

Étude de la spécificité d'une méthode rapide pour l'identification de *Listeria monocytogenes* : le Mono Confirm test

C Avoyne¹, M Butin¹, J Delaval², JL Bind²

¹ AES Laboratoire, route de Dol, BP 54, 35270 Combourg ;

² Laboratoire de Touraine, Parçay Meslay, 37023 Tours cedex, France

(Reçu le 15 décembre 1995 ; accepté le 20 février 1996)

Résumé – Le Mono Confirm test est une microméthode fondée sur la détermination de quatre caractères biochimiques permettant l'identification de *Listeria monocytogenes* en 24 heures. Le test est utilisé avec des souches appartenant au genre *Listeria*. La présence d'un enzyme, la D-amino-peptidase, permet de différencier les souches de *Listeria monocytogenes* des autres espèces de *Listeria*. L'étude a été conduite à partir de 133 souches de *Listeria* sp d'origine alimentaire, humaine ou animale. Les 68 souches de *L. monocytogenes* ont été correctement identifiées. La galerie Mono Confirm a permis le classement dans le genre *Listeria* de 64 souches non *monocytogenes* parmi 65 souches testées.

Identification / *Listeria monocytogenes* / Mono Confirm test / spécificité

Summary – **Specificity of a rapid method for the identification of *Listeria monocytogenes*: the Mono Confirm test.** The Mono Confirm test is a micromethod based upon four biochemical reactions for the identification of *Listeria monocytogenes* in 24 hours. The test must be performed with *Listeria* strains. The enzyme D-aminopeptidase allows the differentiation between *L. monocytogenes* and other *Listeria* species. To study the specificity of the Mono Confirm test, 133 *Listeria* strains which came from food products, human or animal sources were examined. Mono Confirm test enabled good identification for all *L. monocytogenes* (68 strains) ; 64 out of 65 non *monocytogenes* *Listeria* strains were recognized as *Listeria* non *monocytogenes*.

Identification / *Listeria monocytogenes* / Mono Confirm test / specificity

INTRODUCTION

La détection de *Listeria monocytogenes* dans les aliments et l'environnement est une exigence essentielle pour l'industrie alimentaire et pour la santé publique. Les cas de listériose humaine sont dus à l'espèce *monocytogenes* (Bind et Delaval, 1994). L'isolement de *Listeria* sp s'accompagne toujours d'une confirmation du genre puis d'une identification de l'espèce. La caractérisation de l'espèce est essentielle pour l'industrie agro-alimentaire qui doit disposer d'une technique simple de distinction de *L monocytogenes* des espèces non pathogènes, fréquemment isolées des produits alimentaires.

Quelques méthodes rapides pour l'identification des *Listeria* sont commercialisées. Le système AccuProbe (Ninet et al, 1992) permet une identification de *L monocytogenes* à l'aide d'une sonde nucléique dirigée contre l'ARN ribosomal 16 S. Le système API *Listeria* (Bille et al, 1992) s'appuie sur la détermination d'un ensemble de caractères biochimiques à l'aide d'une galerie miniaturisée. Bille *et al* (1992) ont mis en évidence la présence d'une arylamidase chez les espèces *ivanovii*, *innocua*, *seeligeri* et *welshimeri*, ce qui permet de les différencier de *L monocytogenes*.

Le Mono Confirm test (Biolife, Milan, Italie) est une micro-méthode fondée sur la mise en évidence de quatre caractères biochimiques pour la confirmation de l'appartenance au genre *Listeria* et l'identification de *L monocytogenes*. La présence de l'enzyme β -glucosidase et la production d'acide à partir d'arabitol et d' α -méthyl-D-glucoside permettent de confirmer l'appartenance au genre *Listeria*. La détection d'une enzyme spécifique des espèces de *Listeria non monocytogenes*, la D-aminopeptidase, permet par son absence de révéler une souche de *L monocytogenes*.

Le Mono Confirm test s'adresse à des souches qui ont été isolées sur un milieu

spécifique pour *Listeria* et qui y ont un aspect caractéristique.

