



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉNOMBREMENT DES ESPÈCES *LISTERIA* DANS LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX AU MOYEN DES PLAQUES DE NUMÉRATION DES BACTÉRIES *LISTERIA* PRÉSENTES DANS L'ENVIRONNEMENT PETRIFILM^{MC} 3M^{MC}

**le Comité des méthodes microbiologiques
Division de l'évaluation
Bureau des dangers microbiens
Direction des aliments
Repère postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

Courriel: Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique au dénombrement des bactéries *Listeria* dans les échantillons environnementaux.

2. PRINCIPE

Les plaques Petrifilm 3M sont des produits prêts à utiliser mis au point par la Compagnie 3M, St. Paul, MN 55144-1000 (USA). Les pellicules sont recouvertes de milieux de culture; il n'est donc pas nécessaire de préparer les milieux, ce qui permet de réaliser des économies en main-d'œuvre et en temps. Les espèces *Listeria* peuvent être dénombrées au moyen des plaques de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M. Cette méthode consiste en un milieu de culture prêt à l'échantillonnage qui contient des agents sélectifs, des nutriments, un agent gélifiant soluble à l'eau froide et un indicateur chromogène facilitant la détection des colonies de bactéries *Listeria*. La plaque de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M a été conçue pour analyser les échantillons environnementaux et favoriser une surveillance plus efficace de l'assainissement des usines. La présence d'un indicateur *Listeria* tel que *Listeria innocua* démontre que les conditions environnementales sont propices à la prévalence de *Listeria monocytogenes*. Les plaques de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M permettent de détecter la majorité des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement, qui comprennent les bactéries *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Listeria welshimeri*.

Les échantillons sont prélevés à l'aide d'une éponge ou d'un écouvillon; on ajoute de l'eau peptonée tamponnée comme bouillon de reconstitution et on étale 3 ml d'échantillon directement sur la plaque sur une zone de croissance de 42 cm². Après avoir laissé l'agent gélifiant se solidifier, les plaques sont incubées et dénombrées. Des colonies rouge violacé foncé indiquent la présence de bactéries

Listeria. Avant la fin de la période d'incubation de 30 heures, si les colonies présentes ne sont pas rouge violacé foncé (par exemple, si elles sont grises ou rose pâle, comme dans le Guide d'interprétation), poursuivre l'incubation jusqu'à 30 heures. Les colonies qui demeurent grises ou rose pâle après la période maximale d'incubation, soit 30 heures, ne doivent pas être interprétées comme des bactéries *Listeria*; le test est terminé. Selon les études réalisées par l'Université du Vermont, les Laboratoires Silliker ainsi que 3M, la méthode des plaques de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M est comparable aux méthodes de référence.

3. DÉFINITION DES TERMES

- 3.1 Voir l'annexe A du volume 3.
- 3.2 La plaque de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M est un milieu de culture prêt à l'échantillonnage qui contient des agents sélectifs, des nutriments, un agent gélifiant soluble dans l'eau froide et un indicateur chromogène facilitant la détection de colonies de bactéries *Listeria*.

Remarque: Ne pas utiliser de bouillon d'enrichissement avec la méthode des plaques de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M.

- 3.3 Des colonies rouge violacé foncé indiquent la présence de bactéries *Listeria*. Avant la fin de la période d'incubation de 30 heures, si les colonies présentes ne sont pas rouge violacé foncé (par exemple, si elles sont grises ou rose pâle, comme dans le Guide d'interprétation), poursuivre l'incubation jusqu'à 30 heures. Les colonies qui demeurent grises ou rose pâle après la période maximale d'incubation, soit 30 heures, ne doivent pas être interprétées comme des bactéries *Listeria*; le test est terminé.
- 3.4 L'étaleur en plastique fourni avec les plaques de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M est conçu pour étaler l'échantillon ou un inoculum d'échantillon dans la zone de croissance de la plaque. La zone de croissance circulaire des plaques inoculées contient 42 carrés d'un centimètre Otracés sur la base de la pellicule.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

On peut se procurer les articles énumérés aux points 5.1 à 5.4 auprès de 3M Canada, inc., C.P. 5757, London (Ontario) N6A 4T1. Les milieux énumérés au point 5.5 sont disponibles sur le marché et doivent être préparés et stérilisés conformément aux instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 pour la formulation des milieux individuels.

Remarque : Si l'analyste utilise toute variation des milieux énumérés dans le présent document (produit disponible sur le marché ou préparé à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au surveillant du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 5.1 Plaques de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M 6447/6448 (Entreposer à une température de 8 °C ou moins.)
- 5.2 Étaleur en plastique, numéro de catalogue 6498.
- 5.3 Feuillet d'instruction, incluant le mode d'emploi.
- 5.4 Un « Guide d'interprétation » est fourni sur demande.
- 5.5 Diluants stériles appropriés : bouillon de culture « Lethen » ou un diluant neutralisant si des agents assainissants sont présents. Sinon, l'agent humidifiant doit être de l'eau stérile ou de

l'eau peptonée. On doit utiliser de l'eau peptonée (voir l'étape de reconstitution) comme bouillon de reconstitution.

