

Recherche de *Listeria monocytogenes* dans les aliments

Rappel

Le genre *Listeria* regroupe des bactéries qui ont en commun les caractères suivants : bacilles gram +, en palissade, oxydase -, catalase + ; aéro-anaérobies ; fermentant le glucose ; esculine + ; halophiles ; auxotrophes pour de nombreux facteurs de croissance ; mobiles à 30-35°C ; non sporulées.

Les *Listeria* sont responsables de TIAC, le nombre de cas de listériose est relativement faible car seuls des individus immunodéprimés et les femmes enceintes sont touchés. Par contre, les troubles peuvent être morbides.

Or, cette bactérie étant ubiquitaire, on la retrouve en faible quantité mais dans un très grand nombre d'aliments.

Méthodes utilisées pour l'isolement et le dénombrement de *L. monocytogenes* dans les aliments ?

Le nombre de *Listeria* dans un aliment peut être faible, la dose infectante est estimée à moins de 10³ par g.

La détection directe dans ce cas est impossible et les méthodes nécessitent toujours un enrichissement préalable permettant également la revivification des bactéries stressées (salaison, produits réfrigérés).

La méthode traditionnelle, de référence au niveau international et normalisée par l'AFNOR est longue : nécessite 5 jours pour obtenir un résultat.

La nécessité d'une réponse rapide, a entraîné le développement d'un grand nombre de méthodes alternatives plus rapides, validées par l'AFNOR en routine, utilisant des outils de biologie moléculaire ou des anticorps monoclonaux. Le délai est ramené à 2/3 jours voir 30h pour la PCR.

1. Méthode traditionnelle d'isolement et d'identification de *Listeria* dans les produits laitiers

(démarche générale doc1) norme AFNOR V 08-055

- Deux enrichissements successifs à partir du prélèvement de 25g d'aliment: d'abord en bouillon de Fraser un-demi incubé 24h à 30°C puis en bouillon de Fraser incubé 48h à 37°C (composition doc 2)
- Isolements sur milieux sélectifs: les plus courants sont la gélose Oxford et le milieu Palcam (composition doc 2) : incubation 24 à 48h à 37°C.
- Les colonies suspectes sont identifiées:
Confirmation du genre *Listeria* puis détermination de l'espèce.

La détermination de l'espèce repose sur des caractères culturels ou biochimiques (β hémolytique sur gélose trypticase soja au sang de mouton ou de cheval, Camp test positif, fermentation des sucres) ou sur l'ensemencement d'une galerie API *Listeria* (doc3)

Remarque : La première alternative par rapport aux méthodes classiques normalisées est de réduire le temps de confirmation et d'identification de l'espèce de *Listeria*. Pour cela, deux milieux géloses ont été développés par Sanofi et AES Laboratoire : respectivement le *Rapid'L.mono* et le milieu ALOA.

Ces deux milieux géloses sont basés sur la détection d'une phospholipase C spécifique de *Listeria monocytogenes* qui donne des colonies bleues sur le milieu *Rapid'L.mono* et des colonies bleues entourées d'un halo opaque sur le milieu ALOA.

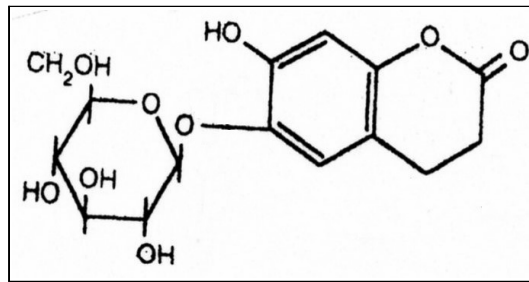
Le milieu *Rapid'L.mono* permet en outre de différencier *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* par la présence dans le milieu du sucre xylose.

Utiliser les documents techniques 1 à 3 pour répondre aux questions suivantes :

1) Comparer la composition du Fraser 1/2 et du Fraser; justifier leur utilisation.

