculture par inoculation de 0,1 ml de la culture obtenue en (3.1) dans 10 ml de bouillon Fraser. Incuber à 37°C pendant 18 h à 24 h puis réincuber de nouveau 18 h à 24 h.

3.4 Isolement de l'enrichissement secondaire
A partir des cultures obtenues en (3.3), à la fin de chacune des 2 périodes d'incubation, ensemencement de l'un des deux milieux sélectifs gélosés suivant : Oxford ou PALCAM.

3.5 Identification
Examen des milieux d'isolement après 20 h à 24 h et, si nécessaire 40 h à 48 h, d'incubation afin de détecter la présence de colonies caractéristiques, présumées être des *Listeria spp*.
Repiquage sur une gélose non sélective, par exemple tryptone soja agar extrait de levure (TSAYE) puis identification à l'aide de tests morphologiques.physiologiques et biochimiques. (note [2])

---

[1] les méthodes "dites rapides" validées par l'AFNOR peuvent aussi être utilisées.(voir la note de service DGAL/SDHA/N°8053 du 9 mars 1993)

4. Diluant, Milieux de culture et Réactifs

4.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir NF V 08-002
Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. De la même façon les milieux prêts à l'emploi, les préparations commerciales de réactifs peuvent être utilisés. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

4.2 Diluant

Voir NF V 08-010 et la norme spécifique traitant du produit à examiner.

4.2 Milieux de culture

4.2.1 BOUILLON D'ENRICHISSEMENT SELECTIF

4.2.1.1 Bouillon d'enrichissement pour *Listeria* (formule Fraser-demi)

Composition

Protéose peptone	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 dihydraté	12,0 g
dihydrogénophosphate de potassium	1,35 g
Esculine	1,0 g
Citrate de fer III ammoniacal	0,500 g
chlorure de lithium	3,0 g
Acriflavine (chlorhydrate)	0,0125 g
Acide nalidixique (sel de sodium)	0,010 g
Eau	1 000 ml

Préparation

Suivre les indications du fabricant pour les milieux complets deshydratés, du commerce.
Mélanger tous les composants, sauf l'acide nalidixique, l'acriflavine et le citrate de fer, avec l'eau, et chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2. Répartir en flacons à raison d'un volume V = 9 fois la masse ou le volume de la prise d'essai. Stériliser le milieu à 121°C pendant 15 min.
Après refroidissement et juste avant l'utilisation ajouter les trois derniers composants sous forme de solutions stérilisées par filtration, par exemple pour 1000 ml de base,

- 5 ml d'une solution aqueuse de chlorhydrate d'acriflavine à 0,25%
- 5 ml d'une solution aqueuse à 0,2% de sel de sodium de l'acide nalidixique
- 10 ml d'une solution aqueuse à 5% de citrate de fer III ammoniacal

Remarque :
Seul l'acide nalidixique peut être ajouté en même temps que les composants de la base et autoclavé.
Dans le cas où la solution stock est conservée à +4°C, dissoudre lesel de sodium de l'acide nalidixique dans une solution d'hydroxyde de sodium 0,05 M

4.2.1.2 bouillon d'enrichissement pour *Listeria* (formule de Fraser)

Composition (selon Fraser J.A. et Sperber V.H., 1988, J. Food Protect ; modifié par Mc Clain D et LEE W.H., 1989, USDA- FSIS Microbiology communication n°57)

Proteose peptone	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 dihydraté	12,0 g
dihydrogénophosphate de potassium	1,35 g
Esculine	1,0 g
chlorure de lithium	3,0 g
Acriflavine (chlorhydrate)	0,025 g
Acide nalidixique (sel de sodium)	0,020 g
Citrate de fer III ammoniacal	0,500 g
Eau	1 000 ml

Préparation

Suivre les indications du fabricant pour les milieux complets déshydratés, du commerce.

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 de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2.

Répartir en tubes à raison de 10 ml . Stériliser le milieu à 121°C pendant 15 min.

Après refroidissement et juste avant l'utilisation, ajouter à 10 ml

- 0,1 ml d'une solution aqueuse à 0,2% de sel de sodium de l'acide nalidixique stérilisée par filtration
- 0,1 ml d'une solution aqueuse d'acriflavine à 0,25% stérilisée par filtration .
- 0,1 ml d'une solution aqueuse de citrate de fer III ammoniacal à 5%

Remarque :

Seul l'acide nalidixique peut être ajouté en même temps que les composants de la base et autoclavé.

Dans le cas où la solution-stock est conservée à +4°C, dissoudre le sel de sodium de l'acide naldixique dans une solution d'hydroxyde de sodium 0,05 M

4.2.2 MILIEUX D'ISOLEMENT

4 2 2 1 Gélose sélective pour *Listeria* (formule Oxford)

4.2.2.2 Gélose sélective pour *Listeria* (formule PALCAM)

4.2.3 MILIEUX D'IDENTIFICATION

4.2.3.1 Gélose trytone soya extrait de levure (T.S.A.Y.E.)

4.2.3.2 Gélose au sang

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

Milieu de base : blood agar base n° 2, soit :

proteose peptone	15 g/l
hydrolysat de foie	2,5 g/l
extrait de levure	5 g/l
chlorure de sodium	5 g/l
Agar agar	12 g/l

milieu complet :	blood agar base n° 2	4 g
	eau	100ml
	suspension d'hématies	5 à 7 ml
	ou sang de mouton ou cheval défibriné	

Préparation

Pour préparer le milieu complet, au choix utiliser du sang défibriné ou une suspension d'hématies.

Préparation de la suspension d'hématies : recueillir du sang d'un animal sain (mouton, bovin ou cheval) dans des conditions stériles dans des tubes contenant un liquide stérile de composition suivante :

acide citrique	29 g
citrate trisodique	80 g
glucose	180 g
eau	840 ml

Mélanger 50 ml de ce liquide à 1 litre de sang. Centrifuger à 900 g (g = 9,81 m/s^2) pendant 30 min.
Eliminer 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.

Dissoudre les composants de base dans l'eau en portant à ébullition. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 .
Ajoutér au milieu de base fondu et refroidi à 45°C environ, le sang de mouton ou de cheval défibriné stérile ou la suspension d'hématies. Mélanger convenablement et couler en boîte de Pétri stérile à raison de 12 ml à 20 ml.

4.2.3.3 Gélose mobilité
L'un deux milieux suivants peut être utilisés :
* milieu SIM

* milieu mobilité
composition

Peptone de caséine	20,0 g
Peptone de viande	6,1 g
Agar agar	3,5 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 de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,3. Répartir en tubes à raison de 5ml par tube. Stériliser à 121°C pendant 15 min.

4.2.3.4 Milieux pour la fermentation des hydrates de carbone.

Milieu de base (purple broth base)
Composants

Proteose peptone	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 de sorte qu'après stérilisation il soit de 6,8. Répartir en tubes de sorte qu'après stérilisation ils contiennent 9ml dans le cas d'ajout de solution, 10 ml lors d'utilisation de disques imprégnés d'hydrate de carbone. Stériliser à 121°C pendant 15 min.

Solution d'hydrate de carbone
Composition

Hydrate de carbone (xylose ou Rhamnose)	5 g
Eau	100 ml

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

Milieu complet
Préparer des milieux dont la concentration finale en xylose ou rhamnose est de 0,5 p. 100 soit par adjonction de 1 ml de solution de xylose ou rhamnose à 9 ml de milieu de base, soit par addition d'un disque à 10 ml de milieu de base.

4.2.3.5 C.A.M.P. (test de Christie, Atkins, Munch-Paterson)
Gélose
voir 4.2.3.2

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.
Entretenir les cultures par exemple sur des géloses inclinées TSAYE incubées à 37°C pendant 24 à 48 h et stockées à 4°C. Repiquer les souches régulièrement (au moins une fois par mois).

5 Mode opératoire

5.1 Prise d'essai
Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.
Pour la préparation de l'échantillon et la prise d'essai, voir la norme ISO 6887 et les normes concernant pour le produit à examiner.
Pour la préparation de la suspension-mère, utiliser comme diluant le milieu d'enrichissement préconisé pour la phase primaire de l'enrichissement.

5.2 Phase d'enrichissement

5.2.1 enrichissement primaire

Introduire une quantité (x) de prise d'essai (masse ou volume) dans un volume du premier bouillon d'enrichissement, formule Fraser-demi (4.2.1.1), de façon à obtenir un rapport prise d'essai / milieu d'enrichissement de 1/10 (rapport masse/volume ou volume/volume).
Incuber à 30°C pendant 18h à 24h.

5.2.2 Enrichissement secondaire

Prélever 0,1 ml du bouillon Fraser-demi incubé obtenu en (5.2.1). et inoculer 10 ml de bouillon d'enrichissement formule Fraser (4.2.1.2).
Incuber à 37°C pendant 18 h à 24 h et réincuber jusqu'à 42 h - 48 h.

5.3. Isolement de *Listeria spp*
Par échantillon, 3 géloses au moins sont ensemencées :

A partir de l'enrichissement primaire

Prélever à l'aide d'une anse bouclée un aliquot du bouillon demi-Fraser incubé (5.2.1) et isoler sur une gélose Oxford, ou PALCAM.
Incuber à 37°C pendant 20 h à 24 h et si nécessaire 48 h.

A partir de l'enrichissement secondaire

Procéder comme ci-dessus à partir du bouillon d'enrichissement formule Fraser incubé 18 h à 24 h (5.2.2)et renouveler l'opération à partir du même bouillon incubé 42 h à 48 h.

5.4 Identification

5.4.1 Identification présomptive de *Listeria spp* : observation des géloses d'isolement
Examiner chacune des 3 géloses d'isolement (5.3) après 20 h à 24 h et, si nécessaire 48 h d'incubation.

* sur gélose sélective pour *Listeria* formule Oxford, les *listeria* forment en 24 h des colonies grises ou gris-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.

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

Sélectionner 5 colonies typiques sur chaque boîte. S'il y en a moins de 5, les retenir toutes.

5.4.2 Identification du genre et de l'espèce

L'un des protocoles cités ci-dessous peut être suivi :

- La technique classique consiste à purifier la colonie puis à l'identifier à l'aide de tests morphologiques, physiologiques et biochimiques (méthode classique en tubes ou méthode par galerie miniaturisée).
- Une technique alternative consiste à identifier *Listeria monocytogenes* par la mise en évidence d'une séquence spécifique de son ADN (par exemple à l'aide de sonde par hybridation ou par PCR).

Seule la méthode dite classique est décrite ci-desssous.

5.4.2.1 Isolement des colonies sélectionnées sur TSAYE.
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, elles apparaissent bleuâtres avec une surface granuleuse.

5.4.2.2 Tests de confirmation du genre

réaction de la catalase

coloration de Gram.

examen de la mobilité :
L'examen de la mobilité est réalisé soit au microscope sur un état frais (1), soit en milieu gélosé (2).
(1) Préparer un étalement d'une suspension d'une colonie en solution saline à 0,85%. Examiner au microscope ; les *Listeria* présentent une mobilité en pirouette caractéristique à 25°C - 30°C.
(2) Sur une gélose mobilité inoculée par piqûre centrale et incubée 48 h à 25°C, les *Listeria* poussent autour de la piqûre et présentent le plus souvent une pousse typique dite en ombrelle.

Sélectionner les souches catalase (+), Gram (+) et mobile

5.4.2.3 Tests d'identification de l'espèce, *Listeria monocytogenes*
* CAMP test
* Hémolyse
* Fermentation du xylose et du rhamnose

5.4.2.4 Résumé des tests d'identification
L.monocytogenes est Gram (+), catalase (+), mobile, CAMP/R. equi (–), CAMP/S.aureus (+), D-xylose (–), rhamnose(+).

ANNEXE A 1: Schéma du mode opératoire

Enrichissement : 1 ère phase

X g ou X ml dans un volume (9X) de la base du bouillon "Fraser-demi"

⇓

incuber à 30°C

⇓

pendant 18 h à 24 h ⇒ **Isolement** sur Oxford ou PALCAM

⇓

2ème phase

0,1 ml du bouillon "Fraser-demi" dans 10 ml de bouillon "Fraser"

Incuber à 37°C

⇓

18 h à 24 H ⇒ **isolement** sur Oxford ou PALCAM

⇓

42 h à 48 h ⇒ **isolement** sur Oxford ou PALCAM

Identification :

par des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques (galerie de tubes ou galerie miniaturisée)
isolement des colonies caractéristiques sur TSAYE
identification du genre : Gram, catalase, mobilité
identification de l'espèce : CAMP, hémolyse, xylose, rhamnose

ou par toutes autres méthodes donnant des résultats équivalents

ANNEXE A 2 Identification des espèces de *Listeria*

Espèce	hémolyse	CAMP-R. equi	Test S. aureus	D-xylose	L-rhamnose	mannitol	reduction des Nitrates
L. monocytogenes	+	–	+	–	+	–	–
L. innocua	–	–	–	–	V	–	–
L. ivanovii	+	+	–	+	–	–	–
L. welshimeri	–	–	–	+	V	–	–
L. seeligeri	+	–	+	+	–	–	–
L. grayi	–	–	–	–	–	+	–
L. murrayi	–	–	–	–	–	+	+

ANNEXE XIV :

Méthode de dénombrement de Listeria monocytogenes dans les produits végétaux ou d'origine végétale.

Conformément à l'article 2 de l'arrêté du 13 mars 1992 relatif au contrôle microbiologique des produits végétaux ou d'origine végétale, les laboratoires chargés de concourir à l'application de la réglementation concernant la répression des fraudes sont tenus d'utiliser la méthode mentionnée ci-dessous pour effectuer le dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans les produits végétaux ou d'origine végétale.

MICROBIOLOGIE - MÉTHODE DE DÉNOMBREMENT DES *LISTERIA MONOCYTOGENES* - TECHNIQUE PAR COMPTAGE DES COLONIES À 37 °C.

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode donne les directives pour le dénombrement des *Listeria monocytogenes* dans les produits végétaux ou d'origine végétale destinés à la consommation humaine par comptage des colonies à 37 °C.

