

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 mai 2009 (07.05.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/056762 A2

- (51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/569 (2006.01) *C12Q 1/04* (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2008/051946
- (22) Date de dépôt international :
29 octobre 2008 (29.10.2008)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0758666 30 octobre 2007 (30.10.2007) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMÉRIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280
Marcy l'Etoile (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BLANC,
Bernadette [FR/FR]; 38, impasse du Pinay, F-69570
Dardilly (FR). MONGET, Daniel [FR/FR]; Résidence du
Moulin, 13, rue Moulin du Buis, F-01150 Saint Sorlin en
Bugey (FR). PERROT, Nadine [FR/FR]; 127, résidence
Montbreval, F-01120 Montluel (FR).
- (74) Mandataire : SPRUGNOLI, Claude; Biomérieux SA,
Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasienn (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))
- Publiée :**
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(54) Title: BIOCHEMICAL TEST FOR CONFIRMING THE PRESENCE OF <I>L. MONOCYTOGENES</I>

(54) Titre : TEST BIOCHIMIQUE POUR CONFIRMER LA PRESENCE DE *L. MONOCYTOGENES*

(57) Abstract: The invention relates to a biochemical test for confirming the presence of *L. monocytogenes*, characterised in that it comprises at least one phosphatidylinositol phospholipase C (PIPLC) substrate and at least one alpha-mannosidase substrate.

(57) Abrégé : L'invention concerne un test biochimique pour confirmer la présence de *L. monocytogenes* caractérisé en ce qu'il comprend au moins un substrat de phosphatidyl inositol phospholipase C (PIPLC) et au moins un substrat d'alpha mannosidase.



WO 2009/056762 A2

Test biochimique pour confirmer la présence de *L. monocytogenes*

La présente invention concerne l'identification de bactéries pathogènes du genre *Listeria*, et plus précisément de l'espèce *Listeria monocytogenes*.

5

L'isolement et l'identification de la bactérie *Listeria monocytogenes* est un problème majeur de la surveillance de l'hygiène agro-alimentaire et de la bactériologie médicale. Parmi les bactéries du genre *Listeria*, seule l'espèce *Listeria monocytogenes* est connue pour être pathogène pour l'homme. Elle peut engendrer la listériose, parfois mortelle (25 à 30% des cas) chez les personnes immunodéprimées, les enfants en bas âge ou les femmes enceintes. Les autres espèces de *Listeria* ne sont pas pathogènes ou ne le sont que pour les animaux. C'est le cas notamment de *Listeria ivanovii*.

10

Même si les risques de listériose humaine ont régressé dans la plupart des pays développés lors des dernières décennies, la société moderne exige de plus en plus de sécurité qui, si elle s'accommode de cas sporadiques, ne peut tolérer les épidémies.

15

Dans le cadre de diagnostic d'affections bactériennes chez l'humain, il est donc important de distinguer nettement *Listeria monocytogenes* parmi les autres espèces du genre *Listeria* sp. qui ne sont pas pathogènes.

20

Le genre *Listeria* sp comprend aujourd'hui six espèces, dont seule *Listeria monocytogenes* est pathogène pour l'homme.

Des germes sont à l'origine d'épidémies sévères chez l'homme, à la suite de contaminations à l'origine alimentaires. Dans les aliments (lait et produits laitiers essentiellement), deux espèces de *Listeria* sont principalement isolées : *Listeria innocua* non pathogène et *Listeria monocytogenes* pathogène.

25

Ces deux espèces ont de nombreux caractères biochimiques communs, il est en conséquence difficile de les différencier. Le test de la beta-hémolyse, par exemple repose sur la détermination d'une activité beta-hémolytique liée à la production par la bactérie d'une substance qui provoque la lyse des hématies (listériolysine). Ce test est exercé sur gélose de sang de mouton ou de cheval, mais la réponse est souvent discrète. Ce test est

30

donc peu fiable et s'il permet de différencier les deux espèces principalement rencontrées,

à savoir *L. monocytogenes* (réponse positive) de *L. innocua* (réponse négative), il n'est pas spécifique de l'espèce pathogène.

