



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

SUPPLÉMENT À LA MÉTHODE MFLP-28

1. APPLICATION

Les renseignements qui suivent sont présentés à titre de supplément à la méthode MFLP-28, datée de juin 2003, et devraient être utilisés avec cette méthode. Ce supplément vise à fournir des renseignements supplémentaires sur le temps d'incubation pour les produits laitiers et les autres d'aliments. Des formulations de milieux sont également incluses.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Note : Le superviseur du laboratoire doit s'assurer que l'analyse décrite dans la présente méthode est effectuée conformément à la norme internationale « ISO/IEC 17025:1999 (ou dernière révision) : Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ».

Note : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus aux températures recommandées. Lorsqu'une température de 35 °C est recommandée, l'incubateur peut être à 35 ± 1 °C. De même, des températures plus basses comme 30 ou 25 °C peuvent se situer à ± 1 °C. Toutefois, lorsque des températures plus élevées sont recommandées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à ± 0,5 °C de variation; des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

7. MARCHE À SUIVRE

7.1. Prélèvement et enrichissement des échantillons

| Type d'échantillon | Enrichissement primaire | Enrichissement secondaire |
|---------------------------------|---|--|
| Viande et volaille transformées | Peser 25 g d'échantillon dans un récipient stérile. Homogénéiser avec 225 ml de bouillon UVM. Incuber à 30 °C pendant 22 à 24 heures. | Après 22 à 24 heures, transférer 0,1 ml de l'échantillon enrichi dans 9,9 ml de MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures. |

| Type d'échantillon | Enrichissement primaire | Enrichissement secondaire |
|--|---|--|
| Produits de viande et de volaille crus | Peser 25 g d'échantillon dans un récipient stérile. Homogénéiser avec 225 ml de bouillon Demi Fraser. Incuber à 30 °C pendant 22 à 24 heures. | Après 22 à 24 heures, transférer 0,1 ml de l'échantillon enrichi dans 9,9 ml de MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures. |
| Produits laitiers | Peser 25 g d'échantillon dans un récipient stérile. Homogénéiser avec 225 ml de bouillon d'enrichissement sélectif complet. Incuber à 30 °C pendant 22 à 24 heures. | Après 22 à 24 heures, transférer 0,1 ml de l'échantillon enrichi dans 9,9 ml de MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures. |
| Fruits, légumes et produits de la mer | Peser 25 g d'échantillon dans un récipient stérile. Homogénéiser avec 225 ml de bouillon d'enrichissement. Incuber à 30 °C pendant 4 heures. Après 4 heures, ajouter les agents de sélection acriflavine, acide nalidixique et cycloheximide. Incuber à 30 °C pendant 22 à 26 heures. | Après 22 à 26 heures, transférer 0,1 ml de l'échantillon enrichi dans 9,9 ml de MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures. |
| Poisson fumé | Peser 25 g d'échantillon dans un récipient stérile. Homogénéiser avec 225 ml de bouillon de pré-enrichissement universel. Incuber à 30 °C pendant 22 à 26 heures. | Après 22 à 26 heures, transférer 0,1 ml de l'échantillon enrichi dans 9,9 ml de MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures. |
| Autres aliments | Peser 25 g d'échantillon dans un récipient stérile. Homogénéiser avec 225 ml de bouillon d'enrichissement. Incuber à 30 °C pendant 4 heures. Après 4 heures, ajouter les agents de sélection acriflavine, acide nalidixique et cycloheximide. Incuber à 30 °C pendant 22 à 26 heures. | Après 22 à 26 heures, transférer 0,1 ml de l'échantillon enrichi dans 9,9 ml de MOPS-BLEB. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures. |

9. PRÉPARATION DES MILIEUX

9.1 Bouillon d'enrichissement

| | |
|---|--------|
| Poudre du bouillon de tryptone soya | 30,0 g |
| Extrait de levure | 6,0 g |
| Phosphate de potassium | 1,35 g |
| Phosphate de disodium | 9,6 g |
| Eau distillée | 1,0 L |