2. Références

NF V 08-010 : 1982 (ISO 6887) - Microbiologie - Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.

NF V 08-002 : 1985 (ISO 7218) - Microbiologie - Directives générales pour les examens microbiologiques.

3. Définitions

Dans le cadre de la présente méthode, les définitions suivantes sont applicables.

3.1. *Listeria spp :* micro-organismes formant des colonies caractéristiques à la surface de milieux de culture sélectifs et possédant les propriétés morphologiques et biochimiques décrites lorsque l'essai est exécuté selon la présente méthode.

3.2. – *Listeria monocytogenes : Listeria spp.* considérées comme pathogènes et qui donnent des réactions de confirmation spécifiques positives quand ces essais sont exécutés selon la présente méthode.

4. Principes

4.1. Ensemencement en surface de milieux de culture sélectifs déterminés, coulés en boite de Pétri, avec une quantité définie de l'échantillon pour essai, si le produit est liquide, ou de la suspension mère pour les autres produits. Le comptage des colonies sera effectué sur un des trois milieux sélectifs mentionnés en 5.3.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.2. Incubation de ces boites en aérobiose à 37 °C pendant 24 heures et/ou 48 heures.

4.3. Repérage et comptage des colonies caractéristiques obtenus sur les milieux sélectifs, puis confirmation par les tests morphologiques et biochimiques.

4.4. Calcul du nombre de *Listeria monocytogenes* par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans des boites choisies aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif.

5. Milieux de culture et diluant

5.1. Composants de base :

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du milieu de culture, des composants de base déshydratés ou un milieu complet déshydraté. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être distillée ou déionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des Listeria dans les conditions de l'essai.

Les mesures du pH doivent être effectuées au moyen d'un pH mètre à compensation de température.

Si le diluant et les milieux ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité entre 0 et 5 °C pendant un mois au maximum dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

5.2. Diluant :

Se reporter à la norme NFV 08-010 (ISO 6887) et à la norme internationale spécifique du produit à examiner.

5.3. Milieux utilisés pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes.*

5.3.1. Milieu d'isolement d'Oxford Curtis (1) :

5.3.1.1. Milieu de base :

Composition :
Mélange spécial de peptones : 23,0 g ;
Amidon de maïs : 1,0 g ;
Chlorure de sodium : 5,0 g ;
Esculine : 1,0 g ;
Citrate ferrique ammoniacal : 0,5 g ;
Chlorure de lithium : 15,0 g ;
Agar agar : 12,0 à 18,0 g (2) ;
Eau : 1 000 ml.

(1) Curtis G.D.W., Mitchell M.G., King A.F. and Griffin E.J. (1988, Personnal Communication, John Radcliffe Hospital, Oxford, U.K.)
(2) Selon les prescriptions du fabricant.

Préparation :

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

Si nécessaire, ajuster le pH, de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2.

Répartir le milieu gélosé dans des récipients appropriés. Stériliser à 121 °C pendant 15 mn.

5.3.1.2. Supplément pour 1 l du milieu de base :

Cycloheximide : 400 mg ;
Colistine sulfate : 20 mg ;
Acriflavine HCl : 5 mg ;
Cefotetan : 2 mg ;
Fosfomycine : 10 mg ;
Ethanol : 5 ml ;
Eau stérile : 5 ml.
Dissoudre dans le mélange eau/éthanol.

5.3.1.3. Milieu complet : ajouter la quantité de supplément appropriée au milieu de base fondu et refroidi à environ 45 °C, bien homogénéiser, et couler en boîtes de Pétri stériles.

Les boîtes ainsi préparées peuvent être stockées quinze jours entre 0 et 5 °C à l'abri de la déshydratation (boîte à l'endroit en sac plastique fermé hermétiquement).

5.3.2. Milieu d'isolement de Mox (1) (Oxford modifié au Moxalactam).

5.3.2.1. Milieu de base :

Composition :
Gélose columbia modifiée : 38,1 g ;
Esculine : 1,0 g ;
Citrate ferrique ammoniacal : 0,5 g ;
Chlorure de lithium : 15,0 g ;
Colistine : 0,01 g ;
Eau : 1 000 ml.

(1) MacClain and Lee, May 24, 1989, FSIS method for isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products, Laboratory communication n° 57, Microbiology Division, Food safety and inspection service U.S. Departement of Agriculture, Beltsville, Md.

Préparation :

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

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7.

Répartir le milieu de base gélosé dans des récipients appropriés, stériliser à 121 °C pendant 15 mn.

5.3.2.2. Supplément pour 1 l de milieu de base :

Moxalactam : 0,02 g ;
Eau stérile : 2 ml.
Dissoudre aseptiquement le moxalactam dans l'eau ou filtrer.

5.3.2.3. Milieu complet :

Ajouter la quantité de supplément appropriée au milieu de base fondu et refroidi à environ 45 °C, bien homogénéiser et couler en boîtes de Pétri stériles. Les boîtes ainsi préparées peuvent être conservées quinze jours environ entre 0 et 5 °C (voir 5.3.1.3).

5.3.3. Milieu de Palcam (1) :

5.3.3.1. Milieu de base :

Composition :
Mélange spécial de peptones : 23,00 g ;
Amidon de maïs : 1,00 g ;
Chlorure de sodium : 5,00 g ;
Glucose : 0,50 g ;
Mannitol : 10,00 g ;
Esculine : 0,80 g ;
Citrate ferrique ammoniacal : 0,50 g ;
Chlorure de lithium : 15,00 g ;
Rouge de phénol : 0,09 g ;
Agar agar : 12 à 18,00 g (2) ;
Eau : 1 000 ml.

(1) Van Netten P., Van de Ven A., Perales I and Moseel D.A.A. (1988). A selective and diagnostic medium for use in the enumeration of Listeria son in foods. Int. J. Food Microbiol. 6.187-198.
(2) Selon les prescriptions du fabricant.

Préparation :

Dissoudre des composants de base ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en portant à l'ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2.

Répartir le milieu de base gélosé dans des récipients appropriés, stériliser à 121 °C pendant 15 mn.

5.3.3.2. Supplément pour 1 l de mélange :

Acriflavine HCl : 5,0 mg ;
Ceftazidime : 20,0 mg ;
Sulfate de Polymyxine B : 10,0 mg ;
Eau stérile : 10 ml.
Dissoudre aseptiquement les composants dans l'eau.

5.3.3.3. Milieu complet.

idem 5.3.2.3.

5.4. Milieux de confirmation :

5.4.1. T.S.A.Y.E. :

Composition :
Trypticase : 17,0 g ;
Soytone : 3,0 g ;
Extrait de levure : 6,0 g ;
Chlorure de lithium : 5,0 g ;
Phosphate bipotassique : 2,5 g ;
Glucose : 2,5 g ;
Agar agar : 12,0 à 18,0 g (1) ;
Eau : 1 000 ml.

(1) Selon les prescriptions du fabricant.

Dissoudre les composants de base ou le milieu complet deshydraté dans l'eau à l'ébullition, si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,3.

Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à 121 °C pendant 15 mn.

Conserver entre 0 et 5 °C, un mois maximum, en évitant toute déshydratation du milieu surtout s'il est coulé en boîte de Pétri.

5.4.2. Gélose au sang :

Milieu base : milieu 5.4.1.

Milieu complet : ajouter au milieu de base fondu et refroidi à 45 °C environ, 7 p. 100 de sang de mouton défibriné stérile. Mélanger convenablement et couler en boîte de Pétri stérile. Conservation entre 0 et 5 °C, un mois maximum.

5.4.3. Gélose mobilité (milieu SIM) :

Extrait de viande 3 g. - Extrait de levure 6 g. - Peptone 10 g. - Chlorure de sodium 5 g. - Agar agar 3 g à 6 g. - Eau 1 000 ml. - pH 7,4.

Répartir à raison de 6 ml dans des tubes de 16 × 160 mm. Stériliser à 121 °C pendant 15 mn.

5.4.4. Milieu pour la fermentation du xylose et du rhamnose.

Milieu de base : géiysate 10 g. - Chlorure de sodium 5 g. - Pourpre de bromocrésol 0,02 g. - Eau 1 000 ml. - pH 6,8. Répartir à raison de 10 ml en tubes de 16 × 160 mm, lors de l'emploi de gluci-discs ou 9 ml si on ajoute la solution de sucre. Stériliser à 121 °C pendant 15 mn. Les solutions de D. xylose, L. rhamnose (voir ci-dessous) peuvent être remplacées par des gluci-discs Biomérieux.

Pour les deux hydrates de carbone, préparer des solutions à 5 p. 100 en eau distillée. Stériliser par filtration en utilisant une membrane de porosité 0,45 µm.

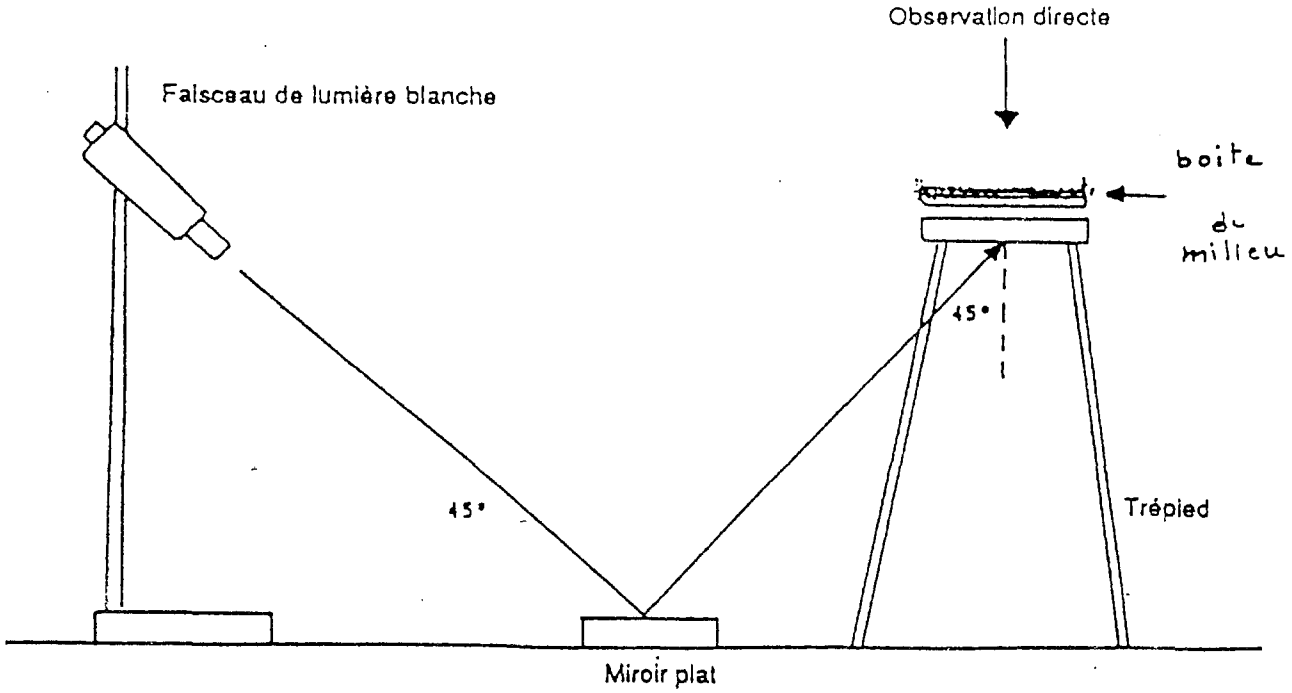
Ajouter 1 ml de solution de xylose ou de rhamnose à 9 ml de « milieu base » afin d'obtenir une concentration finale à 0,5 p. 100 d'hydrate de carbone.

5.4.5. Eau oxygénée.

Solution à 3 p. 100.

6. Appareillage et verrerie

Le matériel courant du laboratoire de microbiologie et un dispositif pour le test d'illumination d'Henry.



EXAMEN DES BOÎTES POUR LE REPÉRAGE DES COLONIES SUSPECTES

Test d'illumination d'Henry

Pour la source lumineuse, vous pouvez utiliser « Bausch and Lomb Nicholas Illuminator, cat. n° 31-33-05-28, voir Fisher 86 catalog p. 1036 ».

Réf : Listeriosis H.P.R. Seeweer, Hafner publishing Co., New York, 1961, p. 2

7. Echantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme internationale spécifique du produit concerné.

S'il n'y a pas de norme internationale spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8. Préparation de l'échantillon pour essai

Voir la norme internationale spécifique du produit concerné.

S'il n'y a pas de norme internationale spécifique disponible, 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.

Se reporter à la norme NFV 08-010 (ISO 6887) et à la norme internationale spécifique du produit à examiner.

9.2. Ensemencement.

9.2.1. Transférer, avec une pipette stérile, 0,1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 0,1 ml de la suspension mère pour les autres produits à la surface d'une boîte de milieu gélosé (5.3.1) préalablement séché et/ou le milieu 5.3.2 et/ou le milieu 5.3.3. Répéter l'opération avec la dilution 10^{-1} et les dilutions suivantes si nécessaire.

9.2.2. Etaler l'inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé en essayant de ne pas toucher les bords de la boîte avec l'étaleur en verre. Utiliser un étaleur en verre stérile pour chaque boîte. Laisser sécher les boîtes avec leur couvercle durant environ 15 mn à la température ambiante.

9.3. Incubation :

Retourner les boîtes préparées selon 9.2.2 et les faire incuber durant vingt-quatre et quarante-huit heures dans l'étuve réglée à 37 ± 1 °C.

9.4. Sélection des boîtes et interprétation :

Après vingt-quatre heures d'incubation, repérer les colonies caractéristiques éventuellement présentes.

Incuber à nouveau les boîtes à 37 ± 1 °C durant vingt-quatre heures supplémentaires, et repérer les nouvelles colonies caractéristiques.

Ne retenir pour le dénombrement que les boîtes (9.2.1 et 9.4) renfermant entre 15 et 150 colonies caractéristiques. Choisir, en vue de la confirmation, 5 colonies caractéristiques à partir de chaque boîte.