Le CAMP-test est un autre test, qui est associé au test de la beta-hémolyse précédemment décrit. Le test est réalisé sur gélose trypticase soja, contenant 5 % d'hématies lavées de mouton. La souche beta-hémolytique de *S. aureus* CIP 5710 est ensemencée en une strie perpendiculaire aux stries formées par la culture de la souche de *Listeria* à tester. Le renforcement de l'hémolyse du staphylocoque au contact des deux zones indique une réaction positive. En pratique, le CAMP-test est une technique lourde à mettre en oeuvre, et, comme l'hémolyse, n'est pas toujours très fiable.

10 Il est également possible d'utiliser des milieux de culture ou des milieux d'identification. A ce titre, le brevet EP496680, délivré à la demanderesse, décrit un procédé d'analyse bactériologique pour différencier l'espèce *Listeria monocytogenes* des autres bactéries du genre *Listeria sp.* Selon ce procédé, on utilise un milieu réactionnel comprenant un substrat chromogène ou fluorogène susceptible d'être hydrolysé par une enzyme appelée
15 Glycine aminopeptidase. Cette technique très intéressante présente un inconvénient résidant dans le fait que l'espèce *Listeria monocytogenes* est la seule à ne pas avoir d'activité enzymatique Glycine aminopeptidase. La détection de *Listeria monocytogenes* est réalisée par une activité négative, ce qui n'est pas aisée, l'utilisation d'un test négatif manquant de spécificité en cas de mutant ou si les autres espèces sont stressées et ne
20 répondent pas avec une activité normale.

Il est possible de différencier les espèces *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii*, des autres *Listeria* par la mise en évidence de l'activité phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC). En effet, il a été démontré que la PI-PLC est sécrétée dans le milieu de culture par certaines espèces du genre *Listeria* telles que *Listeria*
25 *monocytogenes* et *Listeria ivanovii* (Leimeister-Wächter et al., Mol. Microbiol. (1991) 5(2), pp. 361-366). A ce titre, le milieu Ottaviani Agosti Agar est un milieu chromogène qui utilise d'une part un substrat β Glucosidase qui permet la détection de toutes les espèces du genre *Listeria* et d'autre part la mise en évidence de l'activité PI-PLC de *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* par l'apparition d'un halo autour de la colonie.

Quelque soit la technique utilisée, il est nécessaire de réaliser systématiquement un test de confirmation de *Listeria monocytogenes*, mettant généralement en œuvre un deuxième milieu de culture, pour lequel une étape d'incubation de 24h est nécessaire. On peut citer à ce titre les tests de confirmation ALOAConfirmation (AES), ou CHROMagar Identification listeria (BBL) . Au total, une durée de 48 H est donc nécessaire pour identifier et confirmer la présence de *Listeria monocytogenes* : utilisation d'un premier milieu de culture, qui nécessite 24H d'incubation, puis la seconde étape de confirmation qui nécessite également une incubation de 24h. Cette durée de 48h est longue, et il est souhaitable de raccourcir cette durée pour proposer un diagnostic fiable aussi rapidement que possible.

La présente invention a pour objectif de proposer une méthode de détection qui permet la différenciation de l'espèce *Listeria monocytogenes* par rapport à toutes les autres espèces de *Listeria spp.* En particulier, l'invention propose un nouveau test de confirmation, qui est un test biochimique très rapide puisqu'il peut être mis en œuvre en moins de 6h.

Avant d'aller plus avant dans la description de l'invention, les définitions ci dessous sont données afin de faciliter l'exposé de l'invention.

Par test biochimique, on entend un test permettant la mise en œuvre d'une réaction biochimique mettant en évidence la présence de bactéries. Un tel test peut être notamment mis en œuvre directement à partir d'un inoculum, sans mettre en œuvre une étape de croissance. Ce sont alors les enzymes préformées apportées par la suspension bactérienne qui sont détectées.

De tels tests sont notamment mis en œuvre dans la gamme API® ou le système Vitek 2. Ces tests conditionnés sous forme déshydratée sont mis en contact, sous incubation, avec l'échantillon à analyser. La réaction biochimique recherchée est détectée par un changement d'état du test (apparition disparition d'une coloration, d'une fluorescence). La lecture du test se fait alors visuellement ou à l'aide d'un lecteur, de façon directe ou après l'ajout d'un réactif révélateur.

