

PRÉVALENCE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LE LAIT CRU DE VACHE AU LIBAN NORD

Imad al Kassaa^{1,2}, Khaled el Omari^{2,3}, Marwa Saati¹, Bachar Ismail^{1,2} et Monzer Hamze^{1,2}

¹ Laboratoire de microbiologie santé et environnement (LMSE), centre AZM de biotechnologie, école doctorale de sciences et technologie, Université Libanaise, Tripoli, Liban

² Faculté de santé publique, section III, Université Libanaise, Tripoli, Liban

³ Laboratoire de qualité et de contrôle agroalimentaire, chambre de commerce, d'industrie et d'agriculture du Nord Liban, Tripoli, Liban
mhamze@monzerhamze.com

(Received 15 October 2015 - Accepted 25 January 2016)

RÉSUMÉ

Al Kassaa Imad, Khaled el Omari, Marwa Saati, Bachar Ismail et Monzer Hamze. 2016. Prévalence de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru de vache au Liban Nord. Lebanese Science Journal, 17(1): 37-43.

La listériose, bien qu'elle soit une zoonose, est une pathologie invasive qui peut affecter les nouveau-nés, les femmes enceintes ainsi les adultes immunodéprimés. Les manifestations cliniques se traduisent par des gastroentérites fébriles, des formes sévères invasives incluant les septicémies, méningites, rhombencéphalites, infections prénatales et avortements. Les espèces de Listeria sont des bactéries ubiquitaires, capables de s'adapter à l'environnement, chez l'animal et les aliments végétaux. Dans ce travail, notre objectif a été d'évaluer la présence de Listeria monocytogenes dans du lait cru collecté au Liban Nord. Au total, cent échantillons de lait de vache ont été analysés par la technique Grand VIDAS (Biomérieux France). Les résultats obtenus ont révélé l'absence de Listeria monocytogenes dans tous les échantillons analysés.

Mots-clés: *Listeria monocytogenes*, lait cru, Grand VIDAS

ABSTRACT

Al Kassaa Imad, Khaled el Omari, Marwa Saati, Bachar Ismail and Monzer Hamze. 2016. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk in north Lebanon. Lebanese Science Journal, 17(1): 37-43.

Listeriosis, although a zoonosis, is an invasive disease that can affect newborns, pregnant women and immunocompromised adults. Clinical manifestations can be expressed by febrile gastroenteritis, invasive forms including severe sepsis, meningitis, rhombencephalitis, prenatal infections and abortions. Species of Listeria bacteria are ubiquitous and adaptable to the environment in animal and plant foods. This study aimed to determine the prevalence of Listeria monocytogenes in 100 samples of fresh cow milk

collected from different areas of North Lebanon. *Listeria monocytogenes* was detected by using the Grand VIDAS technique (Biomérieux France). The results obtained revealed the absence of *Listeria monocytogenes* in all analyzed samples.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, raw milk, Grand VIDAS

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) est une bactérie que l'on trouve souvent dans l'environnement, en particulier dans le sol, la végétation, les aliments du bétail et les matières fécales des humains et des animaux. La transmission des listeria se fait fréquemment par la consommation des produits laitiers, en particulier les fromages au lait cru, certaines charcuteries, les produits de la mer et les végétaux (Liu, 2006).

La contamination de lait cru par le genre *Listeria* est reliée par l'absence des substances qui ont un effet anti-*Listeria* comme les bactériocines. La flore bovine contient une grande diversité de bactéries, parmi lesquelles on trouve des bactéries lactiques telles qu'*Enterococcus* spp. et *Lactococcus* spp. (Guerrieri *et al.*, 2009). Ces bactéries lactiques sont connues par la sécrétion des bactériocines anti-*Listeria* comme les entérocin A, nisine A et nisine Z (Guerrieri *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009). La production de bactériocine qui inhibe *L. monocytogenes*, est influencée par le pH du milieu (Choi *et al.*, 2000). Le maximum de production de la bactériocine nisin-like produite par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* A164 est observé à pH 6 (Bayoub *et al.*, 2006) ce qui correspond au pH du lait cru.