5.6 Stomacher, mélangeur ou l'équivalent.

5.7 Incubateur pouvant maintenir une température de 35 °C ou de 37 °C.

Remarque: Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsque la température recommandée dans le texte de la méthode est de 35 °C, l'incubateur peut être à 35 °C +/-1,0 °C.

5.8 Pipettes ou pipettes automatiques ayant une capacité nominale de 1 à 5 ml.

5.9 Compteur de colonies ou loupe lumineuse.

6. PROCÉDURE

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités d'échantillonnage peuvent être regroupées lorsque les exigences du plan d'échantillonnage peuvent être rencontrées.

6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

6.1.1 Les échantillons prélevés à l'aide d'une éponge ou d'un écouvillon doivent être soumis immédiatement aux étapes de reconstitution et de mise en culture.

6.1.2 Si les échantillons environnementaux ne peuvent être traités immédiatement, on peut les conserver au réfrigérateur (4 à 8 °C) durant 24 heures maximum avant la reconstitution et la mise en culture sur les plaques de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M sans qu'il y ait des conséquences significatives sur le nombre; l'évaluation quantitative des bactéries *Listeria* reste possible.

Mettre l'écouvillon ou l'éponge dans un contenant stérile et le conserver au réfrigérateur (4 à 8 °C) pendant 24 heures maximum.

Procéder ensuite à l'étape de reconstitution.

Exécuter ensuite les étapes de mise en culture et d'incubation.

6.2 Préparation pour l'analyse

6.2.1 Avoir en main le diluant et le bouillon de reconstitution. Désinfecter la surface de travail.

6.2.2 Placer la plaque de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M sur une surface plane. Inscrire l'information relative à l'identification de l'échantillon sur la pellicule.

6.2.3 Avoir à sa disposition une éponge ou un écouvillon stérile. Inscrire sur une étiquette l'information relative à l'identification de l'échantillon et l'apposer sur le dispositif de prélèvement.

6.3 Préparation de l'échantillon

6.3.1 Afin d'assurer une unité d'analyse représentative, mélanger les liquides jusqu'à ce que le contenu soit homogène.

6.3.2 Prélever des échantillons environnementaux à l'aide d'un écouvillon rapide 3MMC ou l'équivalent, d'une éponge ou d'un autre dispositif de prélèvement humide.

6.3.3 Ajouter de manière aseptique à l'échantillon prélevé 2 ml (écouvillon) ou 5 ml (éponge) d'eau

peptonée tamponnée stérile (bouillon de reconstitution) à une température de 20 à 30 °C (68 à 86 °F). Ne pas utiliser de bouillon d'enrichissement sur cette plaque.

- 6.3.4 Mélanger, agiter ou faire tourbillonner vigoureusement l'échantillon prélevé dans de l'eau peptonée tamponnée pendant environ une minute.
- 6.3.5 Laisser reposer l'échantillon à la température ambiante (20 à 30 °C/68 à 86 °F) pendant une heure à une heure et demie maximum. Mélanger vigoureusement de nouveau. Cette étape est nécessaire à la reconstitution des bactéries *Listeria* endommagées.
- 6.4 Inoculation et incubation
 - 6.4.1 Relever la pellicule du dessus et inoculer avec précaution 3 ml d'échantillon au centre de la pellicule du dessous.
 - 6.4.2 Remettre la pellicule du dessus en place.
 - 6.4.3 Distribuer l'échantillon de façon égale en appliquant doucement l'étaleur en plastique sur la pellicule recouvrant l'inoculum. Ne pas appuyer, tourner ni faire glisser le diffuseur sur la pellicule. (Si l'inoculum se répand naturellement, il n'est pas nécessaire d'utiliser l'étaleur).
 - 6.4.4 Laisser reposer la plaque pendant au moins 10 minutes afin que le gel puisse se solidifier.
 - 6.4.5 Incuber les plaques à l'horizontale, le côté clair sur le dessus, en piles d'au plus 10 plaques pendant 28 heures ± 2 heures. Suivre les normes en vigueur relativement à la température d'incubation, par exemple : 35 °C ou 37 °C.
 - 6.4.6 Replacer les plaques inutilisées dans le sachet métallique. Replier l'extrémité ouverte du sachet et sceller avec du ruban adhésif. Entreposer le sachet refermé dans un endroit sec et frais. Une fois le sachet ouvert, le délai d'utilisation des plaques est d'un mois. L'exposition des plaques Petrifilm 3M à des températures supérieures à 25 °C et/ou à des conditions d'humidité relative de plus de 50 % peut réduire l'efficacité des plaques. Ne pas utiliser les plaques qui présentent une décoloration orange ou brune. Chaque paquet de plaques Petrifilm 3M porte la date de péremption et le numéro de lot. Le numéro de lot figure aussi sur chaque pellicule.
 - 6.4.7 Observer les couleurs des colonies. S'il n'y a aucune colonie ou si les seules colonies présentes sont rouge violacé après 28 heures ± 2 heures, dénombrer les colonies rouge violacé comme des *Listeria*; le test est terminé. Ne pas dépasser 30 heures. Une incubation plus longue que la durée recommandée peut donner des résultats ambigus.
 - 6.4.8 Si des colonies de couleur apparaissent autour des colonies rouge violacé après 30 heures d'incubation, ne pas les dénombrer comme des bactéries *Listeria*.

