



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**DÉTECTION DES *LISTERIA* SPP. DANS LES ALIMENTS ET LES
ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX À L'AIDE DU BOUILLON PALCAM**

Don Warburton, Ann Boville, Franco Pagotto, Elaine Daley et Cindy Chow
Divisions de l'évaluation et de la recherche
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments
Repère postal : 2204A1
DGPSA, Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable à la détection des *Listeria* spp viables dans les aliments et autres échantillons afin de déterminer s'il y a conformité avec les articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues.

2. DESCRIPTION

Il a été démontré que la méthode décrite ici donne des résultats satisfaisants avec les produits laitiers, les produits des œufs, les viandes, les produits de la mer, les légumes et les échantillons environnementaux contaminés naturellement. Cette méthode peut servir à détecter les *Listeria* dans d'autres aliments, dans les ingrédients alimentaires et dans les échantillons environnementaux.

3. PRINCIPE

Cette méthode permet de déterminer la présence de *L. monocytogenes* viables et d'autres espèces de *Listeria* dans le produit. Une portion du produit est d'abord enrichie dans un bouillon de pré-enrichissement et ensuite dans un bouillon d'enrichissement. Ce dernier estensemencé sur une gélose sélective spécifiée et sur une gélose additionnelle (qui peut être un nouveau milieu chromatogène) et ensuite incubé pendant une période donnée à une température déterminée. On suppose que les cellules viables de *L. monocytogenes* se multiplient dans ces conditions et forment des colonies visibles qu'il est possible d'identifier. Les résultats positifs présumés sont déterminés en 72 à 96 heures par ensemencement et en 52 à 72 heures lorsqu'on utilise des trousse de détection rapide (MFLP-51 et MFLP-71). Les épreuves biochimiques et sérologiques de confirmation sont réalisées sur des colonies purifiées. Des trousse de détection rapide peuvent également être utilisées.

4. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'Annexe A du volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'Annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux et les réactifs suivants (1 à 12) sont disponibles sur le marché et ils doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 et la référence 8.1 pour la formulation de chaque milieu.

NOTE: Si l'analyste utilise des variantes des milieux dont la liste figure dans la présente méthode (soit un produit disponible sur le marché ou fabriqué à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au superviseur du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 1) Enrichissement primaire – Bouillon Palcam (Merck)
- 2) Enrichissement secondaire – UVM 2 (Oxoid)
- 3) Gélose Oxford (OXA)

NOTE : La gélose Oxford pour l'isolement des *Listeria* utilise le cycloheximide comme agent sélectif. L'organisation qui détient le brevet sur cet antibiotique ne le produit plus et c'est pourquoi le cycloheximide ne sera plus disponible avant longtemps. Des fournisseurs de milieux, comme Oxoid, ont déjà produit des suppléments de remplacement pour leurs milieux. Il incombe toutefois aux utilisateurs de la présente méthode de s'assurer que leurs données de validation internes satisfont à leurs critères.

Une des géloses suivantes (numéros 4 à 7)

- 4) Milieu au chlorure de lithium, au phényléthanol et au moxalactame (LPM)
- 5) Gélose Oxford modifiée (MOX)
- 6) Gélose Palcam (PAL)
- 7) Milieux chromatogènes
Plaques Rapid L. mono (Bio Rad Laboratories)
Plaques ALOA (AES Laboratoire)
- 8) Gélose au sang de cheval (gélose au sang de mouton – facultatif)
- 9) Bouillon et gélose au tryptose (TB et TA) OU
Bouillon et gélose au trypticase-soja avec extrait de levure à 0,6 % (TSB-YE et TSA-YE)
- 10) Milieu pour l'épreuve de la motilité
- 11) Géloses ou bouillons de fermentation des glucides (mannitol, rhamnose et xylose). **Note :** Il est possible d'utiliser des trousse d'identification rapide pour effectuer ces analyses biochimiques (voir 7.7.1).
- 12) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 13) Microscope stéréoscopique (voir 7.5.2)
- 14) Cultures témoins (utiliser des souches ATCC ou l'équivalent)
- 15) Incubateurs capables de maintenir des températures de 30 °C et 35 °C