Des études récentes réalisées par des chercheurs de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont montré qu'en 2010, la listériose a infecté 23150 patients et le taux de mortalité était 23.59%, soit environ 5463 décès (Charline *et al.*, 2014). En 2013, la forme clinique la plus fréquente de la listériose en France était la bactériémie représentant 57% des formes cliniques, 27% des formes neuroméningées et 11% des formes materno-néonatales (Goulet, 2008).

Aux Etats-Unis, entre 2000 et 2008, une étude des maladies d'origine alimentaire estime que 600 cas de listériose se produisent chaque année, avec un taux de mortalité de 16% (environ 255 décès) (Scallan *et al.*, 2011).

Plusieurs méthodes de détection de *Listeria* spp. ont été mises en évidence, mais la culture conventionnelle reste une méthode de référence selon les normes internationales. Cependant, la culture prend beaucoup de temps entre 3 et 5 jours, pour cela des méthodes alternatives faciles, rapides ont été améliorées afin de mieux répondre aux besoins en réduisant le temps de détection. Parmi ces méthodes, la technique de Grand VIDAS a montré une spécificité et une sensibilité plus importante que les autres techniques basées sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Aurora *et al.*, 2009). Cette méthode immuno-enzymatique (VIDAS) est une méthode officielle de l'« Association of Official Analytical Chemists » (AOAC) « 999.06 » (AOAC, 2000) et elle a été validée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (Baylis, 2000).

Au Liban, il y a peu d'études portant sur la fréquence d'isolement de *L. monocytogenes* à partir du lait cru destiné à la consommation directe ou à l'industrie laitière. Le but de ce travail est de déterminer la prévalence de *L. monocytogenes* dans le lait cru

collecté au Nord Liban. La méthode utilisée dans cette étude est la méthode immunoenzymatique automatisée utilisant l'appareil Grand VIDAS (Biomérieux-France) (Figure 1).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Echantillonnage

Cent échantillons de lait cru ont été collectés des régions rurales au Liban Nord. Cinquante échantillons ont été collectés de la région de Dennieh et cinquante autres ont été collectés de celle de Akkar. Tous les échantillons sont d'origine bovine. Le lait a été prélevé aseptiquement à partir des quatre pis et collecté dans des tubes stériles et transporté directement au laboratoire dans des enceintes réfrigérées.

Enrichissement des échantillons

Au laboratoire, une étape d'enrichissement a été faite pour chaque échantillon suivie d'une détection par la technique « Grand VIDAS ». Brièvement, 25 ml de l'échantillon ont été mélangés avec 250 ml du réactif *L. monocytogenes* Xpress (Lmx) (Biomérieux, France) dans un sachet stérile. 0,5 ml du supplément Lmx (contenant des antibiotiques) ont été ajoutés au mélange qui est incubé pendant 24 h à 37° C.

Détection par l'appareil Grand VIDAS

Après incubation, 250 µl du mélange ont été mis dans une bandelette spécifique de l'appareil Grand VIDAS. Cette bandelette a été mise sur « heat and go » de l'appareil à 131 °C pendant 5 minutes. Ensuite, la bandelette a été placée sur la paillasse pendant 10 minutes. Après refroidissement, la bandelette a été déposée dans l'appareil pour l'analyse. Les résultats ont été obtenus après une heure par cette technique.



Figure 1. Appareil Grand VIDAS (Biomérieux-France).

Résultats et discussion

Les résultats obtenus étaient négatifs pour tous les échantillons analysés, donc la prévalence de *L. monocytogenes* dans les 100 échantillons collectés dans cette étude est de 0%.

Le lait est une matière première, il va ainsi être « transformé » en une grande diversité de produits avant d'être consommé. Aliment fragile, le lait peut être à tout moment être contaminé: traite, environnement, personnel, etc... .