Remarque: Ne pas dénombrer les colonies sur la barrière de mousse car elles sont soustraites à l'influence sélective du milieu.
--

- 6.5 Lecture des résultats
 - 6.5.1 Effectuer le dénombrement rapidement après la période d'incubation. Au besoin, c'est-à-dire seulement si le dénombrement ne peut pas être fait immédiatement, entreposer les plaques dans le congélateur. Il faut toutefois éviter d'en prendre l'habitude.
 - 6.5.2 Utiliser un compteur de colonies standard pour le dénombrement; au besoin, une loupe lumineuse peut être utilisée pour faciliter le dénombrement.
 - 6.5.3 La zone de croissance circulaire est d'environ 42 cm². Il est possible d'établir des estimations des plaques qui contiennent un grand nombre de bactéries *Listeria* en déterminant le nombre moyen de colonies de quelques carrés représentatifs et en multipliant

le résultat par 42 pour obtenir le total de chaque plaque.

6.5.4 Pour déterminer la quantité de bactéries *Listeria* par surface échantillonnée, consigner:

- 1) les dimensions de la surface échantillonnée
- 2) la quantité de liquide d'hydratation se trouvant dans le dispositif d'échantillonnage
- 3) la quantité d'eau peptonée ajoutée
- 4) la quantité d'échantillon mis en culture (3 ml par plaque)
- 5) le nombre de colonies dénombrées

$$\text{UFC/surface} = (\text{nombre de colonies} \times [\text{quantité (ml) de liquide d'hydratation} + \text{quantité (ml) d'eau peptonée tamponnée}] \div 3 \text{ ml}) \div \text{dimensions de la surface échantillonnée.}$$

6.5.5 Afin d'isoler des colonies pour identification plus poussée, relever la pellicule du dessus et prélever la colonie sur le gel.

6.6 Interprétation et résultats

6.6.1 Les colonies de *Listeria* seront rouge violacé après 30 heures.

6.6.2 Si des colonies de couleur apparaissent autour des colonies rouge violacé, ne pas les dénombrer comme des bactéries *Listeria*.

6.6.3 Il y a trois façons d'interpréter les résultats des plaques de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M : l'interprétation quantitative, semi-quantitative et qualitative.

6.6.4 Lorsque les colonies sont présentes en quantités importantes, elles peuvent former un grand nombre de petites colonies non distinctes et/ou une couleur rose-brune sur toute la plaque de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement Petrifilm 3M. Il faut alors indiquer que les colonies sont « trop nombreuses pour être dénombrées ».

6.7. Confirmation

Suivre les méthodes MFHPB-07 ou MFHPB-30 pour confirmer les colonies.

7. RÉFÉRENCES

- 7.1 McNamara, A. M., B. Kupski and C. Zook. 2005. Evaluation of 3M Petrifilm Environmental *Listeria* Plate method for detection and enumeration of *Listeria Monocytogenes* compared to the USDA-MPN and the VIDA® LIS methods. Étude présentée au Symposium sur la microbiologie de l'Université de Wisconsin-River Falls en 2005.
- 7.2 Groves, E., and C.W. Donnelly. 2005. Comparison of 3M Petrifilm Environmental *Listeria* Plate vs. Standard Methods in Detecting *Listeria* from Environmental Surfaces. Étude présentée par l'Université du Vermont à la conférence annuelle du International Association for Food Protection (IAFP) – Août 2005, Baltimore, MD.
- 7.3 Groves, E., D.G. Nyachuba, et C. W. Donnelly. 2006. Comparison of 3M Petrifilm Environmental *Listeria* Plates with Selective Enrichment Methods for the Detection and Recovery of *Listeria Monocytogenes* on Environmental Surfaces. Étude présentée par l'Université du Vermont au Forum Scientifique FDA en 2006.