NOTE : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être réglé à 35 ± 1,0 °C. De même, les températures plus basses de 30 ou 25 °C peuvent être réglées à ± 1,0 °C près. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à ± 0,5 °C parce que des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

Facultatif

- 16) Trousses d'identification rapide comme les trousses Vitek ou API *Listeria* (Bio Mérieux Vitek, Inc.), Micro-ID *Listeria* (Organon Teknika Corp.) ou l'épreuve Accuprobe^{MD} pour *Listeria* (Gen-Probe; MFLP-88)
- 17) Trousses de dépistage rapide comme le Oxoid *Listeria* Rapid Test (trousse Clearview) (MFLP-71), la trousse VIDAS LIS (MFLP-51), ou l'équivalent
- 18) Solutions pour la coloration de Gram
- 19) Microscope optique
- 20) Peroxyde d'hydrogène à 3 % (catalase)
- 21) Produits biochimiques – dextrose, esculine, maltose, α-méthyl-D-mannoside
- 22) Disques de bêta-lysine (Remel)
- 23) Antisérums de *Listeria monocytogenes*

7. MARCHE À SUIVRE

On peut analyser individuellement chaque unité d'échantillonnage ou regrouper les unités d'analyse. Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder toutes les unités d'échantillonnage réfrigérées (0-5 °C) ou congelées, selon la nature du produit, à l'exception des unités provenant d'aliments stables à la température de la pièce. Faire décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou pendant une période et à une température qui empêchent les micro-organismes de se multiplier ou de mourir.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage aussitôt que possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Avoir à sa disposition du bouillon Palcam stérile.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail à l'aide d'un désinfectant approprié.

7.3 Préparation de l'échantillon

- 7.3.1 Pour s'assurer que l'unité d'analyse est vraiment représentative, agiter les liquides ou les substances fluides jusqu'à ce qu'elles soient homogènes. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, constituer l'unité d'analyse en prélevant des portions à plusieurs endroits. Afin de réduire la charge de travail, les unités d'analyse peuvent être regroupées pour l'analyse. Il est recommandé que l'échantillon composite ne contienne pas plus de cinq unités d'analyse.

7.3.2 Voir le tableau 4 pour l'unité d'analyse. Autrement, préparer une dilution 1:10 de l'aliment en ajoutant, dans des conditions aseptiques, 25 g ou ml (l'unité d'analyse) à 225 ml de bouillon Palcam. Passer au stomacher ou au mélangeur.

Pour les échantillons environnementaux, ajouter l'échantillon (écouvillon, éponge, etc.) à 100 ml de bouillon Palcam.

Note : Lorsqu'on analyse de plus gros volumes, le bouillon d'enrichissement devrait être pré-chauffé à 30-35 °C.

7.3.3 Incuber le mélange de pré-enrichissement et les témoins à 35 °C pendant 26 heures.

7.4 **Enrichissement secondaire**

Agiter le bouillon Palcam suffisamment pour le mélanger et laisser les grosses particules d'aliments se déposer. Transférer 1 ml du bouillon Palcam dans 9 ml d'UVM 2. Incuber à 30 °C pendant 26 à 48 heures.

7.4.1 **Réfrigération de cultures d'enrichissement secondaire (UVM 2) – FACULTATIF**

La réfrigération des cultures d'enrichissement secondaire (UVM 2) assure au laboratoire une productivité et une flexibilité analytique plus grandes. Les cultures UVM 2 obtenues le vendredi à partir d'échantillons analysés le jeudi précédent sont réfrigérées (4 à 10 °C) pendant la fin de semaine. Le lundi suivant, le contenu des cultures UVM 2 réfrigérées est remis en suspension et ensemencé sur des géloses. Procéder de la façon décrite en 7.4.2 et 7.5.

7.4.2 Trousses d'identification rapide

On peut utiliser des trousse d'identification rapide comme le Oxoid *Listeria* Rapid Test (trousse Clearview) (MFLP-71) ou la trousse Vidas LIS (MFLP-51), ou l'équivalent. Inoculer les trousse à partir de l'enrichissement secondaire en suivant les instructions du fabricant. Il faut confirmer les réactions positives par la méthode d'isolement ci-dessous.