Les études réalisées sur cette galerie d'identification (Cantoni et al, 1994 ; Ottaviani, 1994) ont révélé 100 % de concordance avec la méthode de référence pour l'identification de *L monocytogenes* (test de CAMP avec *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*, fermentation des sucres D-xylose et L-rhamnose, β -hémolyse).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Utilisation du Mono Confirm test

Le test est réalisé à partir de colonies réisolées sur gélose non sélective (gélose trypticase soja à l'extrait de levure ou gélose Columbia au sang de mouton) et provenant d'une colonie ayant un aspect caractéristique sur gélose sélective, après avoir vérifié l'appartenance au genre *Listeria*. Une suspension dans 1 mL d'eau physiologique est préparée à partir des colonies de façon à obtenir une turbidité équivalente à l'étalon n°2 de Mac Farland. Trois gouttes de cette suspension sont distribuées dans chacune des quatre cupules de la barrette Mono Confirm test. Les cupules, munies d'un couvercle, sont mises à incuber 24 heures à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Les réactions colorées sont observées après incubation : la production d'acide à partir de D-arabitol et α -méthyl-D-glucoside est positive lorsqu'une couleur jaune apparaît, le développement d'une couleur bleue dans la cupule contenant le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucopyranoside révèle la présence de β -glucosidase. Une goutte de réactif diaminobenzaldéhyde dans le puits contenant le substrat D-aminoacide- β -naphtylamide révèle la présence de l'enzyme D-aminopeptidase par une coloration jaune. L'interprétation des résultats du Mono Confirm test est indiquée dans le tableau I.

Souches bactériennes

L'étude a porté sur 133 souches pures de *Listeria* appartenant au soucier du laboratoire ou fournies par le Centre hospitalier universitaire Trousseau (CHU de Tours) et maintenues sur gélose de conservation. Les souches isolées au laboratoire à partir de produits alimentaires (indiquées

Tableau I. Interprétation des résultats du Mono Confirm test.
Results interpretation of the Mono Confirm test.

Production d'acide à partir des sucres		Présence des enzymes		
Arabitol	α -méthyl D-glucoside	β glucosidase	D-aminopeptidase	Identification
-	-	-	*	non <i>Listeria</i>
-	+	+	*	non <i>Listeria</i>
-	-	+	*	non <i>Listeria</i>
-	+	-	*	non <i>Listeria</i>
+	-	-	*	non <i>Listeria</i>
+	-	+	*	non <i>Listeria</i>
+	+	-	*	non <i>Listeria</i>
+	+	+	+	<i>Listeria non monocytogenes</i>
+	+	+	-	<i>Listeria monocytogenes</i>

* Quand l'un des tests arabitol, α -méthyl-D-glucoside, β glucosidase est négatif, il est inutile de lire la réaction mettant en évidence l'enzyme D-aminopeptidase.

When one of the tests arabitol, α -méthyl-D-glucoside, β glucosidase is negative, do not read the D-aminopeptidase reaction.

dans les tableaux II et III) ont été identifiées selon les méthodes classiques de la norme NF V 08-055. Les souches référencées par des centres agréés sont indiquées dans la colonne « référence » des tableaux II et III.

Les souches ont été cultivées en bouillon cœur cervelle 24 heures à 37 ± 1 °C puis isolées sur gélose au sang de mouton.

Après incubation de la gélose à 37 ± 1 °C pendant 24 heures, une galerie Mono Confirm test par souche a été inoculée.

Identification des souches

Les résultats obtenus avec la galerie Mono Confirm test ont été comparés aux données du soucier du laboratoire.

En cas de discordance, le Mono Confirm et les tests d'identification classiques selon la norme NF V08-055 ont été renouvelés : test de CAMP avec *S aureus* et *R equi* (Seeliger et Jones, 1986), fermentation des sucres D-xylose et L-rhamnose, β -hémolyse (Rocourt et Catimel, 1985).

RÉSULTATS

Le tableau IV indique le bilan des résultats obtenus avec le Mono Confirm test concernant les 133 souches de *Listeria* étudiées.

Nous avons vérifié l'absence de D-aminopeptidase pour les 68 souches de *L monocytogenes* testées alors que les 65 souches des autres espèces ont révélé la présence de cette enzyme. Ces résultats confirment la capacité du Mono Confirm test à différencier les souches de *L monocytogenes* de celles appartenant à d'autres espèces de *Listeria*. La spécificité du test pour l'identification de *L monocytogenes* est de 100 %.