S'il y a moins de 15 colonies caractéristiques sur les boîtes ensemencées avec le produit liquide non dilué ou avec la dilution la plus faible pour les autres produits, il est possible de faire une estimation comme décrit dans la norme *Staphylococcus aureus* (NFV 08-014 : 1984).

Aspect des colonies caractéristiques.

Après vingt-quatre heures d'incubation, les souches de Listeria développent des colonies noires verdâtres associées à un noircissement du milieu. Après quarante-huit heures, les colonies noires, au centre déprimé de 1 à 2 mm de diamètre, sont cernées d'un halo brun noir.

10. Confirmation

10.1. Prélever le nombre de colonies suspectes requis et isoler en stries à la surface de la gélose TSA.YE (5.4.1) coulée en boîtes de Pétri et séchée, pour purification. Incuber à 37 °C pendant vingt-quatre heures ou jusqu'à ce que la croissance soit satisfaisante.

Examiner les boîtes de Pétri et repérer les colonies suspectes à l'aide d'un faisceau lumineux blanc suffisamment puissant pour illuminer convenablement la boîte en le dirigeant de manière à atteindre le fond de la boîte sous un angle de 45 °C. Lorsque l'on examine sous cette lumière transmise en oblique et en position perpendiculaire au-dessus de la boîte, les Listeria présentent des surfaces « bleues-grises » (voir appareillage). Si les boîtes de TSA.YE ne présentent pas un grand nombre de colonies typiques convenablement isolées, réisoler une colonie typique puis procéder de la manière suivante :

Les colonies typiques sont soumises à l'épreuve de la catalase et à la coloration de Gram. Si la culture présente des petits bacilles Gram positif et une catalase positive, poursuivre les épreuves pour identifier *Listeria monocytogenes*.

Fermentation du xylose et du rhamnose.

Inoculer les deux milieux liquides et les incuber à 37 °C pendant sept jours, bien que la plupart des réactions positives puissent apparaître en vingt-quatre et quarante-huit heures.

Epreuve du Camp :

Utiliser pour cette épreuve une gélose au sang de mouton (5.4.2) préalablement séchée.

Cette épreuve facilite l'appréciation du pouvoir bêta-hémolytique des espèces *L. monocytogenes* et surtout *L. seeligeri*. Il est recommandé d'utiliser une souche de *S. aureus* ayant une zone de bêta-hémolyse importante et une souche de *Rhodococcus equi* qui en exaltant la bêta-hémolyse de *L. ivanovii* la fait paraître sous un aspect caractéristique en forme de pelle. Les deux souches sont disponibles au Laboratoire central d'hygiène alimentaire, 43, rue de Dantzig, 75015 Paris.

Prélever une colonie typique et faire une préparation pour un examen à l'état frais. Sur une lame porte-objet, émulsionner la colonie dans une solution à 0,85 p. 100 de chlorure de sodium ;

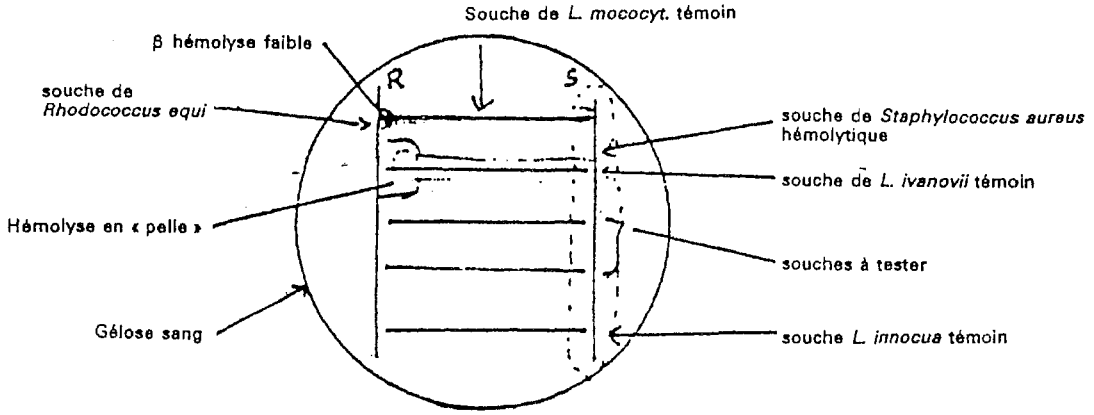
recouvrir avec une lamelle et examiner au microscope en contraste de phase avec un objectif à immersion.

L. monocytogenes se présente sous la forme de bacilles minces, courts, animés de légers mouvements rotatifs ou d'une mobilité en pirouettes. Il se peut que la mobilité soit réduite ou absente, ceci étant dû à la température d'incubation de 37 °C de la boîte. Il y a lieu d'avoir toujours pour comparaison une culture de contrôle positive. Les coccibacilles épais ou bacilles animés d'une mobilité extrêmement rapide ne sont pas des *L. monocytogenes*. Si la culture est présumée positive, appliquer l'épreuve suivante.

La mobilité peut être confirmée par ensemencement en piqûre de milieu SIM (5.4.3).

Incuber à 30 °C pendant quarante-huit heures et examiner la croissance autour de la piqûre. La croissance autour de la piqûre peut être faible ; si elle est négative, observer après cinq jours en laissant la culture à température ambiante (20 à 25 °C) (mobilité en parapluie).

INOCULATION DES BOÎTES DE CAMP. TEST



Les souches sont ensemencées en stries « en échelle » ; avec un espacement d'environ 1 cm entre les stries horizontales (*Listeria*) et d'environ 1 à 2 mm entre chaque strie horizontale et les deux stries verticales (*R. equi* et *S. aureus*).

A la suite d'un certain nombre d'essais et afin d'éviter des problèmes d'interprétation, il s'avère que certains résultats de l'épreuve de Camp mentionnés dans le tableau 3 du protocole FDA peuvent donner les réactions suivantes :

ESPÈCES	*S. AUREUS*	*RHODOCOCCUS EQUI*		XYLOSE	RHAM.
		FDA	LCHA		
L. monocytogenes	+	-	+	-	+
L. ivanovii	- (*)	+	+	+	-
L. innocua	-	-	-	-	v
L. welshimeri	-	-	-	+	v
L. seeligeri	+ faible	-	+ faible	+	-

(*) Pouvoir hémolytique positif mais non exalté.
- Sérogroupage. - Lysotypie.

Toutes les souches présentant un pouvoir hémolytique (*L. monocytogenes, L. ivanovii* et *L. seeligeri*) doivent être expédiées à :

Centre national de référence des *Listeria*, professeur Courtieu, Laboratoire de microbiologie et hygiène, U.F.R. de médecine, B.P. 1024 44035 NANTES CEDEX 01.

11. **Expression des résultats**

Mode de calcul (consulter la norme NF V 08-014 : 1984. - Directives générales pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus*. Méthode

ANNEXE

DIAGRAMME DU MODE OPÉRATOIRE

Prise d'essai + diluant
Homogénéisation

Etalement de 0,1 ml de S.M. à la surface de milieux sélectifs (si possible : Oxford + Mox ou Palcam + Mox) (1)

Incubation à 37 °C pendant 48 heures

Sélection de cinq colonies caractéristiques

Ensemencement sur TSYEA

Incubation à 37 °C pendant 24 heures

(ou davantage si nécessaire) Examens complémentaires

(1) La sélectivité ± grande des milieux (Palcam surtout) dépend de l'origine commerciale. Utiliser, de préférence, deux milieux de sélectivité différente compte tenu des flores compétitives.

ANNEXE XV :

Listeria-Tek ELISA.

LISTERIA-TEK

Dépistage qualitatif des Listeria par méthode ELISA*

Listeria est un petit bacille Gram positif mobile et non sporulé. Leur particularité est la production d'une catalase qui intervient dans la décomposition des aliments. Leur croissance peut se produire en présence ou en absence d'oxygène, elle n'est pas perturbée par des variations de température, y compris par la réfrigération. Ses possibilités multiples de croissance, couplées à sa pathogénicité, font de Listeria un germe fréquemment rencontré dans les aliments.

Les Listeria pathogènes ou non pathogènes sont retrouvés dans la nature, essentiellement dans la terre, la végétation et l'eau. L'infection par Listeria résulte de l'ingestion d'aliments ou d'eau contenant de nombreuses bactéries Listeria pathogènes. Les manifestations cliniques se traduisent par des affections comme la grippe, une méningite, une pneumonie, une septicémie ou une endocardite. Elles peuvent provoquer un avortement spontané ou une naissance prématurée.

Bien que la majorité des infections à Listeria soit retrouvée chez les nouveaux-nés, les femmes enceintes, les patients immunodéprimés et âgés, certains cas occasionnels ont été décrits chez des sujets apparemment sains.

Caractéristiques

- Rapide
  Résultats en 48 heures
- Sensible et spécifique
  Utilisation d'un mélange d'anticorps monoclonaux pour le Coating et le Conjugué
- Simple d'utilisation
  Méthode ELISA en un temps
  Réactifs prêts à l'emploi
- Sûre
  La technique ELISA ne nécessite aucune précaution particulière d'aseptie, seuls les échantillons subissent un traitement par chauffage au préalable.
- Economique
  - Date de péremption longue
  - Adaptation aux séries de dosage par 8 barettes sécables de 12 cupules chacune
  - Interprétation fiable et rapide permettant une réelle diminution du coût de fonctionnement par rapport aux méthodes manuelles.

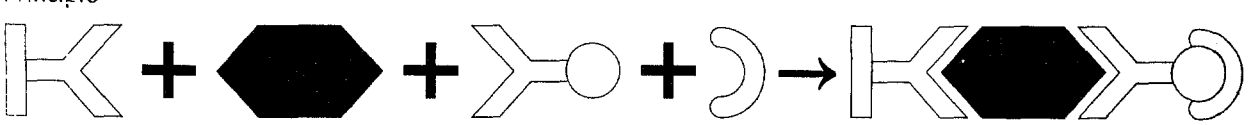
Principe du test

Des anticorps monoclonaux anti Listeria sont fixés au fond des cupules de polystyrène. Les antigènes présents dans l'échantillon à analyser forment un complexe immunologique avec les anticorps monoclonaux liés à la plaque micro ELISA. Le Conjugué composé d'un anticorps monoclonal marqué par une enzyme reconnaît, selon une réaction de type «sandwich» l'antigène du complexe immunologique formé précédemment. Après une étape de lavage, le substrat (TMB) est ajouté et réagit spécifiquement avec l'enzyme du Conjugué, en développant une coloration bleue, directement proportionnelle au taux d'antigène Listeria présent dans l'échantillon étudié.
La réaction colorée est stoppée par une solution d'acide fort et vire du bleu au jaune. L'absorption est déterminée en point final à 450 nm.

Présentation Référence : 52100

- Kit pour 96 déterminations
- Présence d'un contrôle positif et d'un contrôle négatif
- Réactifs prêts à l'emploi
- Stable, si conservé entre +2°C et +8°C, environ 12 mois après la date de fabrication. Se référer à la date limite d'utilisation indiquée sur chaque coffret.

Principle



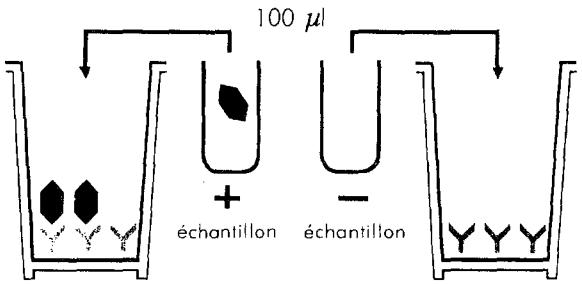
...i phase
...Listeria

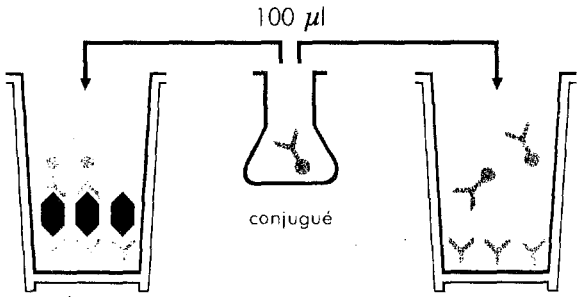
Listeria
in sample

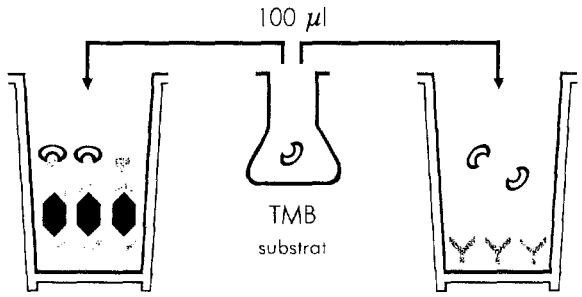
Anti Listeria/
Enzyme
conjugate

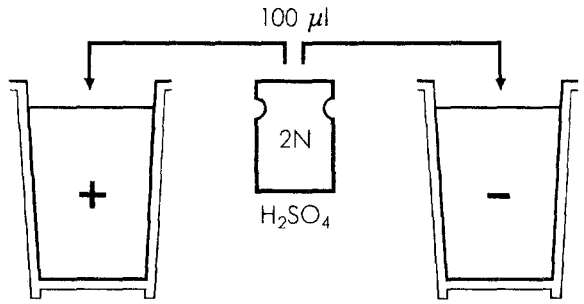
Chromogenic
substrate

Color









1. DISTRIBUTION

- Préparer les témoins (1).
- Distribuer 100 µl de témoins, d'échantillon(s) dans les cupules respectives selon la disposition suivante : témoin négatif, témoin positif, échantillon A, échantillon B, etc... témoin négatif.

2. CONJUGUE

- Préparer le conjugué (2).
- Distribuer 100 µl de conjugué dans chaque cupule.
- Incuber 60 minutes à 37°C.
- Préparer le substrat (3) et le tampon de lavage (4).
- Laver chaque cupule 6 fois avec le tampon de lavage.

3. SUBSTRAT

- Distribuer 100 µl de substrat TMB, dans chaque cupule.
- Incuber 30 minutes à température ambiante.