7.5 **Méthode d'isolement**

7.5.1 Après avoir mélangé au vortex, ensemencer la culture UVM 2 sur deux milieux différents. Utiliser une gélose Oxford (OXA) et l'une des géloses suivantes : gélose au chlorure de lithium, au phényléthanol et au moxalactame (LPM), gélose Oxford modifiée (MOX), gélose PALCAM (PAL), ou une gélose chromatogène (voir 7.5.5). Incuber les géloses LPM à 30 °C pendant 24 à 48 heures et les géloses OXA, MOX et PAL à 35 °C pendant 24 à 48 heures.

7.5.2 **Géloses LPM** – Pour repérer les colonies suspectes sur les géloses LPM, examiner les boîtes au moyen d'un faisceau de lumière blanche orienté de manière à éclairer le fond de la boîte à un angle de 45 °C et assez puissant pour bien éclairer la boîte. Si la transillumination est optimale, les colonies de *Listeria* les plus isolées et les plus grosses (âgées de 48 heures) ont l'aspect de petites piles blanchâtres de verre concassé et présentent souvent des structures internes en mosaïque et, parfois, des reflets iridescents bleu-gris qui ont tendance à scintiller. Les colonies peuvent aussi être lisses et ourlées de bleu. Lorsque la croissance est presque confluyente, on peut observer un reflet bleu-gris iridescent et homogène.

7.5.3 **Géloses OXA et MOX** – Après 24 heures, *L. monocytogenes* forme des colonies noires d'un diamètre de 1 mm entourées d'un halo noir. Après 48 heures, les colonies noires ont de 2 à 3 mm de diamètre, sont entourées d'un halo noir et leur centre est affaissé. Les colonies peuvent aussi présenter une couleur brun-noir ou vert-noir. D'autres espèces de *Listeria* ont

un aspect semblable. Si l'on examine les boîtes moins de 24 heures après le début de l'incubation, on peut parfois déceler des colonies de *Listeria* spp. mais sans le noircissement caractéristique. Certaines souches de *Listeria*, autres que *L. monocytogenes*, sont inhibées par ce milieu lorsqu'il est incubé à 35 °C.

- 7.5.4 **Gélose PAL** – Les colonies de *L. monocytogenes* ont une coloration gris-vert et mesurent environ 2 mm de diamètre. Leur centre est noir et affaissé et elles sont entourées d'un halo noir sur fond rouge cerise. Certaines souches d'*Enterococcus* et de *Staphylococcus* forment des colonies grises entourées d'un halo brun-vert, ou des colonies jaunes entourées d'un halo jaune.
- 7.5.5 **Géloses chromatogènes** – On peut utiliser de nouvelles géloses chromatogènes et d'autres géloses d'isolement, mais de concert avec les milieux ci-dessus. Suivre les instructions du fabricant pour les préparer et les utiliser. Sur les géloses Rapid L.mono, *L. monocytogenes* forme des colonies bleues, tandis que la couleur des autres espèces de *Listeria* varie du jaune au blanc. Sur les géloses ALOA, les colonies de *L. monocytogenes* sont bleu-vert et entourées d'un halo, tandis que les autres espèces de *Listeria* sont bleu-vert sans halo.

7.6 Méthode d'identification – Confirmation

- 7.6.1 Si les colonies sont bien isolées sur les géloses sélectives : Prélever au moins cinq colonies caractéristiques de chaque gélose sélective et les déposer sur de la gélose au sang de cheval (comme en 7.6.2). Si les colonies ne sont PAS bien isolées sur les géloses sélectives : Prélever au moins cinq colonies caractéristiques de chaque gélose sélective et les déposer sur de la gélose au tryptose (TA) ou de la gélose trypticase-soja avec extrait de levure à 0,6 % (TSA-YE) en formant des stries pour la séparation. Incuber les géloses à 30 °C pendant 24 à 48 heures, ou jusqu'à ce que la croissance soit satisfaisante. Examiner les boîtes sous l'éclairage décrit en 7.5.2 pour déceler la présence des colonies caractéristiques.