La gamme API® repose sur une méthode probabiliste d'identification numérique, associant une galerie de tests biochimiques, dans des cupules et une base de données. C'est la combinaison judicieuse des tests qui assure la caractérisation d'un groupe de germe et la distinction des espèces entre elles.

- 5 Le système VITEK 2 est un système d'identification et d'antibiogramme, entièrement automatisé, qui met en œuvre une carte de 64 micro-puits. En supprimant des étapes manuelles, l'automatisation permet de gagner du temps au laboratoire et garantit une uniformité des procédures d'analyse qui améliore la fiabilité des résultats. L'identification réalisée sur ce système utilise une méthode probabiliste similaire à celle des galeries API.
- 10 L'automatisation de la lecture permet une lecture cinétique des tests biochimiques mis en œuvre et permet ainsi une identification en 4 à 8 heures pour les germes Gram positifs courants ainsi que pour *Listeria monocytogenes*.

Le test biochimique selon l'invention est un test de confirmation de la présence de *L*
15 *monocytogenes*, comprenant un substrat de PI-PLC et un substrat d' α mannosidase, mais peut comprendre également des sels minéraux, des peptones, des hydrates de carbone, un ou plusieurs composés limitant les variations de pH, un ou plusieurs inducteurs d'enzymes.

20 Par substrat, on entend toute molécule susceptible d'engendrer directement ou indirectement un signal détectable dû à une activité enzymatique ou métabolique du microorganisme.

Le substrat peut être notamment un substrat enzymatique, c'est à dire un substrat pouvant être hydrolysé par une enzyme en un produit permettant la détection, directe ou indirecte
25 d'un microorganisme.

Au sens de la présente invention, ce substrat est notamment un substrat de phosphatidyl inositol phospholipase C (PIPLC) ou un substrat d' α mannosidase.

Ce substrat peut comprendre notamment une première partie spécifique de l'activité enzymatique à révéler et une seconde partie faisant office de marqueur, ci-après appelée
30 partie marqueur. Cette partie marqueur peut être chromogène, fluorogène,

luminescente... préférentiellement, les substrats utilisés dans la présente invention sont chromogènes. On peut citer notamment les substrats à base d'indoxyl et ses dérivés, particulièrement adaptés dans le cas de substrats de phosphatidyl inositol phospholipase C (PI-PLC), les substrats à base de nitrophénol et dérivés, particulièrement adaptés dans

5 le cas de substrats d' α -mannosidase, mais également les substrats à base d'hydroxyquinoline ou d'esculétine ou d'alizarine ou de catéchol ou d'aminophénol et de naphthol et leurs dérivés Pour les marqueurs fluorogène, on peut citer les dérivés de coumarines et notamment d'umbelliféronne, de naphthol, de résorufine, de fluorescéine

10 Selon la présente invention, le substrat est préférentiellement choisi parmi les substrats à base :

- 15 □ d'Indoxyl (3-Indoxyl,5-Bromo-3-indoxyl, 4-Chloro-3-indoxyl, 5-Iodo-3-indoxyl, 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl, 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl, 6-Bromo-3-indoxyl, 6-Chloro-3-indoxyl, 6-Fluoro-3-indoxyl, 4,6-Dichloro-3-indoxyl, 6,7-Dichloro-3-indoxyl, 4,6,7-Trichloro-3-indoxyl, 5-Bromo-4-chloro-N-méthyl-3-indoxyl, N-Méthyl-3-indoxyl...)
- de Nitrophénol (ortho-Nitrophénol, para-Nitrophénol, ...)

Préférentiellement, le substrat de PIPLC est un substrat chromogène. Préférentiellement, le substrat de PIPLC est un indolyl-phosphatidyl-myo-inositol, préférentiellement le 5 bromo 4 chloro 3 indoxyl myoinositol phosphate (X-indolyl-phosphatidyl-myo-inositol)

20 Préférentiellement, le substrat d' α mannosidase est un substrat chromogène ou fluorogène. Préférentiellement, le substrat d' α mannosidase est un substrat chromogène. Préférentiellement, le substrat d' α mannosidase est un substrat de mannopyranosidase. Préférentiellement, le substrat de mannopyranosidase est le nitrophenyl-4- α D mannopyranoside.