4. LECTURE

- Distribuer 100 µl d'acide sulfurique 2 N, dans chaque cupule, pour arrêter la réaction.
- Lire en point final, l'absorption de chaque cupule avec un spectrophotomètre Microelisa muni d'un filtre à 450 nm.

5. INTERPRETATION

- $\overline{N}$: absorption moyenne des témoins négatifs.

$$\overline{N} < 0{,}300$$

- **P** : absorption du témoin positif.

$$P > 0{,}700$$

- **S** : absorption de l'échantillon à tester.

- **Résultats qualitatifs**

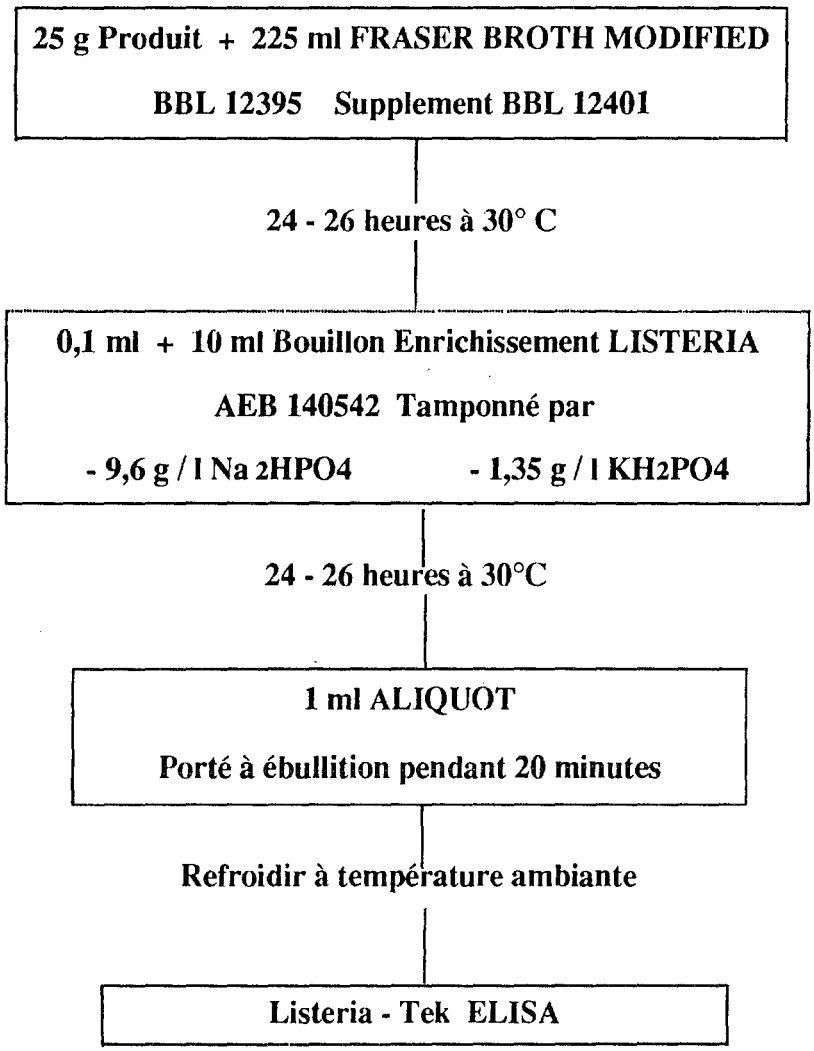
* **Listeria :** un échantillon est positif si :

$$S \geqslant \overline{N} + 0{,}150$$

6. CONFIRMATION

☞ $S \geqslant \overline{N} + 0{,}150$, l'échantillon est présumé contenir des Listeria. La confirmation et l'identification peuvent être réalisées en 4 heures avec le kit Micro ID Listeria.

PROTOCOLE D'ENRICHISSEMENT LISTERIA



CONTENU

1 portoir	Barrettes de Microelisa - huit par support, chacune contenant 12 puits avec des anticorps monoclonaux anti Listeria (Souris); contenu dans une boîte métallisée avec du gel de silicate aux propriétés deséchantes.
1 flacon	Témoin négatif - Antigène lyophilisé non réactif pour l'espèce Listeria. Il contient du sulfate de gentamicine comme conservateur.
1 flacon	Témoin positif - Antigène Listeria lyophilisé; réactif avec des anticorps anti -Listeria. Il contient du sulfate de gentamicine comme conservateur.
2 flacons	Diluant du conjugué - Sérum de souris et Tween-20 dans une solution saline de phosphate tamponnée; il contient du sulfate de gentamicine et de l' aldéhyde cinnamique comme conservateur et du FD&C rouge n° 2 comme agent colorant.
2 flacons (6 ml)	Conjugué (Souris) - Péroxydase lyophilisée conjuguée avec l'anticorps anti-Listeria.
1 flacon (1 ml)	Solution A de substrat TMB - 3, 3', 5, 5' - Tétraméthylbenzidine.
1 flacon (6 ml)	Solution B de substrat TMB - Péroxyde d'hydrogène.
1 flacon (10 ml)	Solution de lavage concentrée - 50X - 2,5 % de surfactant.
1 flacon (12 ml)	Solution d' arrêt - Acide sulfurique 2N.
10 feuilles	Bande adhésive.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE NECESSAIRE

* Aspirateur / système de lavage connecté à un système d'évacuation et à une pompe à vide.
* Lecteur de microplaques ou de barrettes. Longueur d'onde 450 nm.
* Incubateur à 30- 37°C.
* Pipette multicanaux, 50-200 µl.
* Pipette simple, 50-200 µl
* Embouts de micropipettes
* Milieux déshydratés pour la préparation des bouillons d'enrichissement.
* Plaque chauffante ou bain-marie d'eau bouillante.
* Tubes de culture bouchés vis .
* Récipients appropriés de stockage et d'enlèvement ou destruction de matériel potentiellement contaminé par des agents infectieux.
* Fiche d'enregistrement.

I. PREPARATION DES REACTIFS

Préparer avec attention les réactifs, avant de commencer la procédure d'essai. Les réactifs doivent être à température ambiante (20-25°C) avant de commencer le test et peuvent rester à cette température pendant le test.

Remettre les réactifs à 2-8°C après utilisation.

CONJUGUE

1. Reconstituer le conjugué en ajoutant le contenu d'un des diluants dans un flacon du conjugué lyophilisé. Mélanger doucement en inversant le flacon plusieurs fois.
2. La solution reste stable 30 jours à 4°C après reconstitution.

ANTIGENE DE CONTROLE

1. Reconstituer le témoin négatif en ajoutant 2 ml d'eau distillée stérile au flacon.
2. Reconstituer le témoin positif en ajoutant 1 ml d'eau distillée stérile au flacon.
3. Ajouter 60 jours à la date de préparation pour déterminer la date d'expiration . Les témoins inutilisés doivent être gardés à 2-8°C.

LE SUBSTRAT TMB

1. Calculer la quantité totale (ml) de substrat TMB nécessaire, en multipliant le nombre de puits utilisés par 0,12 ou utiliser la table de préparation du substrat.
2. Mélanger dans un tube et à volume égal les solutions A et B pour obtenir cette quantité.

AVERTISSEMENT

Préparer le substrat TMB juste avant de l'utiliser. Jeter ce qui n'est pas utilisé.

SOLUTION DE LAVAGE

Diluer au cinquantième la solution de lavage avec de l'eau distillée ou de l'eau déminéralisée (10 ml de solution de lavage concentrée dans 490 ml d'eau). Cette solution est stable pendant 60 jours à 2-8°C.

SOLUTION D'ARRET

Eviter le contact avec la peau. Si un contact se fait, laver la zone avec de l'eau.

TMB- TABLE DE PREPARATION DU SUBSTRAT

No of wells to be used	TMB solution A	TMB solution B	Total Volume TMB substrate
1	0.06	0.06	0.12
2	0.12	0.12	0.24
3	0.18	0.18	0.36
4	0.24	0.24	0.48
5	0.30	0.30	0.60
6	0.36	0.36	0.72
7	0.42	0.42	0.84
8	0.48	0.48	0.96
9	0.54	0.54	1.08
10	0.60	0.60	1.20
15	0.90	0.90	1.80
20	1.20	1.20	2.40
25	1.50	1.50	3.00
30	1.80	1.80	3.60
35	2.10	2.10	4.20
40	2.40	2.40	4.80
45	2.70	2.70	5.40
50	3.00	3.00	6.00
55	3.30	3.30	6.60
60	3.60	3.60	7.20
65	3.90	3.90	7.80
70	4.20	4.20	8.40
75	4.50	4.50	9.00
80	4.80	4.80	9.60
85	5.10	5.10	10.20
90	5.40	5.40	10.80
95	5.70	5.70	11.40
96	5.76	5.76	11.52

II. PROCEDURE DU TEST LISTERIA TEK

A. Préparer le portoir avec le nombre nécessaire de rangées de puits.
Prévoir un puits pour chaque échantillon et ajouter 3 puits pour les témoins.

B. Pipeter 100 µl d'échantillon et 100 µl des témoins et les introduire dans les puits correspondants.

Inclure deux témoins négatifs et un témoin positif par portoir de barettes dans l'ordre suivant :

- témoin négatif, témoin positif, échantillon 1, échantillon 2, échantillon 3... échantillon X, échantillon Y, échantillon Z, témoin négatif

C. Pipeter 100 µl de conjugué dans chaque puits contenant les échantillons ou les témoins.

REMARQUE

Il ne faut pas que l'extrémité de la pipette touche le contenu du puits.

D. Couvrir les rangées avec les bandes adhésives.
Mélanger le contenu des puits en agitant doucement la plaque. Incuber à 37 °C pendant une heu re.

E. Enlever les languettes adhésives des puits. Laver chaque puits six fois avec la solution de lavage.

F. Pipeter 100 µl de solution de substrat TMB fraîchement préparée dans chaque puits.
Incuber à température ambiante (20-25°C) pendant 30 minutes.

G. Pipeter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.
Les microplaques doivent être lues dans un délai de 10 à 15 minutes.

H. Faire le blanc du lecteur sur l'air et ensuite lire l'absorbance des solutions dans chaque puits à 450 nm.

I. Fermer bien hermétiquement et remettre tous les réactifs non utilisés à 2-8°C.

EXPRESSION DES RESULTATS

REMARQUE

Les calculs doivent être réalisés pour chaque test.

.Validation des valeurs témoins

Calculer la valeur moyenne (NCX) des deux témoins négatifs (NC). Cette valeur doit être inférieure à 0,300. La valeur du témoin positif (PC) doit être supérieure à 0,700 (cette valeur peut être hors échelle).

Tous les témoins doivent être compris dans les limites données ci dessus, dans le cas contraire le test doit être répété.

Les deux valeurs des témoins négatifs doivent être inférieures à 0,300.
Des valeurs supérieures ou égales à 0,300 indiqueront un défaut de manipulation lors du lavage.

. Seuil de positivité

NCX + 0,150

. Interprétation des résultats

Si l'absorbance de l'échantillon est supérieure ou égale à la valeur du seuil de positivité, on admet la présence de LISTERIA.

Le résultat peut être confirmé et l'espèce définie après culture à partir du milieu d'enrichissement secondaire.

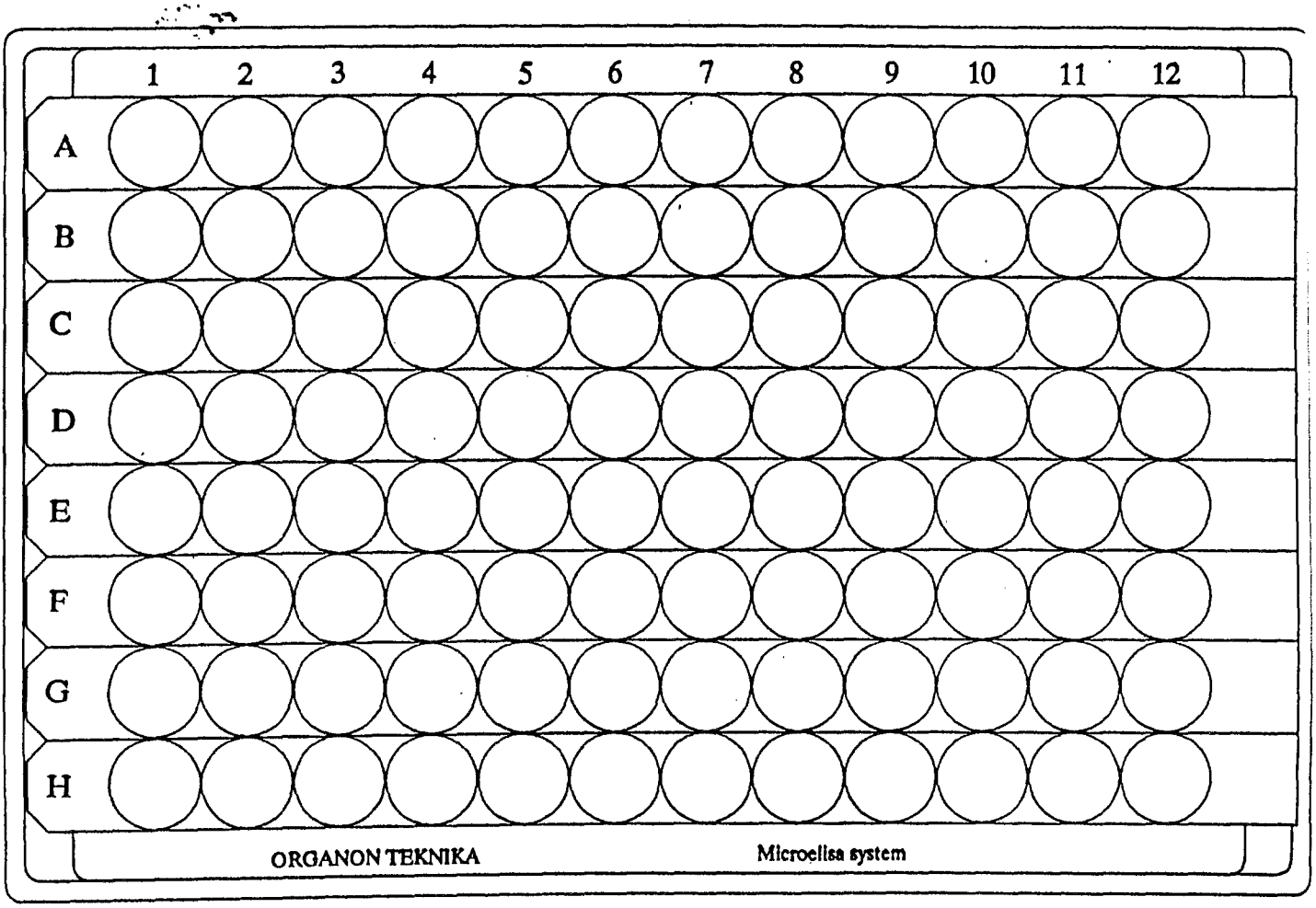
Continuer avec des identifications biochimiques et sérologiques après isolement des listéria, en utilisant les procédures standards ou les galeries Micro-ID Listéria.