Des études ont été réalisées dans d'autres pays concernant la présence de *L. monocytogenes* dans les produits laitiers. En Algérie la prévalence de *L. monocytogenes* varie de 1,9% à 3,2% (Bellouni, 1990; Lebres & Mouffok, 2000; Hamdi *et al.*, 2007). Dans d'autres pays comme la Turquie et la Corée, la prévalence était 6% (Vardar-Ünlü *et al.*, 1998), 2% pour le second (Ha *et al.*, 2002; Jemmi & Stephan, 2006). En Europe, la prévalence de listériose a augmenté 19% entre 2008 et 2009 (EFSA, 2011). Cette augmentation était principalement survenue chez les personnes de plus de 65 ans (58%) (Goulet *et al.*, 2008). En 2009, 73 cas ont été rapportés en Suède (SVA, The National Veterinary Institute, 2011). En Espagne, la prévalence était 2,9% en 2001 (Soriano *et al.*, 2001). En France, le taux d'incidence était estimé à cinq cas par million d'habitants en 2009 (Institut de veille sanitaire, 2009). Dans les autres pays, la prévalence de la listériose varie entre 6,5% aux Etats Unis (Van Kessel, 2004), 12 % au Canada, 13 % au Brésil (Jemmi & Stephan, 2006) et 2,2% en Iran (Moshtaghi & Mohamadpour, 2007).

Au Liban, Hilan et ses collaborateurs, ont montré que la prévalence de *L. monocytogenes* était 3% dans des fromages traditionnels libanais (Hilan *et al.*, 1998). Une autre étude réalisée en 2010, a montré une absence de *L. monocytogenes* dans les produits laitiers caprins collectés de différentes régions au Liban (Dib *et al.*, 2011). Harakeh et ses collaborateurs ont montré, en 2009, que la prévalence de *L. monocytogenes* était 18.65%. Cette étude a été réalisée sur 160 échantillons (45 échantillons de fromages Baladi, 36 échantillons de Chanklish et 83 de Kishk) collectés de la région de la Békaa (Harakeh *et al.*, 2009).

Malgré la validation AFNOR (Nr BIO-12/3-03/96) de la technique mini-VIDAS *Listeria* (AFNOR, 1996) pour la recherche de *L. monocytogenes*, des études ont montré la présence de faux-positifs. En effet, une étude menée par Vaz-Velho et ses collaborateurs en 2000, sur 295 échantillons de poissons, la technique VIDAS a donné 11 résultats faux-positifs (Vaz-Velho *et al.*, 2000). D'autre part, dans une étude réalisée par Bonardi et ses collaborateurs en 2001, les auteurs ont comparé la méthode d'analyse conventionnelle avec la méthode Mini-VIDAS pour la recherche de *L. monocytogenes* dans les produits alimentaires pour en évaluer la spécificité. Ils ont analysé 125 échantillons (45 saucisses de viande de porc, 30 fromages Mozzarella et 50 fromages Ricotta de vache). Les résultats ont montré une spécificité de 100% de la méthode mini-VIDAS pour les produits laitiers et de 63,2% pour les saucisses de viande de porc (Bonardi *et al.*, 2001). À noter que le Mini VIDAS et le Grand VIDAS ont le même principe avec une différence au niveau de la taille de la machine et le nombre d'échantillons analysés.

Des études effectuées en Italie et en Suisse ont montré des résultats négatifs (Ha *et al.*, 2002; Jemmi & Stephan, 2006). D'autre part, une étude réalisée au Liban sur cinquante échantillons de fromage Akkawi choisis au hasard dans la région Liban Nord et analysés par la technique Mini-VIDAS, a montré que parmi les cinquante échantillons, cinq étaient positifs (Dabboussi *et al.*, 2012). L'identification biochimique par la galerie RapID CB plus (Remel,

USA) a révélé l'absence de *L. monocytogenes* dans les échantillons positifs (Dabboussi *et al.*, 2012).