25 Préférentiellement, la concentration en substrat de PI-PLC est comprise entre 5 et 0,1 g/l, préférentiellement entre 1,5 et 0,5 g/l.

Préférentiellement, la concentration en substrat d' α mannosidase est comprise entre 2 et 0,1 g/l, préférentiellement entre 1 et 0,5 g/l.

Par milieu réactionnel, on entend un milieu comprenant tous les éléments nécessaires à

30 l'expression d'un métabolisme et/ou à la croissance de microorganismes. Le milieu

réactionnel peut être solide, semi-solide ou liquide. Par milieu solide, on entend par exemple un milieu gélifié. L'agar est l'agent gélifiant traditionnel en microbiologie pour la culture des microorganismes, mais il est possible d'utiliser de la gélatine ou de l'agarose. Un certain nombre de préparations sont disponibles dans le commerce, comme
5 par exemple l'agar Columbia, la gélose Trypcase-soja, la gélose Mac Conkey, la gélose Sabouraud ou plus généralement celles décrites dans le Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

Le milieu réactionnel peut comprendre un ou plusieurs éléments en combinaison, tels que des acides aminés, des peptones, des hydrates de carbone, des nucléotides, des minéraux,
10 des vitamines, des molécules actives telles que des antibiotiques, des enzymes, des tensioactifs, des tampons, des sels de phosphate, d'ammonium, de sodium, de métaux, un ou plusieurs substrats permettant la détection d'une activité enzymatique ou métabolique...

Le milieu peut comprendre également un colorant. A titre indicatif, on peut citer comme
15 colorant le bleu d'Evans, du rouge neutre, du sang de mouton, du sang de cheval, un opacifiant tel que l'oxyde de Titane, de la nitroaniline, du vert malachite, du vert brillant...

Pour détecter le genre *Listeria*, on peut citer notamment les milieux Palcam et Oxford, milieux sélectifs conventionnels fréquemment utilisés en industrie et cités dans les
20 normes internationales ISO 11290-1 et 11290-2 pour la recherche et dénombrement de *Listeria monocytogenes*, ou des milieux chromogènes tel que le milieu OAA qui en plus de la détection permet l'identification présomptive de *L.monocytogenes*

Par échantillon biologique, on entend un échantillon clinique, issu d'un prélèvement de liquide biologique ou un échantillon alimentaire, issu de tout type d'aliment. Cet
25 échantillon peut être ainsi liquide ou solide et on peut citer d'une manière non limitative, un échantillon clinique de sang, de liquide cérébrospinal, de placenta, un échantillon alimentaire d'eau, de boissons tels que le lait, un jus de fruits; de yaourt, de viande, d'œufs, de légumes, de mayonnaise, de fromage, de poisson, un échantillon alimentaire issu d'une alimentation destinée aux animaux.

A ce titre, l'invention concerne un test biochimique pour confirmer la présence de *L. monocytogenes* caractérisé en ce qu'il comprend au moins un substrat de phosphatidyl inositol phospholipase C (PIPLC) et au moins un substrat d' α mannosidase.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le substrat de PIPLC est un indolyl-
5 phosphatidyl-myo-inositol, préférentiellement le 5 bromo 4 chloro 3 indoxyl myoinositol phosphate.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le substrat d'alpha mannosidase est un substrat de mannopyranosidase, préférentiellement le nitrophenyl-4- α D mannopyranoside.

10 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le test comprend en outre un activateur de la PIPLC, ou plusieurs tel que notamment l'alpha-glycerophosphate de Magnesium, Serum Albumine bovine.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la concentration en substrat de PI-
PLC est comprise entre 5 et 0,1 g/l, préférentiellement entre 1,5 et 0,5 g/l.

15 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la concentration en substrat d' α mannosidase est comprise entre 2 et 0,1 g/l, préférentiellement entre 1 et 0,5 g/l.