Distribuer en volumes de 225 ml et stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Ajouter ensuite 2,5 ml de pyruvate de sodium 10 (p/v) stérilisé par filtration. Préparer les suppléments d'acriflavine et d'acide nalidixique sous forme de solutions mères de 0,5 % (p/v) dans de l'eau distillée. Préparer

le supplément de cycloximide sous forme de solution mère de 1,0 % (p/v) dans une solution 40 % (v/v) d'éthanol dans de l'eau. Ajouter les solutions mères : 0,45 ml d'acriflavine, 1,8 ml d'acide nalidixique et 1,15 ml de cycloheximide à 225 ml du bouillon d'enrichissement. Le pH final devrait se situer à $7,3 \pm 0,1$.

9.2 Bouillon d'enrichissement sélectif complet

| | |
|---|--------|
| Poudre du bouillon de tryptone soya | 30,0 g |
| Extrait de levure | 6,0 g |
| Eau distillée | 1,0 L |

Ajuster le pH à $7,3 \pm 0,1$. Distribuer 225 ml et stériliser à l'autoclave. Préparer les suppléments d'acriflavine et d'acide nalidixique sous forme de solutions mères de 0,5 % (p/v) dans de l'eau distillée. Préparer le supplément de cycloximide sous forme de solution mère de 1,0 % (p/v) dans une solution 40 % (v/v) d'éthanol dans de l'eau. Ajouter les solutions mères: 0,45 ml d'acriflavine, 1,8 ml d'acide nalidixique et 1,15 ml de cycloheximide à 225 ml du bouillon d'enrichissement.

9.3 Bouillon UVM

| | |
|---|---------|
| Protéose peptone | 5,0 g |
| Tryptone | 5,0 g |
| Poudre Lab Lemco (Oxoid) | 5,0 g |
| Extrait de levure | 5,0 g |
| Chlorure de sodium | 20,0 g |
| Phosphate de potassium | 1,35 g |
| Phosphate de sodium | 12,0 g |
| Esculine | 1,0 g |
| Acide nalidixique (2% dans du NaOH 0,1 M) | 1,0 ml |
| Acriflavine HCl | 12,0 mg |
| Eau distillée | 1,0 L |

Distribuer en volumes de 225 ml et stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

9.4 Bouillon demi-Fraser

| | |
|---|--------|
| Bouillon demi-Fraser (disponible commercialement par Difco) | 55,0 g |
| Eau distillée | 1,0 L |

Ajuster le pH à $7,2 \pm 0,2$. Distribuer en volumes de 225 ml et stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

9.5 Bouillon d'enrichissement Listeria tamponné au MOPS (MOPS-BLEB).

| | |
|--------------------------------|--------|
| Bouillon trypticase-soya | 30,0 g |
| Acide libre de MOPS | 6,7 g |
| Sel de sodium de MOPS | 10,5 g |
| Extrait de levure | 6,0 g |
| Eau distillée | 1,0 L |

Autoclaver pendant 15 minutes à 121 °C. Préparer des solutions mères 0,5 % (p/v) d'acriflavine et d'acide nalidixique dans de l'eau distillée. Préparer la cycloheximide sous forme de solution mère de 1% dans un mélange éthanol/eau distillée 40 % (v/v). Toutes les solutions mères sont stérilisées par filtration. Ajouter respectivement 3 ml, 8 ml et 5 ml des solutions mères d'acriflavine, d'acide nalidixique et de cycloheximide à un litre de bouillon d'enrichissement Listeria.

9.6 Bouillon de pré-enrichissement universel

| | |
|---------------------------------|--------|
| Tryptone | 5,0 g |
| Protéose peptone | 5,0 g |
| Phosphate de potassium | 15,0 g |
| Phosphate de sodium | 7,0 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Dextrose | 0,5 g |
| Sulfate de magnésium | 0,25 g |
| Citrate de fer ammoniacal | 0,1 g |
| Pyruvate de sodium | 0,2 g |
| Eau distillée | 1,0 L |

Chauffer les ingrédients tout en agitant doucement pour dissoudre, puis distribuer et autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH final devrait se situer à $6,3 \pm 0,2$.