En outre, une étude a été réalisée par Dib et ses collaborateurs en 2008, sur la qualité chimique et microbiologique des fromages libanais. Cette étude a montré que le fromage Baladi a été le plus contaminé par *Salmonella* spp. et *Listeria* a également été retrouvée dans 10% des fromages Akkawi et 17% des fromages Double crème (Dib *et al.*, 2008).

L'absence de *L. monocytogenes* dans nos échantillons de lait cru analysés et dans ceux ayant des résultats similaires cités ci-dessus peut être due à des conditions défavorables pour sa colonisation et sa multiplication. Un ensilage bien acide conservé peut être un des facteurs qui explique l'absence de *L. monocytogenes* chez les bovins (Bemrah *et al.*, 1998). D'autre part, la présence des bactériocines a effet anti-*Listeria* et/ou l'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation des bovins sont deux éléments qui affectent la présence de *L. monocytogenes* dans le lait cru. La variation de prévalence entre les résultats obtenus dans les différentes études déjà mentionnées est due probablement à la variation des méthodes d'analyses utilisées, les sites d'échantillonnages, l'utilisation des antibiotiques dans certaines régions et le nombre d'échantillons analysés.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude ont montré l'absence de *L. monocytogenes* dans les échantillons de lait cru analysés. Ces résultats sont concordants avec certains résultats cités dans la littérature. La méthode utilisée est une méthode immuno-enzymatique automatisée « Grand VIDAS », c'est une méthode rapide, sensible et validée par l'AFNOR.

L'absence de *L. monocytogenes* dans les échantillons peut être due à la bonne santé des bovins sélectionnés, une alimentation contenant des antibiotiques, la présence de bactériocines secrétées par des bactéries lactiques appartenant à la flore intestinale des bovins, ou bien, du fait que les prélèvements ont été pris d'une façon aseptique ce qui a évité la contamination du lait par des listeria de l'environnement.

L'augmentation de la présence de *L. monocytogenes* dans les aliments et l'augmentation des sujets à risque posent un vrai problème de santé publique. Une surveillance régulière des produits alimentaires susceptibles, l'implantation d'un système HACCP et la certification dans les établissements alimentaires semblent être nécessaire pour assurer la qualité et la salubrité des aliments.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement la collaboration remarquable de Dr Rabah Outour lors de la collection des échantillons.

RÉFÉRENCES

AFNOR 1996. Validation (Nr BIO 12/3-03/96) du kit VIDAS. *Listeria monocytogenes* (BioMérieux), France.