La spécificité au niveau de l'appartenance au genre est de 99 % puisqu'une souche de *L ivanovii* (souche L7iv, tableau III) n'a pas produit d'acide à partir de l'arabitol (ce qui l'exclut du genre *Listeria*). Lors d'un second essai, et après vérification de l'ap-

partenance à l'espèce *ivanovii*, cette souche a pu être classée dans le genre *Listeria* (tous les tests de la galerie se sont révélés positifs). Cette souche est donc bien capable de fermenter l'arabitol.

DISCUSSION

La galerie Mono Confirm test est une méthode destinée à l'identification de *L. monocytogenes* à partir de souches de *Listeria*.

Tableau II. Souches de *Listeria monocytogenes* utilisées pour l'étude de spécificité du Mono Confirm test. *L. monocytogenes strains used for the specificity study of Mono Confirm test.*

Souche	n°	Référence (1)	sv (2)	Origine (3)	n°	sv (2)	Origine (3)
<i>Listeria</i> monocytogenes	L1	CNL895788	1/2 a	Lait	L36	4 e	?
	L2	CNL895789	1/2 a	Lait	L37	7	?
	L3	ATCC19111	1/2 a	Poulet	169m41	4	Aliment LVD37
	L4	CNL895791	1/2 a	Fromage	169m42	4	Aliment LVD37
	L5	CHUT860776	1/2 a	Fromage	1230S	1	Aliment LVD37
	L6	CNL95794	1/2 a	Fromage	950077	1	Lait chèvre CHUT
	L7	CNL895795	1/2 a	Fromage	37B	1	Aliment LVD37
	L8	CNL895797	1/2 a	Fromage	50LP	1	Aliment LVD37
	L9	CNL895801	1/2 a	Lait	228CA	1	Aliment LVD37
	L10	CNL895802	1/2 a	Fromage	224 CA	1	Aliment LVD37
	L11	CNL895803	1/2 a	Fromage	32 LP	1	Aliment LVD37
	L12	NCTC7973	1/2 a	?	169m11	1	Aliment LVD37
	L13	CNL95790	1/2 b	?	169m12	1	Aliment LVD37
	L14	CNL895798	1/2 b	Fromage	834	1	Aliment LVD37
	L15	CNL880203	1/2 b	?	833	1	Aliment LVD37
	L16	CNL880283	1/2 b	?	L6m	1	Aliment LVD37
	L17	CNL895796	1/2 c	Fromage	882	1	Aliment LVD37
	L18		1/2 c	?	938 m1	1	Aliment LVD37
	L19	ATCC19115	4 b	LCR	919 m1	1	Aliment LVD37
	L20	CHUT82160	4 b	?	13Lm1	1	Aliment LVD37
	L21	CHUT83008	4 b	Hémoculture	1039LP	1	Aliment LVD37
	L22	CHUT83335	4 b	Hémoculture	1009LP	1	Aliment LVD37
	L23	CHUT83335	4 b	LCR	1116m1	1	Aliment LVD37
	L24	CHUT83340	4 b	?	60ca	1	Aliment LVD37
	L25	CHUT83416	4 b	?	58ca	1	Aliment LVD37
	L26	CHUT850187	4 b	Hémoculture	177	4	Aliment LVD37
	L27	CHUT850347	4 b	Fromage	777	4	Aliment LVD37
	L28	CHUT850364	4 b	Liquide gastrique	753	4	Aliment LVD37
	L29	CHUT860238	4 b	Fromage	710	4	Aliment LVD37
	L30	CHUT870269	4 b	Lait	592LP3	4	Aliment LVD37
	L31	2671/108/312	4 b	Rillettes	592LP5	4	Aliment LVD37
	L32		3 a	?	8F1	1	Lait chèvre LVD37
	L33	CNL895801	3 b	Fromage	8F4	1	Lait chèvre LVD37
	L34		3 c	?	8F5	1	Lait chèvre LVD37
	L35		4 a	?			

1) Référence officielle (*official reference*). ATCC : American type culture collection, Maryland, États-Unis. CNL : Centre national des *Listeria*, Nantes, France (*national centre of Listeria*). NCTC : collection nationale de cultures types, Londres, UK (*national collection of type cultures*). CHUT : centre hospitalier universitaire de Tours, France (*university hospital centre of Tours, France*). 2) : Sérovar ou sérotype (*serovar or serogroup*). 3) Origine (*source*). LCR : Liquide céphalo-rachidien (*cephalic rachidian liquid*). LVD 37 : Laboratoire vétérinaire départemental d'Indre et Loire (*departmental veterinary laboratory of Indre et Loire, France*).