CONSEIL PRATIQUE : Il est possible de confirmer la présence de *Listeria* et la spéciation de *L. monocytogenes* en utilisant la motilité, l'hémolyse et des géloses ou bouillons avec trois glucides (mannitol, rhamnose et xylose). Les autres épreuves biochimiques sont facultatives. Les trousseaux d'identification rapide peuvent aider à renforcer la confirmation de ces résultats et à distinguer les différentes espèces de *Listeria* (voir 7.7.1).

7.6.2 Hémolyse :

Quadriller le fond de boîtes de gélose au sang de cheval de façon à obtenir de 20 à 25 carrés. Prélever des colonies caractéristiques des géloses sélectives (si les colonies sont bien isolées) ou des géloses TA ou TSA-YE (si elles sont ensemencées de façon à assurer leur pureté) et ensemencer les géloses de sang de cheval en transférant par piqûre une colonie par carré.

Il faut toujours ensemencer par piqûre des témoins positifs et négatifs (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. innocua*). Incuber à 35 °C pendant 24 heures.

Note :	Ensemencer les géloses au sang, la gélose pour motilité (7.6.3) et les géloses aux glucides (7.6.4) simultanément à partir de la même colonie. Il faut s'assurer que chaque colonie est placée au même endroit dans tous les carrés des plaques.
---------------	--

Examiner par transillumination avec un éclairage intense les géloses au sang ensemencées par piqûre (tenir la gélose de telle façon que la lumière provient de l'arrière). *L. monocytogenes* produit une zone d'hémolyse légère au point de piqûre; *L. innocua* ne produit aucune zone d'hémolyse tandis que *L. ivanovii* produit une zone franche d'hémolyse. au point de piqûre.

7.6.3 Motilité :

Gélose : Ensemencer le milieu pour motilité à partir des géloses sélectives, TA ou TSA-YE. Incuber pendant 48 heures (jusqu'à sept jours) à la température de la pièce. Observer tous les jours. Seules les cellules de *Listeria* produisent une croissance typique en forme de parapluie.

et/ou

Montage humide : Prélever au moins une colonie caractéristique de chaque gélose sélective, TA ou TSA-YE, et procéder à un examen par montage humide en utilisant une solution physiologique à 0,85 % comme milieu de suspension et l'objectif à immersion d'huile d'un microscope à contraste de phase. Ou alternativement : Inoculer des bouillons de TSB-YE ou de TB et incuber à 30 °C jusqu'au lendemain. Transférer une anse des cultures dans un bouillon TSB-YE ou TB frais et incuber à 25 °C pendant 6 heures. Déposer une goutte de chaque culture de 6 heures sur une lame de verre et examiner la motilité typique de *Listeria* au moyen d'un objectif à immersion ou d'un microscope à contraste de phase. Les *Listeria* ressemblent à des bâtonnets fins, courts, qui bougent par culbute. Il faut toujours les comparer à une culture de *Listeria* connue. Les coques, les gros bâtonnets et les bâtonnets qui se déplacent rapidement par des mouvements natatoires ne sont pas des *Listeria*.

CONSEIL PRATIQUE : L'épreuve de la motilité peut donner un résultat plus certain lorsqu'on utilise la gélose.

7.6.4 Utilisation des glucides

Géloses : Quadriller le fond des boîtes de gélose aux glucides (mannitol, rhamnose et xylose) de façon à obtenir de 20 à 25 carrés. Prélever des colonies caractéristiques des géloses sélectives ou des géloses TA ou TSA-YE et ensemencer les géloses par piqûre en déposant une culture par carré. Il faut s'assurer que chaque colonie est placée au même endroit dans tous les carrés. Il faut toujours préparer des témoins positifs et négatifs (*L. ivanovii*, *L. monocytogenes* et *L. grayi*). Voir les conseils au tableau 1. Incuber à 35 °C pendant 24 heures. On peut aussi utiliser des bouillons aux glucides contenant 0,5 % de glucide dans une base de bouillon pourpre.

et/ou

Bouillons : Utiliser la culture TSB-YE pour ensemencer des bouillons pourpres additionnés de solutions de dextrose, d'esculine, de maltose, de mannitol, de rhamnose, d'α-méthyl-D-mannoside et de xylose à 0,5 %. Incuber à 35 °C pendant 7 jours. Examiner les milieux tous les jours. *Listeria* spp. acidifie le milieu sans dégagement de gaz ou ne produit aucune réaction. Consulter le tableau 1 pour les caractéristiques de fermentation des glucides des diverses espèces de *Listeria*. Toutes les espèces de *Listeria* devraient fermenter le dextrose, l'esculine et le maltose et toutes les espèces de *Listeria*, à l'exception de *L. grayi* et de *L. murrayi*, devraient être négatives pour le mannitol.