Si le test ELISA est négatif (absorbance de l'échantillon inférieure à la valeur seuil de positivité), l'échantillon n'a pas un niveau détectable d'antigènes par cette méthode, et aucun autre test n'est nécessaire.

FICHE D'ENREGISTREMENT

Kit: Date d'expiration:

Effectuée par: Le:



ANNEXE XVI :

Listeria-Tecra ELISA.

Produits carnés

↓

Milieu UVM
(acriflavine à 12 mg/l)
24 h à 28°C - 30°C

↓

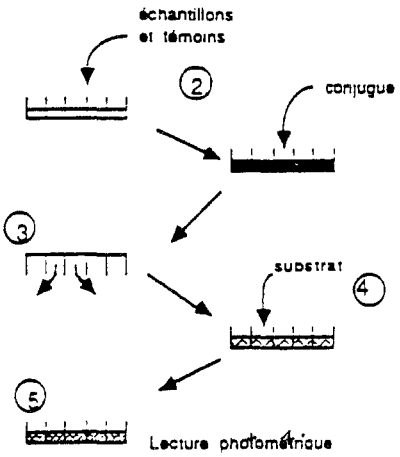
Dilution 1/100 ème
en Fraser
24 h à 28°C - 30°C

↓

Ajouter 50 µl de complément
à 1 ml de bouillon puis thermiser
15 min à 100°C

↓

TECRA ™ 2h

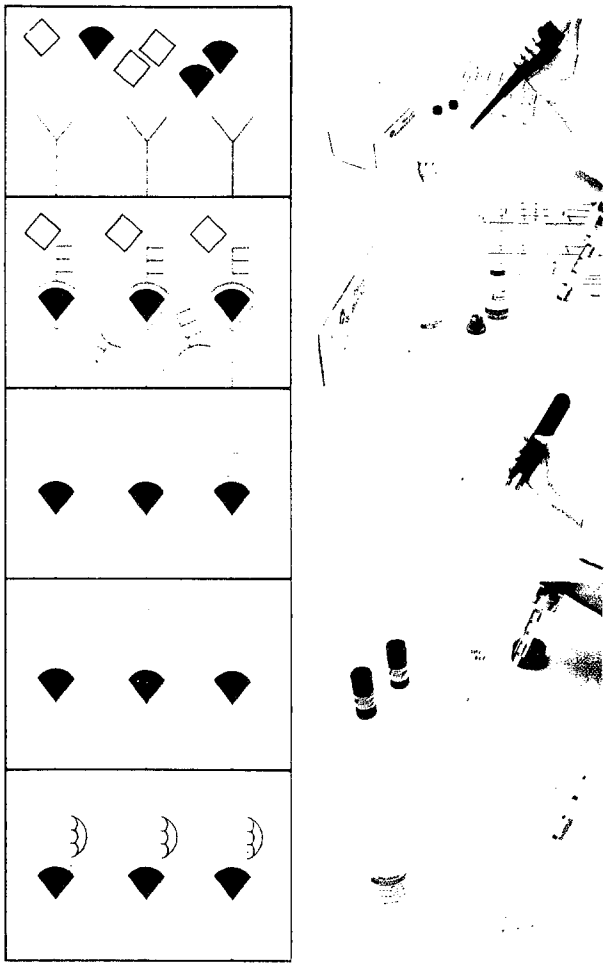


ANNEXE XVII :

TRANSIA.

Le test s'effectue sur une partie aliquote stérilisée (100 µl) du milieu liquide d'enrichissement pour Listeria inoculé 48 heures auparavant avec l'échantillon du produit à contrôler.

Principe d'une réaction positive



LEGENDE

- Anticorps monoclonal fixé sur les parois du puits.
- ♦ Antigènes de Listeria.
- ◇ Antigènes microbiens autres que Listeria.
- Anticorps monoclonal conjugué à la péroxydase.
- Substrat enzymatique.
- Substrat enzymatique coloré par la péroxydase.

1 - REPARTITION DE L'ECHANTILLON

Distribuer 100 µl d'échantillon enrichi dans un puits sensibilisé de la microplaque de réaction.

2 - REACTION IMMUNOLOGIQUE

Ajouter dans le puits correspondant 100 µl d'anticorps conjugués.
Laisser incuber 60 minutes à 37° C.

3 - LAVAGE

Laver les puits six fois de suite avec 200 µl de solution de lavage.

4 - REACTION ENZYMATIQUE

Ajouter 100 µl de substrat enzymatique dans le puits.
Laisser incuber 30 minutes à 20° C.

5 - ARRET DE LA REACTION

Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans le puits.

Le résultat est obtenu par lecture de la densité optique des puits à 450 nm, à l'aide d'un lecteur colorimétrique EIA de microplaques.

ANNEXE XVIII :

VIDAS Listeria (LIS).

VIDAS Listeria (LIS)

Diagnostic in Vitro

Test immunoenzymatique pour la détection des Listeria dans les produits alimentaires et l'environnement par technique ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)

PRINCIPE

VIDAS Listeria est un test automatisé sur le système VIDAS, permettant la détection après enrichissement des Listeria contaminant les aliments ou l'environnement Ce test associe une technique immunoenzymatique directe de type "sandwich" à une lecture en point final d'une fluorescence (ELFA).

Toutes les étapes de la réaction sont gérées par l'instrument. Le cône à usage unique sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Les autres réactifs sont répartis dans la cartouche.

REACTIFS

Conservation à 2 - 8°C. **Ne pas congeler les réactifs.**
La date d'expiration est indiquée sur le conditionnement.

Composition du coffret (60 tests) :

60 cartouches LIS	Prêtes à l'emploi
2 x 30 cônes LIS	Prêts à l'emploi. Cônes sensibilisés avec des anticorps (souris) spécifiques des antigènes de surface des Listeria. Ne sortir du sachet que le nombre de cônes nécessaire. Bien refermer le sachet après ouverture.
Contrôle positif LIS 1 x 6 ml (liquide)	Antigène purifié et inactivé de Listeria monocytogenes + azoture de sodium : 0,1 %. + stabilisant protéique
Contrôle négatif LIS 1 x 6 ml (liquide)	TRIS - NaCl -Tween 150 mmol/l + azoture de sodium : 0,1 %.
Calibrateur LIS 1 x 3 ml (liquide)	Antigène purifié et inactivé de Listeria monocytogenes + azoture de sodium : 0,1 %. + stabilisant protéique

Description de la cartouche

Puits	Réactifs
1	Puits échantillon
2	Tampon de prélavage (400µl) - TRIS NaCl Tween 150 mmol/l + azoture de sodium 0,1 %
3 - 4 - 5 - 7 - 8 - 9	Tampon de lavage (600µl) - TRIS NaCl Tween 150 mmol/l + azoture de sodium 0,1 %
6	Conjugué (400 µl : anti Listeria IgG (mouton) marqués à la phosphatase alcaline + azoture de sodium 0,1 %)
10	Cuvette de lecture (300 µl) Substrat : 4 méthyl-ombelliféryl phosphate + azoture de sodium 0,1 %

L'identification du test, le numéro de lot et la date d'expiration sont inscrits sur la cartouche et repris par le code barre.

MATERIEL NON FOURNI

Pipette à embout jetable permettant la distribution de 500 µl. Bain marie (100°C) ou système équivalent.

PRECAUTIONS D'UTILISATION

1. Ne pas mélanger les réactifs de lots différents.
2. Sortir les réactifs à la température du laboratoire avant emploi, **au moins 30 minutes** avant leur introduction dans le VIDAS.
3. S'assurer que le déshydratant contenu dans le sachet des cônes n'a pas changé de couleur (passage du bleu au rose).
4. Bien homogénéiser le calibrateur, les contrôles et les échantillons pour une meilleure reproductibilité des résultats.
5. Veiller à ne pas toucher la cuvette de lecture.

ECHANTILLONS

Les protocoles suivants sont recommandés pour la préparation des échantillons (après validation par le laboratoire, d'autres protocoles peuvent être utilisés si l'enrichissement final est incubé à 30 °C) :

1. **Produits laitiers.** Utiliser la procédure de la **FDA** (Food and Drug Administration) modifiée : ajouter aseptiquement 25 g (ou 25 ml) d'échantillon à 225 ml de bouillon LEB tamponné. Homogénéiser et incuber 22-24 heures à 30 °C. Après incubation, transférer 1 ml de la suspension dans 9 ml de bouillon FRASER et incuber à nouveau 22-24 heures à 30 °C (pour les produits laitiers non pasteurisés, le CNEVA/LCHA recommande d'ensemencer le bouillon FRASER avec 0,1 ml de bouillon LEB).

   Autres produits alimentaires. Ex : viandes crues, produits de la pêche, charcuterie...Utiliser le protocole de **l'USDA** : ajouter aseptiquement 25 g (ou 25 ml) d'échantillon à 225 ml de bouillon UVM1. Homogénéiser et incuber 22-24 heures à 30 °C. Après incubation, transférer 0,1 ml de suspension dans 10 ml de bouillon FRASER. Incuber 22-24 heures à 30 °C.

   Contrôle d'environnement (écouvillonnage). Placer l'écouvillon dans 10 ml de bouillon UVM1. Agiter puis incuber 40-48 heures à 30 °C. Dans le cas de l'utilisation d'une éponge pour les prélèvements de surface, placer celle-ci dans 100 ml de bouillon UVM1. Agiter puis incuber 40-48 heures à 30 °C.
2. Après incubation, prélever 1 ml du bouillon, le placer dans un tube et chauffer au bain-marie 15 minutes à 100°C.
3. Conserver le reste de la culture à 4°C pour confirmation en cas de résultat positif.

MODE OPERATOIRE

1. Taper sur le clavier les données correspondantes aux références des échantillons et au test **LIS** afin de créer "une liste de travail", selon le manuel d'utilisation VIDAS.
2. Déposer dans le 1er puits de la cartouche 500 µl d'échantillon, de calibrateur ou de contrôles. **Remarque** : A chaque réception d'un nouveau lot de réactif et tous les 14 jours, procéder à une calibration (voir manuel chapitre "Menu calibration") à l'aide du calibrateur testé en double.
3. Placer dans le VIDAS le cône et la cartouche dans les positions indiquées.
4. Suivre le protocole conformément aux instructions du manuel d'utilisation VIDAS. Les résultats sont obtenus en 45 minutes environ.

CONTROLE DE QUALITE

Vérifier périodiquement la validité des résultats à l'aide des contrôles.
Les valeurs attendues pour les contrôles sont données ci-dessous :

	Valeur de Fluorescence Relative (RFV)	Valeur du Test
Contrôle positif	1500 - 3500	0,5 - 1,2
Contrôle négatif	5 - 150	<0,1

RESULTATS

Dès le test terminé, les résultats sont analysés automatiquement et la valeur du test (rapport de la RFV obtenue pour l'échantillon et de celle obtenue ou mémorisée pour le calibrateur) est calculée par le VIDAS.

Seuil et interprétation des résultats

Valeur test	Interprétation
≤ 0,1	Négatif
>0,1	Positif

Un résultat positif doit être confirmé en suivant la procédure officielle à partir du bouillon d'enrichissement conservé au réfrigérateur.

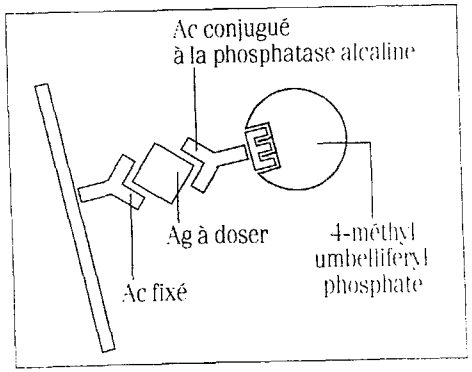
PERFORMANCES

Les six espèces de Listeria : monocytogenes, innocua, seeligeri, ivanovii, welshimeri et grayi sont détectées par le kit VIDAS Listeria.

L'utilisation d'anticorps spécifiques n'a pas permis de noter de réactions croisées avec d'autres espèces bactériennes.

PROTOCOLES D'ENRICHISSEMENT RECOMMANDES POUR LA DETECTION DES LISTERIA PAR LE SYSTEME VIDAS

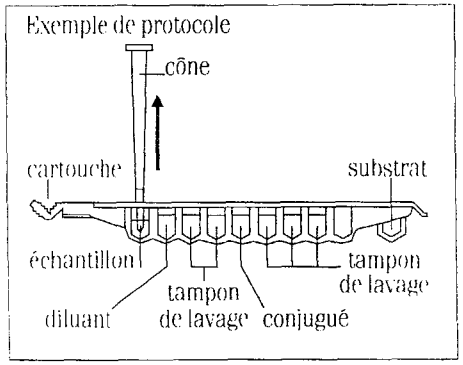
PRODUITS DE LA MER **PRODUITS LAITIERS NON PASTEURISES**	**PRODUITS LAITIERS** **PLATS PREPARES**	**PRELEVEMENTS D'ENVIRONNEMENT**	**PRODUITS CARNES CRUS ET TRANSFORMES** **VOLAILLE**
Milieu **LEB** 22 +/- 2 h à 30°C	Milieu **LEB** 22 +/- 2h à 30°C	Milieu **UVM1** 40 à 48 h à 30°C	Milieu **UVM1** 22 +/- 2 h à 30°C
0,1 ml LEB dans 10 ml **FRASER** 22 +/- 2 h à 30°C	1 ml LEB dans 10 ml **FRASER** 22 +/- 2 h à 30°C		0,1 ml d'UVM1 dans 10 ml DE **FRASER** 22+/-2 h à 30°C



CHAUFFAGE **15 MIN - 100 °C**

0.5 ML DANS LA BARRETTE VIDAS LIS

RESULTATS EN 45 MIN



ANNEXE XIX :

Listeria monocytogenes et produits alimentaires : "zéro tolérance ou moins de..."