L'invention concerne également l'utilisation d'un test biochimique tel que décrit précédemment, c'est à dire un test biochimique de confirmation comprenant un substrat
20 de phosphatidyl inositol phospholipase C (PIPLC) et au moins un substrat de alpha mannosidase, tel que défini précédemment, pour confirmer la présence de *L. monocytogenes*.

Le test selon l'invention est particulièrement adapté pour une utilisation unitaire ou combinée à une série de tests biochimiques de façon à donner lieu à un dispositif
25 d'identification en gamme API® ou système Vitek®. Actuellement l'identification de *L. monocytogenes* sur galerie API ou système Vitek utilise un profil réactionnel établi par la concaténation des réponses positives ou négatives de plusieurs tests biochimiques unitaires. Le test selon l'invention peut avantageusement être intégré à de tels dispositifs de façon à réduire le nombre de tests.

L'invention concerne également un procédé d'identification de *Listeria monocytogenes*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) disposer d'un milieu réactionnel pour détecter le genre *Listeria*,
- b) ensemercer le milieu avec un échantillon biologique à tester,
- 5 c) laisser incuber
- d) révéler la présence du genre *Listeria*
- e) confirmer la présence de *L. monocytogenes* par un test biochimique selon l'invention, comprenant un substrat de phosphatidyl inositol phospholipase C (PIPLC) et au moins un substrat de alpha mannosidase, tel que défini
10 précédemment.

L'ensemencement des microorganismes peut être réalisé par toutes les techniques d'ensemencement connues de l'homme du métier. Une étape d'incubation peut être réalisée à une température pour laquelle l'activité enzymatique que l'on souhaite détecter est optimale, que l'homme du métier peut choisir aisément selon l'activité enzymatique à
15 détecter. L'étape d) peut s'effectuer par un examen visuel, par colorimétrie ou fluorimétrie.

Pour détecter le genre *Listeria*, on peut citer notamment le milieu OAA (bioMérieux, ref 43641) qui permet la détection des espèces du genre *Listeria* par coloration bleu des colonies (activité bêta-glucosidase).

20

L'invention concerne également un procédé d'identification de *Listeria monocytogenes*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) disposer d'un test biochimique ou d'une combinaison de test biochimiques pour détecter le genre *Listeria*,
- 25 b) révéler la présence du genre *Listeria*
- c) confirmer la présence de *L. monocytogenes* par un test biochimique selon l'invention, comprenant un substrat de phosphatidyl inositol phospholipase C (PIPLC) et au moins un substrat de alpha mannosidase, tel que défini précédemment.

Pour détecter le genre *Listeria*, on peut citer notamment la morphologie et la réaction de Gram auxquels on associe couramment le test à l'esculine, la catalase et des tests de fermentation de sucres tels Xylose, Rhamnose, mannitol, ribose, α Methyl D mannoside.

- 5 Les exemples ci dessous sont donnés à titre explicatif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

Exemple 1

A) Test biochimique selon l'invention

- 10 Un test biochimique selon l'invention, comprend les éléments suivants en g/l :

Tampon Tris	37,5
Extrait de peptone	2,5
extrait de levure	0,25
alpha- glycerophosphate de Mg	1,25

- 15 Serum Albumine bovine 7,5
 X- myo-inositol 1 phosphate 2
 4-nitrophenyl- α D- mannopyranoside 2,25

pH = 7 en final .

- 20 Après dépôt de 20 μ l de solution dans un support plastique, le test a été déshydraté à une température de 40°C pendant 24H.

Le test a été évalué pour l'obtention d'une réaction en 4 à 6H à 37°C +/-2°C après réhydratation avec 50 μ l d'eau déminéralisée et addition d'une colonie ou réhydraté avec 50 μ l d'une suspension bactérienne d'opacité équivalente à McF 0,5.