Note :	On peut aussi remplacer les bouillons et les géloses aux glucides par des trousses d'identification rapide (voir 7.7.1)
---------------	---

7.7 Méthode d'identification – Épreuves facultatives7.7.1 Trousses d'identification rapide

Trousses d'identification rapide comme Vitek ou API *Listeria* (Bio Mérieux Vitek, Inc.) Micro-ID *Listeria* (Organon Teknika Corp.) ou *Listeria* Accuprobe^{MD} (Gen-Probe). Suivre les instructions du fabricant.

7.7.2 Catalase

Soumettre une colonie caractéristique à une épreuve de dépistage de la catalase. Transférer une colonie sur une lame de verre propre et ajouter une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3 %. La formation de bulles indique une réaction positive. Les cellules de *Listeria* sont positives pour la catalase. Éviter de choisir des colonies de gélose contenant du sang, car elles peuvent produire un résultat faussement positif.

7.7.3 Coloration de Gram : *Listeria* est un petit bâtonnet Gram-positif.

7.7.4 Épreuve de CAMP : Sur une gélose au sang de mouton, étaler en stries verticales des isolats frais de *Staphylococcus aureus* et de *Rhodococcus equi* β -hémolytiques. Espacer les stries verticales de manière à pouvoir étaler les souches à l'étude en stries horizontales sans toucher aux stries verticales. Après 24 à 48 heures d'incubation à 35 °C, rechercher les zones d'hémolyse à proximité des stries verticales.

7.7.4.1 L'hémolyse de *L. monocytogenes* et de *L. seeligeri* est plus prononcée à proximité de la strie de *Staphylococcus* et l'hémolyse de *L. ivanovii* est plus prononcée à proximité de la strie de *Rhodococcus*. Les autres espèces de *Listeria* sont négatives à l'épreuve de CAMP. L'épreuve permet de distinguer *L. ivanovii* de *L. seeligeri* et aussi de distinguer une souche de *L. seeligeri* faiblement hémolytique de *L. welshimeri*.

7.7.4.2 On peut également réaliser l'épreuve de CAMP au moyen de disques stériles de β -lysine vendus dans le commerce et qui renferment le facteur *S. aureus*. Déposer un disque de β -lysine au centre d'une gélose au sang de mouton et ensemercer la gélose en stries radiales au moyen de 4 ou 5 cultures de *Listeria* sans toucher le disque avec l'inoculum. Après 18 à 24 heures d'incubation à 35 °C, on peut observer une réaction très nette entre le disque et les cultures de *L. monocytogenes* ou de *L. seeligeri*. *L. ivanovii* est fortement hémolytique et produit une zone claire de β -hémolyse le long de toute la strie.

7.7.5 Sérologie : Suivre les instructions du fabricant fournies avec les antisérums.

7.8 Interprétation des résultats – Identification de l'espèce

Les espèces de *Listeria* se présentent sous la forme de petits bâtonnets mobiles Gram-positifs, catalase-positives, uréase-négatives et elles acidifient la pente et le culot du milieu TSI sans dégagement de H₂S. Les *Listeria* fermentent le dextrose, l'esculine et le maltose. Certaines espèces fermentent également le mannitol, le rhamnose et le xylose et acidifient les milieux. Toutes les espèces montrent une réaction ++ dans le bouillon RM-VP. *L. grayi* et *L. murrayi* sont les deux seules espèces à fermenter le mannitol et *L. murrayi*, la seule espèce à réduire les NO₃⁻ en NO₂⁻.