Patrick DEHAUMONT
Direction générale de l'alimentation, sous-direction de l'Hygiène alimentaire (mai 1992)

La survenue de quelques foyers d'intoxications alimentaires mettant en cause *Listeria monocytogenes* durant la décennie 80, fortement amplifiée par les médias, a généré de façon tout à fait légitime l'inquiétude de nombreux consommateurs et a eu des conséquences importantes sur les flux commerciaux de différents produits alimentaires.

En effet, s'il est clair que la listériose humaine est une maladie dont l'incidence est très faible (0,2 à 7 cas/million d'habitants), sa létalité très élevée (17 à 33 %) justifie que des mesures de prévention rigoureuse soient mises en œuvre, afin de garantir la salubrité des aliments offerts au consommateur, même si le rôle de l'alimentation est rarement établi avec certitude lors de l'apparition de cas de listériose humaine.

Ce double enjeu sanitaire et économique a conduit les Services vétérinaires du ministère de l'Agriculture et de la Forêt à mettre en place, depuis plusieurs années, des protocoles de contrôle et de qualification des établissements fabriquant des produits sensibles d'une part, et des études permettant d'évaluer l'importance de la contamination de certains de nos aliments, d'autre part.

S'agissant du contrôle et de la qualification, il existe pour certains produits laitiers tels que les fromages à pâte molle par exemple, un protocole de qualification *Listeria.* Il s'agit, grâce à la réalisation d'analyses sur des échantillons prélevés chaque semaine, de s'assurer que l'entreprise maîtrise les procédés de fabrication et est ainsi à même d'offrir des produits ne présentant pas de risque pour le consommateur. Les prélèvements sont faits par l'entreprise et analysés par un laboratoire agréé. À côté de ces autocontrôles un contrôle officiel est réalisé chaque mois par les services vétérinaires départementaux. Lorsqu'un des contrôle est positif (présence de *Listeria,* quelle que soit la quantité, dans 25 grammes d'aliment), le lot est retiré de la consommation, la qualification *Listeria* de l'entreprise suspendue et l'agrément à l'exportation arrêté. La qualification *Listeria* et l'agrément à l'exportation ne sont rétablis que lorsque 3 contrôles officiels à moins de 15 jours d'intervalle et au moins 20 autocontrôles consécutifs sont négatifs pour la recherche de *Listeria.* Parallèlement, les actions correctives d'assainissement sont mises en place dans l'entreprise sous le contrôle de la D.S.V.

Ce dispositif permet aux services officiels de s'assurer de la salubrité des produits mis à la consommation sur le territoire national et de garantir vis-à-vis de nos partenaires étrangers la sécurité des produits exportés.

Les études sur les niveaux de contamination de nos aliments constituent, quant à elles, un élément fondamental pour une prise en compte raisonnée et raisonnable du risque *Listeria.* En effet, au-delà des risques sanitaires (qui sont réels), l'apparition de quelques accidents isolés a conduit les autorités sanitaires des différents pays à adopter des attitudes très disparates, liées le plus souvent à leur vocation de pays importateur ou exportateur. Pour certains d'entre eux, il est ainsi apparu beaucoup plus simple d'imposer le principe de « zéro tolérance » sans se préoccuper de la faisabilité de tels critères.

Ainsi, la plus grande hétérogénéité existe au niveau international :

- U.S.A. ..... Zéro tolérance ;
- Canada ..... Tolérance relative ;
- Pays scandinaves ..... Zéro tolérance irréaliste et importance de l'autocontrôle ;
- Allemagne ..... Tolérance, avec définition de critères pour différentes catégories de produits.

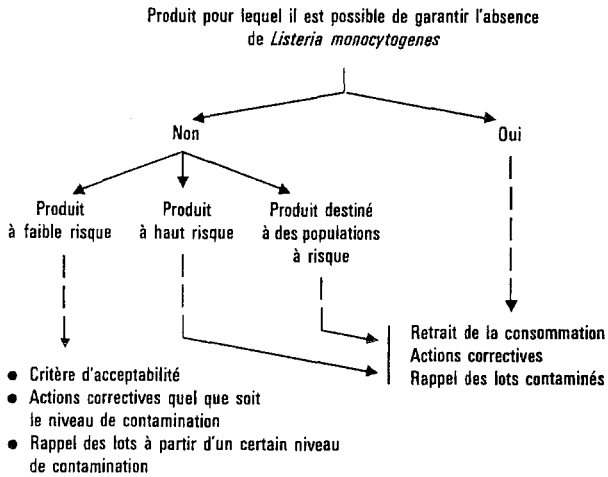
À l'évidence, la question est d'une grande complexité et la solution ne sera sûrement pas manichéenne.

Cette solution, fondée sur des bases scientifiques solides, doit considérer que, compte tenu de sa présence dans l'environnement, il est techniquement impossible de garantir l'absence totale de *Listeria monocytogenes* dans les aliments (à moins de leur faire subir un traitement listéricide après conditionnement ou avant conditionnement aseptique). Ce point de vue a d'ailleurs été énoncé par l'Organisation mondiale de la Santé en 1988.

Toutefois, l'enjeu sanitaire majeur justifie pleinement que tout soit mis en œuvre pour que le niveau de contamination des aliments soit le plus bas possible. À cette fin, les professionnels de l'agro-alimentaire, outre le strict respect des dispositions réglementaires, doivent mettre tout en œuvre pour limiter la contamination par *Listeria monocytogenes* et éviter sa multiplication (utilisation de systèmes d'analyse et de maîtrise des risques ou de guides de bonnes pratiques, par exemple).

Mais attention, dire que le niveau de contamination doit être le plus bas possible ne signifie pas « zéro tolérance ». Il s'agit, au contraire, en fonction du niveau de risque d'un produit donné (possibilité de contamination et aptitude de ce produit à assurer la multiplication du germe) d'envisager des niveaux de tolérance permettant une action graduée.

Ce mode de raisonnement peut être résumé selon le logigramme suivant :



Une telle démarche est à l'étude au sein de la sous-direction de l'Hygiène alimentaire qui définira prochainement des lignes directrices, s'inspirant de ce logigramme à l'intention de ses agents chargés des contrôles officiels. Mais il s'agira bien de lignes directrices, envisageant l'établissement de tolérances et, en aucun cas, de critères réglementaires. En effet, les critères en tant que tels n'ont que peu d'intérêt. Ils apportent, par contre, des informations fondamentales sur le niveau de régularité de la maîtrise des procédés dans l'entreprise.

Dans cette perspective, des lignes directrices seront d'un usage beaucoup plus sûr en permettant aux services officiels d'appréhender le risque sanitaire, entreprise par entreprise, le mode d'évaluation devant nécessairement évoluer quant à lui au même rythme que les connaissances épidémiologiques et scientifiques.

ANNEXE XX :

Réglementation.

CONSEIL SUPERIEUR D'HYGIENE PUBLIQUE DE FRANCE

SECTION ALIMENTATION

Séance du 8 septembre 1992

AVIS RELATIF A *LISTERIA MONOCYTOGENES* ET ALIMENTATION

* Considérant que :

. Diverses enquêtes épidémiologiques ont montré que la listériose humaine connaît en général une origine alimentaire.

. *Listeria monocytogenes* est un germe ubiquiste, largement répandu dans l'environnement naturel (sol, eaux, végétation naturelle, prairies et cultures) et qu'il existe un portage asymptomatique chez l'homme et l'animal.

Il est, de ce fait, à l'heure actuelle, techniquement impossible de garantir l'absence totale de *Listeria monocytogenes* dans les denrées animales ou végétales brutes ainsi que dans les produits manipulés ou transformés, à l'exception des produits alimentaires ayant subi un traitement d'assainissement dans leur conditionnement définitif ou conditionnés aseptiquement après traitement.

. Des règles d'hygiène appropriées et scrupuleusement appliquées tout au long de la chaîne alimentaire permettent néanmoins d'éviter, ou de réduire à un très faible niveau, la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments.

* Considérant par ailleurs que :

. Il résulte de l'observation mentionnée dans le 2ème considérant des contacts fréquents de la population humaine avec le germe.

. La listériose humaine évolue essentiellement sous forme de cas sporadiques parfois amplifiés de petites bouffées épidémiques voire de véritables épidémies. L'incidence de la maladie est faible (évaluée à 10 à 15 cas par million d'habitants en France par an) mais le taux de létalité est élevé (20 à 30 %).

* Considérant enfin que :

. Les données épidémiologiques montrent que certaines catégories de consommateurs sont particulièrement sensibles : il s'agit en particulier des femmes enceintes, des nouveaux-nés, des personnes âgées, des personnes immunodéprimées (transplantations d'organes, cancers, sida), des personnes atteintes d'affections intercurrentes (diabète, maladies hépatiques chroniques, maladies vasculaires et collagénoses, défaut d'acidité gastrique).

* La Section Alimentation du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France est d'avis que :

. Des mesures de prévention rigoureuses doivent exister à tous les stades de chaque filière agro-alimentaire afin de réduire l'incidence de la listériose humaine et de tendre pour l'ensemble des denrées alimentaires vers une absence de *Listeria monocytogenes*.

A ce titre, chaque opérateur de la chaîne alimentaire, à chaque stade depuis la culture ou l'élevage, la collecte ou l'abattage, la transformation, l'entreposage, le transport, la restauration, la distribution, jusqu'à l'utilisation domestique des aliments par le consommateur final, doit prendre toutes mesures appropriées, cohérentes avec la nature des produits alimentaires concernés, pour éviter la contamination des aliments par *Listeria monocytogenes*, en prévenir la multiplication, voire en assurer la destruction.

. Dans ce but, outre les dispositions que doivent prendre les consommateurs, chaque opérateur doit respecter scrupuleusement les exigences réglementaires en vigueur relatives à la sécurité alimentaire et pour ce qui le concerne en propre ainsi que de façon concertée avec les autres partenaires de la filière, identifier les procédés essentiels à la sécurité des produits et assurer la détermination, la mise en oeuvre, le suivi et la vérification des procédures de sécurité appropriées (système HACCP ou tout système équivalent). Des guides de bonnes pratiques hygiéniques devraient être conçus pour faciliter cette démarche dans chacun des secteurs concernés.

. Lorsque les possibilités actuelles reconnues et utilisables d'intervention technique sur les produits et leur environnement permettent d'aboutir à l'absence de *Listeria monocytogenes*, il y a lieu de retirer de la consommation humaine en l'état les produits qui se révèleraient contaminés. Entrent dans cette catégorie les aliments spécialement destinés à la consommation de populations à risque (aliments pour nourrissons ou certains aliments spéciaux à usage médical par exemple), ainsi que les aliments ayant fait l'objet d'un traitement assainissant dans leur conditionnement définitif ou conditionnés aseptiquement après traitement. Cette attitude devrait également concerner les aliments ayant subi un traitement d'assainissement et susceptibles d'être recontaminés après traitement.

Pour les autres produits où la contamination ne peut être, à l'heure actuelle, évitée et pour lesquels il n'est pas possible de garantir totalement l'absence de *Listeria monocytogenes*, il y a lieu d'interpréter la découverte de *Listeria monocytogenes* à partir de l'ensemble des données épidémiologiques, scientifiques, techniques, qui s'y réfèrent. Il y a lieu également de graduer les mesures prises à l'égard des produits en fonction notamment de leur nature, du stade de prélèvement, de leur mode d'utilisation et de leur implication dans des accidents liés à leur consommation, du taux rencontré de *Listeria monocytogenes* et de leurs possibilités de développement dans les produits concernés, des conditions générales d'hygiène de leur environnement. Pour ces produits, en tenant compte du fait que les données publiées dans la littérature scientifique montrent que dans la très grande majorité des cas, il n'a pas été constaté de listériose humaine liée à la consommation d'aliments renfermant moins de 100 *Listeria monocytogenes*/g, on considérera cette valeur comme le seuil maximum admissible au stade de la consommation ; lorsque des contaminations seront mises en évidence, des mesures correctives pouvant aller jusqu'au retrait de la consommation en l'état des produits contaminés seront immédiatement mises en place.

L'application de cette tolérance doit être accompagnée par l'observation permanente de ses conséquences sur l'évolution de l'incidence de la listériose humaine afin de réviser le principe ou les modalités d'application si nécessaire.

Dans tous les cas, il y a lieu de rappeler que l'existence de cette tolérance ne doit en aucun cas entraîner une diminution de la vigilance de chacun des opérateurs concernés et que cette tolérance ne saurait, en aucune façon, libérer les opérateurs concernés de l'application des dispositions juridiques relatives à l'obligation générale de sécurité et à la responsabilité du fait des produits défectueux.

Par ailleurs, il est souligné que l'information des catégories de consommateurs à risque est indispensable et qu'elle doit être effectuée systématiquement, par l'intermédiaire des professions de santé à l'usage desquelles des informations adaptées doivent être élaborées et diffusées.

LIGNES DIRECTRICES PROVISOIRES RELATIVES A LA CONDUITE A TENIR VIS A VIS DE PRODUITS LAITIERS DANS LESQUELS LISTERIA MONOCYTOGENES A ETE ISOLEE.