Tableau III. Souches de *Listeria* spp non *monocytogenes* utilisées pour l'étude de spécificité du Mono Confirm test.*Listeria* spp not *monocytogenes* strains used for the specificity study of Mono Confirm test.

Souche	n°	Référence (1)	sv (2)	Origine (3)	n°	sv (2)	Origine (3)
<i>Listeria ivanovii</i>	L49	CHUT880414	5	Lait	956LP	5	Aliment LVD37
	L50	ATCC19119	5	Mouton	L7iv	5	Aliment LVD37
	Ps	Ps ivanov	5	CHUT	940370	5	Lait chèvre
	86479	CIP 7842	5	Mouton	940388	5	Lait chèvre
<i>Listeria seeligeri</i>	L47	CHUT861162	6b	Lait cru	8F3	ND	Lait chèvre LVD37
	86478	CIP 100100	1/2 b	Sol	1004 D	ND	Aliment LVD37
	861165		6b	Lait cru LCHA	271 D	ND	Aliment LVD37
	861161		6b	Lait cru LCHA	1113	ND	Aliment LVD37
	L10s		ND	Aliment LVD37	836 LP	ND	Aliment LVD37
	8F2		ND	Lait chèvre LVD37	39 B	ND	Aliment LVD37
					950064	ND	Lait chèvre
<i>Listeria welshimeri</i>	1116w		ND	Aliment LVD37	62ca	ND	Porc LVD37
	13Lw		ND	Aliment LVD37	64ca	ND	Poulet LVD37
	179LP		ND	Aliment LVD37	66ca	ND	Canard LVD37
	727 D		ND	Aliment LVD37	69ca	ND	Canard LVD37
	57ca		ND	Canard LVD37	70ca	ND	Canard LVD37
	86477	CIP8149	6b	Végétation			
<i>Listeria innocua</i>	L39	CHUT880919	6a	Fromage	814 D	ND	Aliment LVD37
	L40	CHUT881329	6a	Fromage	708 D	ND	Aliment LVD37
	L41		6a	?	800	ND	Aliment LVD37
	L42		6a	?	7PF	ND	Aliment LVD37
	L43		6a	?	859	ND	Aliment LVD37
	912LP		ND	Aliment LVD37	L6i	ND	Aliment LVD37
	1117LP		ND	Aliment LVD37	L8i	ND	Aliment LVD37
	272		ND	Aliment LVD37	L23i	ND	Aliment LVD37
	956 D		ND	Aliment LVD37	880	ND	Aliment LVD37
	942 D		ND	Aliment LVD37	938in	ND	Aliment LVD37
	988 D		ND	Aliment LVD37	931LP	ND	Aliment LVD37
	950074		ND	Environnement	917LP	ND	Aliment LVD37
	86476	CIP 8011	6a	Cerveau bovin	57cai	ND	Canard LVD37
	935 D		ND	Aliment LVD37	71ca2	ND	Canard LVD37
	934 D		ND	Aliment LVD37	72ca2	ND	Poulet LVD37
	827 D		ND	Aliment LVD37	66ca2	ND	Canard LVD37
					61ca2	ND	Dinde LVD37

1) Référence officielle (*official reference*). CHUT : Centre hospitalier universitaire de Tours, France (*university hospital centre of Tours, France*). ATCC : American type culture collection, Maryland, États-Unis. CIP : Collection de l'institut Pasteur (*institut Pasteur collection, Paris, France*). 2) Sérovar ou séro groupe (*serovar or serogroup*). ND : Non déterminé (*not typed*). 3) Origine (*source*). LCHA : Laboratoire central d'hygiène alimentaire, Paris, France (*food safety central laboratory, Paris, France*). LVD 37 : laboratoire vétérinaire départemental d'Indre et Loire (*departmental veterinary laboratory of Indre et Loire, France*).

Tableau IV. Bilan des résultats obtenus avec le Mono Confirm test
Results obtained with the Mono Confirm test.