L. monocytogenes, *L. ivanovii* et *L. seeligeri* (faiblement) hémolysent les géloses au sang de cheval ou au sang de mouton. Les trois espèces donnent une réaction positive à l'épreuve de CAMP. *L. monocytogenes* est la seule des trois espèces qui ne fermente pas le xylose mais fermente le rhamnose. L'épreuve de CAMP permet de distinguer *L. ivanovii* de *L. seeligeri*, puisque *L. seeligeri* produit une zone d'hémolyse prononcée uniquement à proximité de la strie de *Staphylococcus* et que *L. ivanovii* produit une zone d'hémolyse prononcée à proximité de la strie de *R. equi*.

L. innocua se différencie de *L. monocytogenes* uniquement par son incapacité à hémolyser la gélose au sang et par une épreuve de CAMP négative. Si l'on ne procède pas à l'épreuve de CAMP, on risque de confondre *L. welshimeri*, qui est rhamnose-négatif, et *L. seeligeri*, qui est faiblement hémolytique.

On trouvera dans les tableaux ci-joints un sommaire des caractéristiques biochimiques et sérologiques, ainsi que de la pathogénicité des différentes espèces de *Listeria*. Il faut recueillir toutes les données avant de déterminer les espèces.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Deuxième édition. L.C. Parks (éditeur). CRC Press Inc.
- 8.2 Seeliger, H.P.R. et D. Jones. 1986. The Genus *Listeria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1235-1245.

Tableau 1
Caractéristiques distinctives des espèces du genre *Listeria*^a

Caractéristiques	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>
Coloration de Gram	+ ^b	+	+	+	+	+	+
β-hémolyse	+ ^c	-	+	-	+ ^d	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+
L-rhamnose	+	d	-	d	-	-	d
D-xylose	-	-	+	+	+	-	-
Épreuve de CAMP (<i>S. aureus</i>)	+ ^e	-	+	-	-	-	-
Épreuve de CAMP (<i>R. Equi</i>)	-	-	-	-	+	-	-
Acidification de :							
L-arabinose	-	-			-	-	-
Dextrine	d	-			-	+	+
Galactose	d	-			d	+	+
Glycogène	-	-			-	-	-
Lactose	d	+			+	+	+
D-Xylose	-	-			-	+	+
Mélézitose	d	d			d	-	-
Mélbiose	-	-			-	-	-
alpha-D-glucopyranoside de méthyle	+	+			+	+	+
alpha-D-mannoside de méthyle	+	+	- ^f	+	-		
Sorbitol	d	-			-	+	+
Amidon soluble	-	-			-	-	-
Sucrose	-	d			d	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+		
Hydrolyse de :							
Cellulose	-	-			-	-	-
Hippurate	+	+			+	-	-
Amidon	d	d			-	-	-
Lécithinase	d	d			+	-	-
Phosphatase	+	+			+	+	+
Réduction des NO ₃ en NO ₂	-	-			-	-	+
Pathogénicité pour la souris	+	-	-	-	+	-	-

^a Adapté d'après la référence 8.2.

^b Symboles standard : (+) positif; (-) négatif. + : 90 % et plus de positifs; - : 90 % et plus de négatifs; d : de 11 à 89 % des souches sont positives.

^c Les souches de *L. monocytogenes* ne sont pas toutes bêta-hémolytiques – la souche ATCC 15313 n'hémolyse pas le sang de cheval, de mouton ou de bœuf.

^d Les souches de *L. ivanovii* présentent habituellement une zone d'hémolyse très large ou des zones multiples d'hémolyse.

^e Sur 30 souches étudiées, seule la souche type ATCC 15313 n'a pas donné de réaction positive.

^f Sur 10 souches étudiées, une seule a donné une réaction positive.

Tableau 2

Sérologie, activité hémolytique et virulence pour
la souris de différentes espèces de *Listeria*

Espèce	Sérotype	Hémolyse par piqûre sur sang de cheval (7 %)	Virulence pour la souris
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4b(x), 4c, 4d, 4e, 7	+	+
<i>L. ivanovii</i>	5	+	+
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, un*	–	–
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b	–	–
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, un*	+	–

* un = non définie

Tableau 3

Réactions de différentes espèces de *Listeria* à l'épreuve de CAMP

Espèce	réaction hémolytique	
	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	–
<i>L. ivanovii</i>	–	+
<i>L. innocua</i>	–	–
<i>L. welshimeri</i>	–	–
<i>L. seeligeri</i>	+	–