A-PRODUITS PASTEURISES :

1) *Au stade de la fabrication* :

Le critère d'acceptation de ces produits pour lesquels la matière première a subi un traitement assainissant est actuellement "indécelable dans 25 g". En conséquence les lots de produits qui se révèlent contaminés doivent être saisis (et éventuellement après saisie destinés à une utilisation particulière telle que fonte, poudre de lait, sous couvert d'un laissez-passer sanitaire).

2) *Au stade de la distribution* :

Le critère d'acceptation de ces produits est fixé à titre transitoire à 10^2 (plan à 2 classes, n=5)

B-PRODUITS AU LAIT CRU :

En l'absence de tout traitement assainissant, la qualité sanitaire de ces produits est étroitement liée à la qualité de la matière première utilisée et à l'importance des contaminations tout au long du process.

Les différentes enquêtes réalisées jusqu'à ce jour (plan de surveillance, enquêtes spécifiques dans le cadre de l'épidémie) montrent clairement que certaines fabrications peuvent être contaminées avec une fréquence non négligeable.

Toutefois, ces contaminations qui s'expliquant par les raisons évoquées ci-dessus, sont dans la majorité des cas peu élevées, et en tout état de cause largement inférieures à la contamination nécessaire pour occasionner une listériose chez un individu en bon état de santé.

En conséquence, et compte tenu des informations déjà largement diffusées auprès des personnes à risque par les autorités sanitaires, il a été décidé dans le contexte actuel de l'épidémie d'appliquer les lignes directrices suivantes pour les produits au lait cru, qui pourront utilement vous guider dans vos décisions :

1) *Au stade de la fabrication* :

Critères : " indécelable dans 25 g"
Pour les produits très sensibles (type St Nectaire, Reblochon, Minster, Vacherin, Brie... etc) et à titre transitoire, le critère "distribution" sera applicable sur les produits contrôlés en fin d'affinage.

2) *Au stade de la distribution* :

Critères : $n = 5$; $C = 1$

$m = 10^2$; $M = 10^3$

REMARQUE IMPORTANTE : lors de l'interprétation des résultats d'analyses, il conviendra de prendre en compte les erreurs liées à l'incertitude de l'analyse et du mode de calcul de la numération.

PROCEDURE DE QUALIFICATION - LISTERIA

I - CHAMP D'APPLICATION

Pour l'application de cette note de service, on considérera deux catégories distinctes de fromages.

A) - Fromages appartenant aux types de fabrication suivants :

Produits fabriqués et commercialisés sur le marché national ou international quelle que soit l'origine du lait (vache, chèvre, brebis ou mélange).

1°) Fromages soumis à la procédure générale de qualification :

- Fromage à pâte molle : toutes catégories.
- Fromage à pâte persillée, à affinage inférieur à 4 semaines.

2°) - Fromages soumis à la procédure spécifique :

- Fromage à pâte persillée à affinage supérieur à quatre semaines exemple :
  - Bleu d'Auvergne,
  - Bleu des Causses,
  - Bleu de Gex ou du Haut Jura ou Bleu de Septmo
  - Fourmes d'Ambert et de Montbrison,
  - Roquefort.

- Fromage à pâte pressée demi cuite ou non cuite à affinage de surface.

  Fromages subissant de fréquentes manipulations au cours de l'affinage (lavage - frottage). On incluera dans cette catégorie tous les fromages de type "Tomme". (à exclure : Cantal; Salers et Laguiole).

B) - Fromages exportés autres que ceux du paragraphe A dont :

- Fromage à pâte fraîche
- Fromage à pâte cuite
- Fromage à pressée demi-cuite ou non cuite subissant peu ou pas de manipulations pendant l'affinage ("grattage" en fin d'affinage admis pour parfaire la présentation, fromages à croûte plastifée et fromage de type Cantal, Salers et Laguiole).

La procédure de qualification - de ces établissements est identique à la procédure de qualification prévue pour les fromages soumis à la procédure spécifique (cf. II 2.2.2).

N.B : Les fromages fondus sont exclus du champ d'application de la présente note de service.

II - QUALIFICATION "LISTERIA" DES ETABLISSEMENTS

Pour être titulaire d'une qualification "Listeria" les établissements doivent obligatoirement remplir les conditions suivantes :

2-1. Dispositions générales:

- Respect des dispositions de l'Arrêté du 15 mai 1974 relatif aux conditions d'hygiène dans les établissements de collecte et de transformation des produits laitiers.

- Mise en place des procédures d'autocontrôles et de contrôles officiels

par le fabricant selon les procédures décrites dans les paragraphes II et III.

- Conformité des résultats d'analyses officielles et des résultats d'autocontrôles

Les fromages doivent satisfaire au critère microbiologique suivant :

Listeria Monocytogenes : absence dans 25 grammes.

Pour une lecture à 7 jours après le début de l'analyse.

N.B.: Indépendamment, de la procédure de qualification "Listeria", les établissements exportateurs de fromages doivent également répondre aux dispositions, autres que celles relatives à la Listeria, et être agréés selon les procédures prévues par :

- l'Arrêté du 18 juin 1984 et des instructions prises en application en ce qui concerne les fromages à pâte molle.
  - Note de Service N° 8.056 du 27 Mars 1986
  - Lettre Circulaire N° 4.267 du 7 Octobre 1986
  - Lettre Circulaire N° 4.442 du 11 Septembre 1987

- l'Arrêté du 22 janvier 1987 et des textes pris en application en ce qui concerne les autres catégories de fromages.
  - Note de Service N° 8.076 du 9 Juin 1987

2.2 - Prélèvements

Deux types de procédure de prélèvements pour la qualification "Listeria" sont à distinguer :

2.2.1 - Procédure "générale"

Sont concernés :
- Fromages à pâte molle,
- Fromage à pâte persillée à affinage inférieur à quatre semaines.

Les prélèvements sont effectués au moment du conditionnement (en moyenne 12 jours après l'emprésurage pour les produits élaborés au lait de vache, mais varie entre 5 et 15 jours pour les produits au lait de chèvre) pour tenir compte de toutes les possibilités de contamination des produits et notamment pour les fromages à "croûtes lavées".

Procéder au prélèvement de trois séries de dix fromages réalisées à 15 jours d'intervalle, fabriqués le même jour, pour chaque technologie et pour chaque chaîne de fabrication :

Pour chaque série :

- 5 fromages seront analysés dans les délais les plus rapides ;
- 5 fromages seront conservés à + 4°C dans l'établissement pour être analysés au bout de 4 semaines (la multiplication de Listeria monocytogenes à + 4°C étant plus marquée que celle des autres bactéries).

Lorsqu'il s'agit de fromages d'un poids unitaire élevé (plus d'un Kg) des portions d'au moins 500 g pourront être prélevées au lieu de fromages entiers. Dans ce cas on pourra conserver les parties de fromages restantes pour l'anayse 4 semaines plus tard.

Les prélèvements seront transportés sous régime du froid (mais non congelés) à une température n'excédant pas + 6°C.

3.1.2 - Fromage à durée d'affinage inférieure à 4 semaines.

On réalise sur un même lot, deux prélèvement de 5 fromages (ou portions de fromage).

- 5 fromages seront analysés à J + 5 (J + 4, J + 7)
- 5 fromages seront analysés à J + 12 (J + 10 à J + 14)

Toutefois, si l'entreprise conserve la maîtrise de ses produits jusqu'à la lecture de l'analyse, une seule analyse à J + 12 (J + 10 à J + 14) est possible.

3.1.3 - Fromage à durée d'affinage supérieure ou égale à 4 semaines.

On effectuera le jour du conditionnement, le prélèvement d'une série de 5 fromages d'un même lot, ce prélèvement ne pourra pas être effectué au-delà de J' - 15 afin que le résultat de l'analyse concernant le lot prélevé parvienne à l'usine avant son expédition.

3.2 - Autocontrôles

Les autocontrôles seront effectués sous la responsabilité des chefs d'établissement. Il seront numérotés et portés dans l'ordre, sans omission, sur un registre dont les pages auront été prénumérotées. Ils seront effectués suivant la même méthode d'analyse que celle utilisée pour la qualification "Listeria" et décrite dans l'annexe I.

REMARQUE : la liste des laboratoires des Services Vétérinaires effectuant des analyses pour les contrôles officiels en ce qui concerne la recherche de Listeria monocytogenes en annexe II est en cours de modification.

3.2.1 - Autocontrôles procédure générale

Sont concernés les établissements qualifiés selon la procédure générale pour les catégories de fromages suivants :

- Fromage à pâte molle
- Fromage à pâte persillée à affinage inférieur à quatre semaines.

- Pout toute chaîne de fabrication :

1ère Période :Chaque jour, prélèvement de cinq fromages répartis sur un même lot de fabrication (par chaîne de production et par type de fromage). Réalisation d'une analyse par jour sur l'échantillon composé depuis les cinq fromages.

2ème Période : Après 20 résultats négatifs consécutifs (20 jours ouvrables), la fréquence d'échantillonnage sera réduite à trois analyses par semaines (par chaîne de production et par type de fromage). Chaque analyse sera réalisée sur l'échantillon composé depuis les cinq fromages prélevés sur un même lot.

3ème Période : Après 24 résultats négatifs consécutifs '40 jours ouvrables), la fréquence d'échantillonnage sera réduite à une analyse par semaine (par chaîne de production et par type de fromage) pratiquée sur l'échantillon composé depuis les cinq fromages prélevés sur un même lot.

Par la suite, les autocontrôles de routine s'établissent selon les modalités définies dans la 3ème période : soit 1 analyse par semaine.

REMARQUE : Les protocoles de prélèvements décrits ci-dessus concernent uniquement les nouveaux agréments. Les établissements déjà agréés passent directement à une analyse par semaine sur l'échantillon composé depuis les 5 fromages prélevés sur un même lot.

2.2.2 - Procédure "spécifique"

Sont concernés :
- Fromage à pâte persillée à affinage supérieur à quatre semaines,
- Fromages à pâte pressée demi-cuite ou non cuite à affinage de surface,
- Tous les fromages exportés non concernés par la procédure générale ou n'appartenant pas aux catégories énoncées ci-dessus (sauf les fromages fondus).

On procèdera à 3 séries consécutives de prélèvements de 5 fromages fabriqués le même jour (pour chaque technologie et chaque chaîne de fabrication), réalisées à environ 15 jours d'intervalle, au moment du conditionnement. L'analyse sera réalisée dans les meilleurs délais sur un échantillon composé à partir des 5 fromages prélevés.

2.3 - Méthode d'analyse

Voir annexe II (note de service n°8041 du 16 mars 1987) et annexe II de la présente note.

2.4 - Notification de qualification "Listeria"

La qualification "Listeria" est accordée par l'Administration Centrale Bureau : Lait, Produits Laitiers sur avis motivé de Monsieur le Directeur Des Services Vétérinaires établi sur la base des points de conformité suivants :

1°) - Conformité à l'Arrêté du 15 Mai 1974.

2°) - Conformité des autocontrôles (suivi et résultats).

3°) - Conformité des analyses officielles effectuées dans le cadre de l'obtention de la qualification "Listeria"

Chaque qualification "Listeria", sera notifié par la Direction Générale de l'Alimentation, sous couvert de Monsieur le Directeur des Services Vétérinaires.

Les établissements déjà titulaires d'un agrément à l'exportation délivré sur la base des procédures définies dans la note de service 8041 du 16 mars 1987 relative à la recherche de Listeria monocytogenes : agrément à l'exportation sont dispensés du renouvellement de cet agrément sous réserve que les résultats d'analyses tant en contrôles officiels qu'en autocontrôles, se soient révélés conformes depuis le ler août 1987.

III - Contrôle de la qualification "Listeria"

La qualification "Listeria" une fois accordée, le contrôle de cette qualification selon de nouvelles modalités de prélèvements s'effectuera sous forme d'autocontrôles d'une part et de contrôles officiels d'autre part.

3.1 - Modalités de prélèvement

3.1.1 - Définitions

. On appellera : J : le jour d'emprésurage.
: J': date d'expédition.

. Notion de lot :

Les nouvelles dispositions conduiront,en cas d'analyse révèlant la présence d'une Listeria monocytogenes, à la saisie du lot incriminé. En conséquence il convient, que chaque fromage soit identifié comme appartenant à un lot.

Le rythme des autocontrôles sera défini en fonction de la capacité de production de l'établissement.

La taille d'un lot est laissée à l'appréciation de chaque fabricant, cependant, celle-ci ne peut excéder la fabrication d'une journée.

3.2.2 - Autocontrôles Procédure spécifique

Sont concernés les Fromages selon la procédure spécifique

- Fromage à pâte persillée à affinage supérieur à quatre semaines,
- Fromage à pâte pressée demi-cuite ou non cuite à affinage de surface.

1ère Période : Echantillonnage pendant deux mois à raison d'une fois par semaine de cinq fromages (par chaîne de fabrication et type de fromage). Chaque analyse est réalisée sur l'échantillon composé à partir de cinq fromages prélevés sur un un même lot.

2ème Période : Après douze résultats négatifs consécutifs (sur une période de trois mois) la fréquence d'échantillonnage sera réduite à une analyse par mois (par chaîne de fabrication et type de fromage) pratiquée sur l'échantillon à partir de cinq fromages prélevés sur un même lot.

Les autocontrôles de routine sont ensuite effectués 1 fois par mois selon les modalités prévues au cours de la 2ème période.

3.2.3 - Autocontrôles des produits exportés visés au paragraphe 1 B.

Une analyse par mois sera effectuée sur un échantillonnage réalisé à partir de cinq fromages prélevés le même jour sur un lot défini par chaîne de fabrication et type de fromage.

3.3 - Contrôles officiels

A ces occasions, les registres d'autocontrôles des entreprises seront consultés afin de vérifier leur bonne réalisation.

Les analyses seront réalisées dans un laboratoire choisi par le Directeur des Services Vétérinaires, sur la liste figurant en annexe III de la note de service N°8041 du 16 août 1987. Une liste révisée sera publiée ultérieurement.

Ils seront analysés suivant la méthode décrite en annexe II.

Pour les fromages au lait pasteurisé, l'activité phosphatasique doit être négative et sera vérifiée systématiquement sur au moins l'un des fromages prélevés (sauf pour les fromages à pâte persillée).