25

B) Lecture et interprétation du test

Après 4 et 6 H d'incubation du test à 37°C +/-1°C la coloration du test est lue et interprétée selon la grille suivante :

Coloration	interprétation	identification présomptive
incolore	négatif	<i>Listeria sp</i> *
jaune	négatif	

Bleu turquoise	négatif	
vert	positif	<i>L.monocytogenes</i>

C) Validation du test selon l'invention

Le test selon l'invention a été évalué, dans un premier temps à l'aide d'un inoculum de 0,5 McFarland, sur 90 souches pures du genre *Listeria* préalablement cultivées sur milieu OAA (Ref 43641). Les 6 espèces du genre *Listeria sp* se répartissaient de la façon suivante : *L. monocytogenes* (30 souches), *L. ivanovii* (20) (comprenant 10 souches des sous espèces *L. ivanovii spp londoniensis* et *L. ivanovii spp ivanovii*), *L. grayii* (10), *L. seeligeri* (10), *L. welshimeri* (10), *L. innocua* (10). Des 4H, 80% des souches de *L. monocytogenes* présentant un halo sur milieu OAA (25/25) ont révélées une coloration verte positive. Après 6H d'incubation toutes ces souches présentaient la couleur verte attendue. Après 24H la réaction est stable et le reste jusqu'à 72 heures d'incubation à 37±0,2°C. Aucune des 60 souches appartenant aux espèces autre que *L. monocytogenes* n'ont données une coloration verte. Le test présente donc une sensibilité de 100% en 6H et une spécificité de 100% au sein du genre *Listeria sp*.

Les performances du test selon l'invention ont également été évaluées pour un inoculum d'une colonie à partir de souches pures ou de souches issues de matrice alimentaires. Dans ce dernier cas les matrices ont été étudiées après pré enrichissement en bouillon Fraser ½ comme le recommande le protocole court AFNOR(BIO 12-14). Cette étape permet une revivification des souches bactériennes qui peuvent avoir subit un stress lié au traitement de la matrice.

Etude sur souches pures

Cinquante souches de *L. monocytogenes* cultivées 24H à 35°C ± 2°C sur milieu OAA ont été inoculées à raison d'une colonie dans le test biochimique selon l'invention réhydraté par 50µl d'eau stérile. Le test incubé à 35°C ±2 était positif en 4H pour 94% des souches qui présentaient une colonie caractéristique sur milieu OAA (colonie bleue avec halo). Après 6 heures toutes les souches de *L. monocytogenes* étaient détectées positives (verte) sur le test biochimique selon l'invention.

Etude sur matrice

La recherche de *L. monocytogenes* sur 22 matrices alimentaires a été réalisée en suivant le protocole court AFNOR (BIO 12-14) soit : 25g de matrice/stomacher , enrichissement en Fraser 1/2 (24H-30°C) , Après cette phase d'enrichissement 0,1 ml de bouillon Fraser 1/2 sont ensemencés sur milieu OAA. Le milieu est alors incubé 24H à 35± 2°C. Chacun
5 des milieux est vérifié et lorsque qu'une colonie caractéristique présumée *L. monocytogenes* (bleue avec halo) est observée, celle ci est prélevée pour inoculation du test selon l'invention. Celui ci est préalablement re-hydrater par 50µl de suspension medium (70 700) .

10 Parmi les 22 matrices testées, 11 présentaient une croissance bactérienne sur milieu OAA après 24H. Six presentaient des colonies caractéristiques de l'espèce *L. monocytogenes* (bleu avec halo).

Le test selon l'invention a confirmé l'appartenance des 6 souches présumées, à l'espèce *L. monocytogenes* en 4H. L'identification à l'espèce *L. monocytogenes* des 6 souches a
15 été confirmée par d'autres outils d'identification (galerie API Listeria, cartes Vitek GP et par séquençage 16S).

Les 5 autres matrices étaient contaminées par des *Listeria spp* autres que *L. monocytogenes* ou d'autres germes. Dans tous ces cas, le test selon l'invention mis en œuvre sur une colonie de chacune de ces matrices a donné une réponse négative.

20

Exemple 2

Le test selon l'invention a également été validé sur 250 souches pures testées avec la répartition suivante :

- *L. monocytogenes* 150 souches de sérotypes et d'origines variées.
- 25 • *Listeria sp* 50 souches : *L. grayi* 1, *L. innocua* 11, *L. ivanovii* 26 (dont *L. ivanovii spp ivanovii* 6, *L. ivanovii spp londoniensis* 7), *L. seeligeri* 5, *L. welshimeri* 7.
- Autres genres 50 souches: *Bacillus*, *Lactobacillus*, Staphylocoques, Enterocoques.