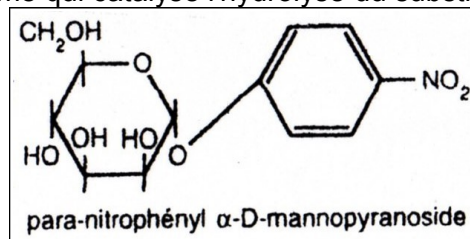
2) Quel autre genre bactérien est susceptible de cultiver sur les milieux sélectifs utilisés pour la recherche de *Listeria*? Quel(s) caractère(s) simples permettent de confirmer le genre *Listeria* pour les colonies suspectes ?

3) L'esculine a pour formule



Écrire la réaction catalysée par les bactéries du genre *Listeria*.

4) L' α -mannosidase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse du substrat suivant:



Un résultat positif se traduit par une couleur jaune ; expliquer.

5) Pour les 7 derniers tubes de la galerie API *Listeria*, un résultat positif se traduit par un virage au jaune. Pourquoi ?

6) Une colonie suspecte ensemencée sur API *Listeria* a donné le résultat suivant :

DIM	ESC	α MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
-	+	+	+	-	+	+	-	+	-

6.1. Calculer la probabilité pour que la souche corresponde au taxon *Listeria monocytogenes* document 3)

6.2. Le logiciel qui analyse les résultats fait ce calcul pour tous les taxons possibles de la base de donnée et retient le ou les taxons les plus probables.

Les résultats sont rendus accompagnés de deux indices :

- Le % d'identification %Id
- L'indice de typicité T

Qu'expriment ces deux indices ?

L'indice T donné ici est de par le logiciel est de 0,68 ; commenter.

7) Lorsqu'une *Listeria monocytogenes* est identifiée, la souche est envoyée au centre de référence des *Listeria* où un sérotypage est réalisé. D'autre part, l'institut Pasteur peut réaliser un lysotypage. Définir ces deux termes.

2. Méthodes rapides de recherche de *Listeria monocytogenes*

2.1. Par hybridation moléculaire

(protocole Gene-Trak *listeria* de Diagnostics nouveaux alimentaires)

Voici les principales étapes de la technique utilisée.

- Un échantillon de la culture (suspension des colonies suspectes) est traité au lysozyme puis à la soude afin de libérer l'ARM ribosomal.
- Hybridation en présence d'une sonde dite de détection, marquée à la fluorescéine et d'une autre sonde dite de capture comprenant une queue poly dA du côté 3' de la sonde.
- Capture des hybrides mixtes dans un tube en plastique porteur de séquences poly dT ; lavage (1)
- Le tube est mis en présence d'anticorps anti fluorescéine marqués avec une enzyme de type peroxydase; lavage (2).
- Les immuns complexes sont révélés grâce à un substrat chromogène de l'enzyme.

- 1) Quel est le rôle du lysozyme et de la soude dans la première étape ?
- 2) Quels sont exactement le rôle des lavages (1) et (2) ?
- 3) Dégager de ce protocole le principe général de cette méthode en quelques lignes.
- 4) Représenter par un schéma l'hybride « mixte » capturé.

2.2. Par immunocapture

AES laboratoire commercialise un test, le Lister Test, basé sur l'immunocapture de *Listeria* par des microbilles magnétiques porteuses d'anticorps polyclonaux dirigés contre des antigènes de *Listeria*. Les billes sont récupérées grâce à leurs propriétés magnétiques, puis étalées sur un milieu gélose spécifique et sélectif. Une réplique du milieu de culture est réalisée sur une membrane, puis on détecte *Listeria monocytogenes* sur la membrane grâce à des anticorps monoclonaux, eux mêmes révélés par des anti-anticorps marqués par une enzyme.

2.3. Par PCR

Probelia (Biorad-Pasteur) commercialise un kit permettant de détecter *Listeria monocytogenes* par amplification génétique : la sonde utilisée est spécifique du gène codant pour l'enzyme listériolysine O (enzyme permettant la survie intracellulaire de la bactérie). La recherche se fait sur le bouillon d'enrichissement.