Dans un souci de cohérence les analyses bactériologiques prévues dans le cadre de la Note de Service du 27 Mars 1986, de la Lettre Circulaire du 7 Octobre 1986 et de la Lettre Circulaire N° 4.442 du 11 Septembre 1987, seront réalisées à partir des prélèvements effectués pour la recherche de Listeria.

3.3.1 - Contrôle officiels de routine des produits visés au paragraphe I A.

Les contrôles seront effectués une fois par mois, sur des fromages prélevés conformément aux dispositions du paragraphe III - 3.1.

3.3.2 - Contrôle officiel de routine des produits visés au paragraphe II B.

Les contrôles seront effectués une fois tous les deux mois sur des fromages prélevés conformément aux dispositions du paragraphe III - 3.1.3.

3.4 - Sanctions découlant des mesures de contrôle :

Les résultats des contrôles officiels seront transmis, au fur et à mesure de leur obtention, aux usines intéressées. L'ensemble des résultats obtenus sera adressé à l'Administration Centrale sous forme de récapitulatif dont les modéles vous seront adressés ultérieurement.

N.B. : Pour les établissements agréés à l'exportation, les résultats concernant la recherche des germes autres que la Listeria devront être également portés à la connaissance des intéressés.

3.4.1 - Résultats non conformes

a) - Procédure administrative :

L'obtention d'un résultat non conforme à un contrôle officiel (présence de Listeria monocytogenes) sera immédiatement signalée par téléphone au Bureau Lait, Produits Laitiers à la Direction Générale de l'Alimentation.

De plus, le Bureau Lait et Produits Laitiers notifiera immédiatement la suspension de la qualification "Listeria" de la ligne de fabrication, ainsi que son agrément à l'exportation si l'établissement est agréé. Un contrôle, lot par lot de toutes les fabrications, sera alors mis en place par l'établissement producteur.

b) - Conduite à tenir vis-à-vis des produits :

Qu'il s'agisse d'autocontrôles ou de contrôles officiels, la procédure suivante devra être appliquée au lot incriminé :

- pour un résultat obtenu avant le départ usine : le lot ne sera pas mis en commercialisation ;
- pour un résultat obtenu après le départ usine : le fabricant mettra tout en oeuvre pour tenter de retirer le lot du commerce lequel sera saisi.

3.4.2 - Requalification

La requalification sera accordée aprés :

- 3 séries de contrôles officiels conformes effectués à 15 jours d'intervalle, la première série étant diligentée dans les meilleurs délais après la suspension de la qualification.

- une série d'au moins 20 autocontrôles consécutifs négatifs réalisés sur les produits finis, du groupe I A1, ou une série d'au moins 12 autocontrôles consécutifs négatifs réalisés sur les produits finis du groupe I A2.

- dans l'un et l'autre cas, les autocontrôles se poursuivront ensuite selon le rythme prévu à la troisième période pour les fromages relevant de la procédure générale (cf.parag. 3.2.1) et selon le rythme prévu à la deuxième période pour les fromages relevant de la procédure spécifique (cf.parag. 3.2.2).

- par ailleurs, les entreprises devront :

. renforcer les procédures qui consistent à nettoyer et désinfecter tout le matériel entrant en contact avec le lait et les produits laitiers ;

. et s'attacher à rechercher, aux différents stade de la fabrication - et notamment aux points critiques, au moyen d'analyses, l'origine de la contamination - et mettre en place des dispositifs propres à la faire disparaître.

IV - ETIQUETAGE

Les fromages, quelle que soit leur destination, doivent être, à tous les stades de la commercialisation, facilement identifiables, quant à l'établissement d'origine et au lot de fabrication, selon les dispositions énoncées ci-aprés.

4.1 - Identification de l'établissement de fabrication :

Le numéro de code de l'établissement tel qu'il figure dans la liste des usines agréés pour l'exportation vers tous les pays (soit numéro minéralogique du département d'origine suivi d'une ou deux lettres, soit numéro d'agrément = code officiel géographique de la commune accompagné éventuellement d'une lettre d'ordre qui remplacera à terme le précédent) devra figurer en clair sur :

- les caisses (carton ou bois) d'expédition
- les emballages unitaires de chaque fromage (soit sur l'étiquette),
- soit sur la boîte elle-même, en carton ou bois).
- sur le papier d'emballage du fromage (perforations).

Pour les fromages préemballés, le code d'identification reste celui imposé par la réglementation.

Cependant, pour les produits à marques de distributeur uniquement, rien ne s'oppose à ce que le producteur ajoute au code d'usine réglementairement défini un code supplémentaire à usage commercial (de 01 à 99) lui permettant de personnaliser ses expéditions par importateur, sur l'emballage unitaire de chaque fromage (étiquette ou boîte). Ce code ne devra apparaître ni sur les caisses d'expédition, ni sur le papier d'emballage du fromage.

N.B. : dans le cas des fromages de grande taille destinés à être découpés, il est recommandé de faire figurer sur la "collerette" le numéro de code de l'établissement de fabrication autant de fois que de parts prévues.

4.2 - Identification du lot de fabrication :

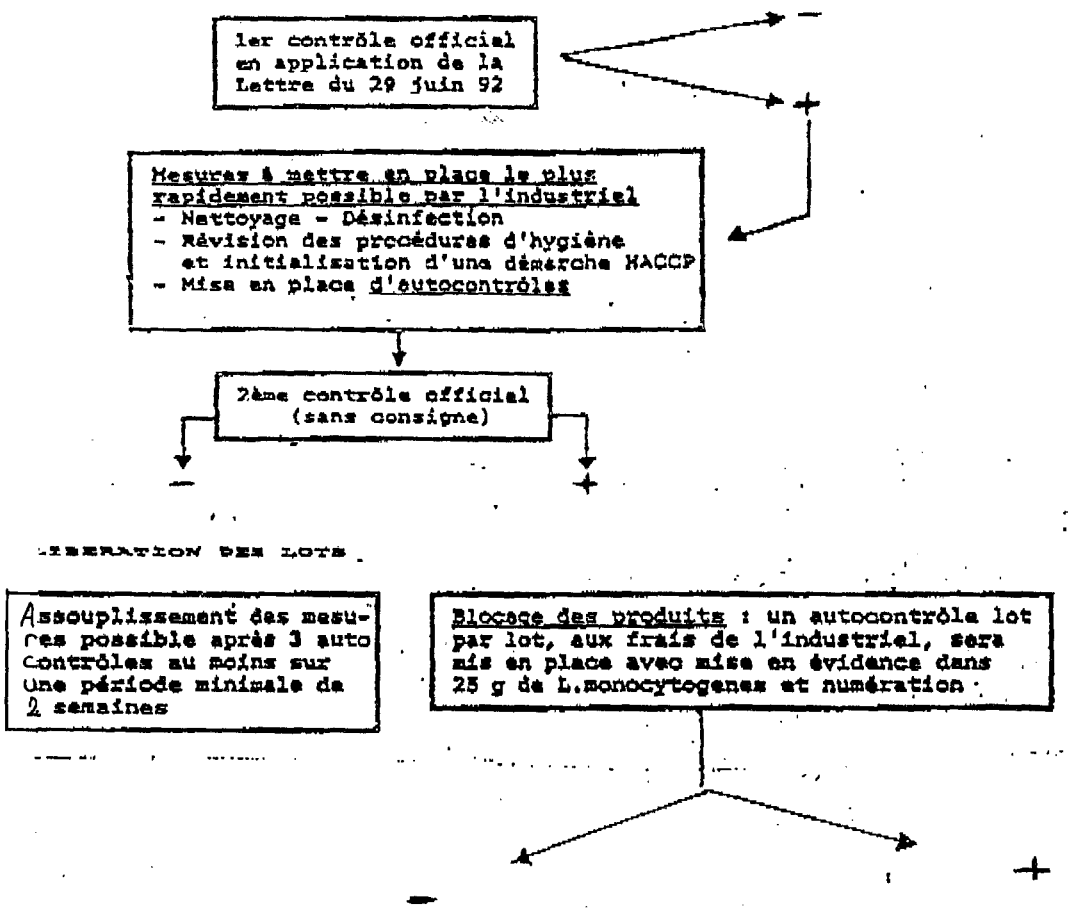
Un lot correspond au plus à une journée de fabrication pour une technologie donnée.

Le numéro d'identification du lot constitué par le numéro de code de l'établissement de fabrication suivi de la date de conditionnement en quantième de l'année doit être indiqué sur le papier d'emballage des fromages par perforations pour la date, impression ou perforation pour le code usine) ainsi que sur les bulletins d'analyses, certificats et tous documents d'accompagnement des cargaisons.

REMARQUE IMPORTANTE : Dans tous les cas, il est trés vivement recommandé aux fabricants d'inscrire une date limite d'utilisation optimale (D.L.U.O) sur les emballages afin d'éviter des consommations trop tardives de ces produits. Celle-ci indiquée au moyen de la mention "à consommer de préférence avant le ...".

CONDUITE A TENIR LORS DE L'ISOLEMENT DE LISTERIA MONOCYTOGENES DANS LES PRODUITS DE CHARCUTERIE
Visés par la Lettre Circulaire N°2755 DU 29.06.92

(Produits de charcuterie cuits ne subissant pas de traitement assainissant avant consommation)



LIBERATION DES LOTS

Assouplissement des mesures possible après 3 autocontrôles négatifs sur une période minimale de 2 semaines et 1 contrôle officiel négatif

1° <100 L.monocytogenes/g
les produits pourront être commercialisés mais sous la responsabilité de l'industriel. Le cas échéant une DLC plus courte sera apposée sur le produit en tenant compte de sa nature, de son PH et de sa température de conservation

2° >100 L.monocytogenes/g
Retrait de la consommation ; détermination éventuelle d'utilisations particulières auxquelles demeurent propres les denrées qui, sans être insalubres, ne peuvent être livrées en l'état à la consommation humaine, étant donné les risques de multiplication du germe pendant la distribution.

NB : . Il conviendra d'adresser les souches de L.monocytogenes à l'Institut Pasteur de Paris pour lysotypi
. Dans le cas ou la souche appartient au lysovar épidémique il conviendra de prendre contact avec l'administration centrale pour mise en place des mesures spécifiques.

ANNEXE XXI :

Mesures proposées par la F.I.C.

<table>
<tr><th>CATEGORIE DU PRODUIT</th><th colspan="3">MESURES A PRENDRE EN FONCTION DU NIVEAU DE CONTAMINATION</th></tr>
<tr><th></th><th>< 10^2 L.m./g</th><th>de 10^2 à 10^4 L.m./g</th><th>> 10^4 L.m./g</th></tr>
<tr><td><u>I. PRODUITS CRUS</u></td><td rowspan="3"></td><td colspan="2">Examen de confirmation de 5 unités (1)</td></tr>
<tr><td><u>II. PRODUITS TRAITES PAR LA CHALEUR</u></td><td>Si une ou plusieurs unités ont
> 10^2 L.m./g :</td><td>Si une ou plusieurs unités ont
> 10^4 L.m./g :</td></tr>
<tr><td>II.1. Remanipulés après traitement</td><td><u>Révision des procédures</u> (2)</td><td><u>Retrait du lot et Révision des procédures</u> (2)</td></tr>
<tr><td>II.2. Traités par la chaleur dans l'emballage</td><td colspan="3">Le critère est : absence de Listeria monocytogenes.
<u>Ce résultat ne peut être contrôlé qu'en s'assurant de l'efficacité listéricide du traitement thermique</u> pour le produit considéré (conception et maintenance des équipements, définition du barème approprié).</td></tr>
<tr><td colspan="4">(1) Dans certains cas l'examen de confirmation peut être supprimé, par exemple, s'il entraîne un retard intolérable eu égard au niveau de risque pressenti.

(2) au niveau de la fabrication (y compris les matières premières) et éventuellement de la distribution.</td></tr>
</table>

N.B. : On prélèvera dans un même lot de fabrication un échantillon pour contrôle constitué de six unités :

- La première unité servira à l'examen de routine
- Les cinq autres unités seront utilisées en cas de déviation par rapport au critère "guide" de 10^2 L.m /g

AUTORISATION D'IMPRESSION

De la Thèse dont l'intitulé est :

LES LISTERIOSES

Diagnostic, physiopathologie, prophylaxie

CANDIDAT : Mademoiselle Olivia LEGALLANT

VU

GRENOBLE, le 3 Mai 1994

Le Président du Jury

Professeur J. ALARY

VU

GRENOBLE, le

Le Président de l'Université
Joseph FOURIER GRENOBLE I
Sciences. Technologie. Médecine

LEGALLANT (Olivia) - LES LISTERIOSES : Diagnostic, Physiopathologie, Prophylaxie - 454 f. - (Thèse D. : Pharm. ; Grenoble I ; 1994)

Listeria, bactérie d'intérêt nouveau pour l'industrie agro-alimentaire, est un agent pathogène encore méconnu du grand public.

Après une étude des caractéristiques de ce germe, nous avons essayé de faire la synthèse des connaissances concernant l'épidémiologie, la physiopathologie, le diagnostic, le traitement, la prophylaxie des listérioses mais aussi la contamination alimentaire et la détection des Listeria dans les aliments.

Cette bactérie aux multiples localisations cliniques doit être diagnostiquée rapidement de façon à instaurer un traitement le plus précoce possible afin d'éviter un mauvais pronostic chez certaines populations à risque.

Mais, le moyen de lutte principal consiste en l'éradication des Listeria dans les denrées alimentaires, passant par le respect des règles d'hygiène et le cas échéant par l'application des traitements listéricides actuellement connus.

Cependant, de nombreuses incertitudes demeurent et la recherche a encore beaucoup à découvrir.

Mots-clés :

Listeria - détection.
Listériose - diagnostic.
Contamination alimentaire.

Jury :

Président : Mme J. ALARY, Professeur

Assesseurs : Mme A. VILLET, Maître de Conférences
Mme M. BLANC, Pharmacien

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE GRENOBLE MÉDECINE-PHARMACIE

Adresse de l'auteur : [Données à caractère personnel]