Les souches utilisées sont soit des souches de collections internationales soit des souches isolées de matrices alimentaires ou d'environnement. L'identification de ces souches à
30 été établie par le laboratoire antérieurement à l'étude, et est considérée comme

l'identification de référence. Les souches de *Listeria* ont été identifiées par galerie d'identification API Listeria.

Étude sur Souches pures

Les résultats obtenus sur souches pures sont présentés ci dessous.

	4h		6h		24h		72h (dont 48h TA)	
	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>L.monocytogenes</i>	148	2	149	1	149	1	149	1
<i>Listeria ivanovii</i>	0	NA	0	26	0	26	0	26
<i>Listeria</i> sp et autres genres	0	NA	0	36	0	36	0	36

5

A partir des géloses OAA incubées 24H à 37°C, 149 souches de *Listeria monocytogenes*, sur 150 testées, sont confirmées par le test selon l'invention dès 6h. Le prolongement de l'incubation jusqu'à 24h ne modifie pas le résultat.

Les 50 souches de *Listeria sp* se sont développées sur milieu OAA.

10 Seules les 26 souches de *L. ivanovii* ont présenté des colonies caractéristiques sur gélose OAA. La totalité de ces isolats testés par le test selon l'invention ont donné un résultat négatif en 6h et 24h.

15 Parmi les 50 souches autres genres testées, 12 se sont développées sur milieu OAA sans présenter de colonies caractéristiques. Le test selon l'invention réalisé sur ces isolats est négatif.

La lecture du test après 4h d'incubation permettait la détection de 148 isolats. Il est donc possible avec le test selon l'invention de rendre un résultat positif (vert) dès 4h. Un résultat négatif peut être rendu dès 6h. Les résultats étaient inchangés après 48h de culture en milieu OAA.

20

Des résultats comparables étaient obtenus sur milieux de culture autre que OAA (milieux TSA (trypcase soja agar et gélose au sang). Le test selon l'invention permettait la confirmation de la présence de *L monocytogenes* à 6h.

REVENDICATIONS

- 1) Test biochimique pour confirmer la présence de *L. monocytogenes* caractérisé en ce qu'il comprend au moins un substrat de phosphatidyl inositol phospholipase C (PIPLC) et au moins un substrat d'alpha mannosidase.
- 2) Test biochimique selon la revendication 1 selon lequel le substrat de PIPLC est un indolyl-phosphatidyl-myo-inositol.
- 3) Test biochimique selon la revendication 2 selon lequel l'indolyl-phosphatidyl-myo-inositol est le 5 bromo 4 chloro 3 indoxyl myoinositol phosphate.
- 4) Test biochimique selon la revendication 1 à 3 selon lequel la concentration en substrat de PI-PLC est comprise entre 5 et 0,1 g/l.
- 5) Test biochimique selon la revendication 1 à 4 selon lequel le substrat d'alpha mannosidase est un substrat de mannopyranosidase.
- 6) Test biochimique selon la revendication 5 selon lequel le substrat de mannopyranosidase est le p-nitrophenyl-mannopyranoside.
- 7) Test biochimique selon la revendication 1 à 6 selon lequel la concentration en substrat d' α mannosidase est comprise entre 2 et 0,1 g/l, préférentiellement entre 1 et 0,5 g/l.
- 8) Utilisation d'un test biochimique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour confirmer la présence de *L. monocytogenes*.
- 9) Procédé d'identification de *Listeria monocytogenes*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - a) disposer d'un milieu réactionnel pour détecter le genre *Listeria*,
 - b) ensemercer le milieu avec un échantillon biologique à tester,

- c) laisser incuber
- d) révéler la présence du genre *Listeria*
- e) confirmer la présence de *Listeria monocytogenes* par un test biochimique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10) Procédé d'identification de *Listeria monocytogenes*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- a) disposer d'un test biochimique ou d'une combinaison de test biochimiques pour détecter le genre *Listeria*,
- b) révéler la présence du genre *Listeria*,
- c) confirmer la présence de *Listeria monocytogenes* par un test biochimique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.