<i>Espèce</i>	<i>Nombre de souches testées</i>	<i>Identifications correctes</i>
<i>L. monocytogenes</i>	68	68
<i>L. innocua</i>	33	33
<i>L. ivanovii</i>	8	7 ^a
<i>L. seeligeri</i>	13	13
<i>L. welshimeri</i>	11	11
Total	133	132

^a Une souche ne fermentait pas l'arabitol (*one strain did not ferment arabitol*).

Secondairement, elle permet de confirmer l'appartenance au genre *Listeria*. Les résultats précédents montrent que l'identification de l'espèce *monocytogenes* à l'aide du Mono Confirm test est fiable et facile à observer. Une souche de *L. ivanovii* n'a fermenté l'arabitol qu'une fois sur deux essais, ce qui rendait légèrement douteuse la confirmation de l'appartenance au genre *Listeria*. Rappelons cependant qu'il est conseillé de réaliser cette galerie à partir de souches dont l'appartenance au genre *Listeria* ne fait pas de doute.

Pour expliquer l'absence de fermentation de l'arabitol observée chez la souche L7iv lors du premier essai, nous pouvons émettre deux hypothèses. Après un long séjour en gélose de conservation, la souche s'est peut-être multipliée lentement et/ou toutes ses activités métaboliques n'ont pas été totalement exprimées. Cependant, toutes les souches ont été repiquées de la même façon (revivification en bouillon riche et isolement sur gélose au sang) et aucune autre n'a révélé un tel défaut métabolique. La quantité ou la qualité de substrat présent dans la cupule « arabitol » de la galerie utilisée pourraient également être mis en cause, bien que les tests « arabitol »

n'aient pas posé de problème pour les autres barrettes.

Dans une autre étude portant sur 233 souches de *Listeria*, Cantoni et al (1994) indiquent une spécificité de 100 %, aussi bien au niveau de l'appartenance au genre qu'au niveau de l'identification de l'espèce *monocytogenes*. Ces auteurs ont travaillé sur 77 souches de *Listeria non monocytogenes* qui ont toutes fermenté l'arabitol. Cependant, seulement deux souches appartenant à l'espèce *ivanovii* ont été testées.

Des résultats comparables à ceux de Cantoni et al ont été obtenus par Ottaviani (1994) avec 85 souches d'origine alimentaire. Dans cette étude, les 40 souches de *Listeria non monocytogenes* ont révélé une activité fermentaire avec l'arabitol, mais aucune souche de *L. ivanovii* n'a été testée.

En conclusion, il apparaît que la mini-galerie Mono Confirm test est une méthode rapide d'utilisation très simple qui permet une identification de *L. monocytogenes* avec seulement quatre marqueurs. Son utilisation représente une économie de temps et de coût. Le Mono Confirm test possède une excellente spécificité vis-à-vis de l'espèce *monocytogenes*. C'est une

technique qui a sa place en industrie agro-alimentaire.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le professeur A Audurier de nous avoir aimablement fourni plusieurs souches de *Listeria* nécessaires à cette étude.

RÉFÉRENCES

- Bille J, Catimel B, Bannerman E, Jacquet C, Yersin MN, Caniaux I, Monget D, Rocourt J (1992) API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl Environ Microbiol* 58, 1857-1860
- Bind JL, Delaval J (1994) Les Listérioses. *Bull Soc Vét Prat France* 78, 387-407
- Cantoni C, Ottaviani F, Carozzi F (1994) Sistema miniaturizzato per identificazione di *Listeria monocytogenes*: Valutazione del Mono Confirm test. *Ind Aliment* 23, 1103-1104
- Ninet B, Bannerman E, Bille J (1992) Assessment of the Accuprobe *Listeria monocytogenes* culture identification reagent kit for rapid colony confirmation and its application in various enrichment broths. *Appl Environ Microbiol* 58, 4055-4059
- Ottaviani F (1994) Mono Confirm : Miniaturized system for *Listeria monocytogenes* confirmation. 3^e conférence internationale de l'ASEPT, Laval, France, 1-2 juin
- Rocourt J, Catimel B (1985) Caractérisation biochimique des espèces du genre *Listeria*. *Zentral Bakteriol Mikrobiol Hyg I Abt Orig*, A260, 221-231
- Seeliger HPR, Jones D (1986) Genus *Listeria*. In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology 2* (PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt, eds). The Williams and Wilkins Company, Baltimore