Tableau 4

**Plan d'échantillonnage pour la recherche de *L. monocytogenes*
dans les aliments prêts à manger¹ (PAM)**

	Aliment	Échantillonnage	Analyse	Type d'analyse
1.	Les aliments PAM incriminés dans des cas de listériose (cette liste inclut actuellement les fromages à pâte molle, le pâté de foie, le mélange pour salade de chou ayant une durée de conservation de plus de 10 jours, la langue de porc en gelée ²)	5 unités d'échantillonnage (100 g ou 100 ml chacune) prélevées au hasard dans chaque lot.	unités d'analyse ⁴ de 5 x 10 g ou de 2 x 25 g analysées séparément ou comme échantillon composite.	ENRICHISSEMENT SEULEMENT
2.	Tous les autres aliments PAM supportant la croissance de LM qui ont une durée de conservation sous réfrigération de plus de 10 jours (p. ex., viandes emballées sous vide, sandwichs emballés sous atmosphère modifiée, produits de la mer cuits, salades emballées, sauces réfrigérées)	5 unités d'échantillonnage (100 g ou 100 ml chacune) prélevées au hasard dans chaque lot.	unités d'analyse ⁴ de 5 x 5 g analysées séparément ou comme échantillon composite.	ENRICHISSEMENT SEULEMENT
3.	Autres aliments PAM favorisant la croissance de LM et qui ont une durée de conservation sous réfrigération de ≤ 10 jours et tous les aliments qui ne permettent pas la croissance ³ (p. ex., produits de la mer cuits, salades emballées, crème glacée, fromage à pâte dure, salami sec, poisson salé, céréales pour petit déjeuner et autres produits céréaliers)	5 unités d'échantillonnage (100 g ou 100 ml chacune) prélevées au hasard dans le lot.	unités d'analyse ⁴ de 5 x 10 g analysées séparément. Lorsqu'il faut enrichir ⁴ , on analyse 5x5 g unités d'analyse ⁵ séparément ou comme échantillon composite.	ENSEMENCEMENT DIRECT ENRICHISSEMENT

¹ On trouvera une définition des aliments PAM dans la dernière version du guide d'application de la réglementation intitulé Aliments prêts à manger contaminés par *L. monocytogenes*.

² Pour le moment, ce produit ne se retrouve pas couramment sur le marché canadien.

³ Les aliments prêts à manger qui ne permettent pas la croissance de LM incluent ceux qui répondent aux critères suivants :
a) pH 5,0 - 5,5 et $a_w < 0,95$

- b) $\text{pH} < 5,0$ peu importe l' a_w
- c) $a_w \leq 0,92$ peu importe le pH
- d) aliments congelés

Il faut mesurer le pH et l' a_w de 3 des 5 unités d'analyse. On considère que l'aliment supporte la croissance de *L. monocytogenes* si au moins une des unités d'analyse a une valeur de pH et d' a_w qui se situe dans l'échelle de valeurs permettant la croissance de cet organisme.

4 Il faut prélever l'unité d'analyse désignée de chaque unité d'échantillonnage.

5 Pour les aliments de la catégorie 3, si les bonnes pratiques de fabrication (BPF) sont inadéquates et si l'on a détecté la présence de *L. monocytogenes* dans les aires de manutention du produit fini, ou lorsqu'il est impossible d'examiner les BPF, on peut analyser les aliments en suivant les méthodes MFLP-74 (Dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans les aliments) et MFHPB-30, selon le cas.

Figure 1**Schéma de la méthode d'isolement**

Passer au mélangeur ou au stomacher dans le bouillon Palcam
Incuber à 35 °C pendant 26 h



À 24 h, transférer 1,0 ml du
bouillon Palcam dans 9 ml d'UVM 2. Incuber à 30 °C pendant 26 - 48 h



Ensemencer l'UVM 2 sur des géloses sélectives.
Incuber les géloses pendant 24-48 h



Tests de confirmation

motilité,
hémolyse,
mannitol, rhamnose et xylose;
autres épreuves biochimiques, ou
trousses d'identification rapide,
selon le cas.