- AOAC official method 999.06. 2000. *Listeria* in foods. enzyme-linked immunofluorescent assay (ELFA). VIDAS LIS assay screening method. Official methods of analysis of AOAC International.
- Aurora, R., Prakash, A., Prakash, S. 2009. Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from milk and ready-to-eat indigenous milk products. *Food Control*, 20: 835-839.
- Baylis, C. 2000. *The catalogue of rapid microbiological methods*. Fourth edition, Campden & Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden, Gloucestershire, UK.
- Bayoub, K., Elotmani, F., Assobhei, O., Jaoua S., Saucré, A. 2009. Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel «Raïb». *Congr  Intenational de Biochimie*, p. 417- 420.
- Bellouni, R. 1990. *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en médecine (DESM), INESSM – Alger, pp. 165.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M.H., Griffiths, M.W., Cerf, O. 1998. Quantitative risk assessment of human *Listeriosis* from consumption of soft cheese made from raw milk. *Preventive Veterinary Medicine*, 37: 129-145.
- Bonardi, S., Lucidi, L., Paris, A., Brindani, F. 2001. Utilization of VIDAS-LMO method for search of *Listeria monocytogenes* in meat and dairy products. *Annali della Facolt  di Medicina Veterinaria*, 21: 293-299.
- Charline, M.N., Brecht, D., Frederick, J.A., Geert, V., Haagsma, J., Kirk, M., Havelaar, A., Speybroeck, N. 2014. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, 14(11): 1073–1082.
- Chen, H., Neetoo, H., Ye, M., Joerger, R.D. 2009. Differences in pressure tolerance of *Listeria monocytogenes* are not correlated with other stress tolerances and are not based on differences in CtsR. *Food Microbiology*, 26: 404-408.
- Choi, H.J., Cheigh, C.I., Kim, S.B., Pyun, Y.R. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* sub sp lactis. A164 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 563-571.
- Dabboussi, F., El Omari, K., Mouzawak, M., Bayssari, C., Hamze, M. 2012. *Recherche de salmonella, Listeria et de bactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération dans du fromage Akkawi au nord du Liban*. Laboratoire de microbiologie: environnement et santé, centre Azm pour la recherche en biotechnologie et ses applications, EDST-UL, mémoire d'un master 2 recherche en microbiologie.
- Dib, H., Hajj Semaan, E., Noureddine, Z. 2008. Caractéristiques chimiques et microbiologiques des fromages libanais issus d'industries locales. *Lebanese Science Journal*, 9(2): 37-46.
- EFSA 2011. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2009. *EFSA Journal*, 9(3): 2090. (www.efsa.europa.eu)
- Goulet, V. 2008. La listériose de la femme enceinte et du nouveau-n  en France:  volution de 1984   2006. *Bulletin  pid miologique Hebdomadaire*, 14-15: 107-110.
- Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., de Valk, H. 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5): 734-740.
- Guerrieri, E., De Niederh usern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I., Bondi, M. 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a samll – scale model. *Food Control*, 20: 861- 865.

- Ha, K.S., Park, S.J., Seo, S.J., Park, J.H., Chung, D.H. 2002. Incidence and polymerase chain reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in Gyeongnam Province of Korea. *Journal of Food Protection*, 65: 111-115.
- Hamdi, T.M., Naïm, M., Martin, P., Jacquet, C. 2007. Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). *International Journal of Food Microbiology*, 116: 190-193.
- Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., Alwan, N. 2009. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Science of the Total Environment*, 407: 4022-4027.
- Hilan, C., Kobeissy, R., Fidawi, R., Haddad, M. 1998. Les *Listeria monocytogenes* dans les denrées alimentaires d'origine animale au Liban. *Annales de Recherche Scientifique*, 1: 233-242.
- Institut de veille sanitaire 2009. Nombre de listérioses déclarées par an et taux d'incidence annuel. (http://www.invs.sante.fr/surveillance/listeriose/cas_listeriose_1999_2009.pdf) Accessed 27th February 2011.
- Jemmi, T. and Stephan, R. 2006. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Revue Scientifique et Technique - Office international des épizooties*, 25: 571-580.
- Lebres, E.H.A., Mouffok, F. 2000. *Enquête de listériose en Algérie*. Recueil de la journée: Institut Pasteur d'Algérie face aux problèmes sanitaires de l'été, p. 11-22.
- Liu, D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 645-659.
- Moshtaghi, H. and Mohamadpour, A.A. 2007. Incidence of *Listeria* spp. in raw milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pathogen Diseases*, 4: 107-110.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 7-15.
- Soriano, J.M., Rico, H., Molto, J.C., Manes, J. 2001. *Listeria* species in raw and ready to eat foods from restaurants. *Journal of Foods Protection*, 64: 551-553.
- SVA 2011. *The national veterinary institute surveillance of zoonotic and other animal disease agents in Sweden 2010*. Report. www.sva.se (2011)
- Van Kessel, J.S., Karns, J.S., Gorski, L., McCluskey, B.J., Perdue, M.L. 2004. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *Journal of Dairy Science*, 87: 2822-2830.
- Varadar-Ünlü, G., Ünlü, M., Bakici, M.Z. 1998. Incidence of *Listeria* spp. from raw milk in Sivas. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 28: 389-392.
- Vaz-Velho, M., Duarte, G., Gibbs, P. 2000. Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 147-151.