



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉTECTION DES *LISTERIA* SPP. DANS LES ALIMENTS ET LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX
PAR LA MÉTHODE EiaFOSS *LISTERIA*^{MD}

Stephen Shaw
Laboratoire des aliments, Laboratoire d'Ottawa (Carling)
Agence canadienne d'inspection des aliments
Ottawa ON K1A 0C6

Courriel : sshaw@inspection.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable à la détection des *Listeria* spp dans les aliments afin de déterminer s'il y a conformité avec les articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Lorsqu'une méthode officielle est prescrite pour un aliment, il faut suivre cette méthode.

2. DESCRIPTION

La méthode d'analyse EiaFOSS *Listeria* a été validée par la Campden & Chorleywood Food Research Association en 1997 (8.1) comparativement à la méthode BAM/AOAC de la Food and Drug Administration américaine comme méthode rapide pour la détection des *Listeria* spp. dans des échantillons alimentaires et environnementaux.

3. PRINCIPE

Le système EiaFoss permet la détection enzymatique automatisée au moyen de microbilles immunofluorescentes/paramagnétiques (Dynabeads immunomagnétiques, IMB), des *Listeria* spp. dans des échantillons alimentaires et environnementaux. La surface des microbilles immunomagnétiques est recouverte au préalable d'anticorps anti*Listeria* pour la capture des antigènes cibles dans l'échantillon analysé. La configuration de l'épreuve EiaFoss empêche les réactions non spécifiques avec les microbilles immunomagnétiques. Les réactifs de l'épreuve, y compris le substrat d'enzyme, le solvant conjugué et la solution d'arrêt, sont contenus dans des fioles scellées prêtes à utiliser. La solution de lavage est disponible sous forme d'un concentré facile à diluer et le conjugué et le témoin positif sont lyophilisés.

L'appareil EisFoss exécute toutes les étapes de l'analyse de façon séquentielle et automatique. L'échantillon est préenrichi dans un bouillon d'enrichissement *Listeria* modifié (mLEB) et enrichi de façon sélective dans un bouillon Fraser modifié (mFB). Une sous-culture est effectuée dans un bouillon de trypticase soya avec extrait de levure (TSB-YE) à 30 °C pendant trois à quatre heures. Une portion

aliquote de 1-2 ml de la culture TSB-YE est bouillie à 100 °C pendant 15 minutes, refroidie à < 35 °C et ensuite 600 µL est analysé pour la présence d'espèces de *Listeria* au moyen du système EiaFoss. Le complexe lié IMB-*Listeria* (anticorps monoclonaux anti-*Listeria*) est analysé au moyen du système EiaFoss produisant une réaction de fluorescence après l'addition d'un conjugué enzymatique. Le substrat fluorescent, soit le 4-méthyl-umbelliferyl-phosphate, est ensuite aspiré/refoulé dans la fiole d'essai où le conjugué enzymatique transforme le substrat en 4-méthyl-umbelliférol fluorescent. L'intensité de la fluorescence émise est mesurée par lecteur optique (450 nm) et le système produit un imprimé des résultats exprimés sous forme de valeurs de fluorescence relative (Rf). On considère que les échantillons qui ont une Rf > 0,1 indiquent la présence présomptive de *Listeria* spp. Il faut utiliser la technique de culture standard (8.3) pour confirmer la présence de *Listeria* dans les échantillons.

EiaFoss *Listeria* est une marque déposée de Foss Electric Co., DK 3400 Hillerod.

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 suivants (3-8) sont disponibles sur le marché et ils doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir également l'annexe G du volume 3 et la référence 8.2 pour la formulation des milieux individuels.

- 1) La trousse d'analyse EiaFoss contient les réactifs, y compris les étalons et les témoins, nécessaires pour analyser 29 échantillons. La trousse est disponible chez Foss Electric Co., Ltd., 69 Slangerupgade, DK 3400 Hillerod, site Web : www.foss.dk, Courriel : info@foss-electric.dk, Téléphone : +45 42 26 33 66; télécopieur : +45 42 26 93 22.
- 2) Système d'analyse automatisé EiaFoss et carte du programme *Listeria*
- 3) Bouillon d'enrichissement de *Listeria* modifié (mLEB)
- 4) Bouillon de Fraser modifié (mFB)
- 5) Bouillon Palcam (disponible chez Merck, par VWR)
- 6) Bouillon trypticase-soja additionné d'extrait de levure (TSB-YE)
- 7) Gélose Palcam (ou gélose équivalente)
- 8) Gélose Oxford (ou gélose équivalente)
- 9) Pipette étalonnée pour distribuer 600 µl avec embouts stériles jetables
- 10) Stomacher et sacs à stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 11) Bain-marie (100 °C) ou système équivalent
- 12) 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, des températures plus basses de 30 ou 25 °C peuvent être 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 près de la température indiquée parce que des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

7. MARCHE À SUIVRE

7.1 Préparation et enrichissement de l'échantillon

- 7.1.1 Ajouter aseptiquement 25 g de l'échantillon à 225 ml de bouillon mLEB et incubé à 35 °C pendant 24 heures.
- 7.1.2 Après incubation, transférer 1,0 ml de bouillon mLEB dans 9,0 ml de bouillon mFB et incubé à 30 °C pendant 24 à 48 heures.
- 7.1.3 Après incubation, transférer 1 ml de mFB dans 9,0 ml de TSB-YE et incubé pendant trois à quatre heures à 35 °C. Transférer ensuite 1 ml de TSB-YE dans une éprouvette et chauffer pendant 15 ± 2 minutes dans un bain-marie réglé à une température de 95 à 100 °C. Laisser refroidir l'éprouvette (<35° C) et procéder ensuite à l'épreuve EiaFoss *Listeria*. Conserver le bouillon d'enrichissement restant à une température de 2 à 8 °C pour utilisation ultérieure lors des tests de confirmation à réaliser pour toute épreuve EiaFoss *Listeria* qui donne un résultat positif.

7.2 EiaFoss *Listeria* – Marche à suivre

- 7.2.1 Sortir la trousse EiaFoss du réfrigérateur. Prélever les réactifs nécessaires à l'analyse et les laisser atteindre la température ambiante (minimum 30 minutes). Conserver les réactifs non utilisés à une température de 2 à 8 °C.
- 7.2.2 Étiqueter les fioles d'échantillon en y indiquant les numéros appropriés d'identification de l'échantillon.
- 7.2.3 En suivant les instructions de la carte du programme EiaFoss *Listeria*, créer une liste de travail en entrant les codes d'identification de l'échantillon et les informations du programme conformément aux instructions du fabricant.
- 7.2.4 Un standard (blanc) et un témoin positif doivent être entrés et exécutés au début de chaque liste de travail comme partie de la série d'analyses.
- 7.2.5 Mélanger doucement les témoins et faire tourbillonner les échantillons bouillis. Pipetter 600 µL des témoins ou de l'échantillon bouilli dans les fioles préalablement marquées sur le plateau d'échantillon. **Il est essentiel de chauffer tout bouillon d'enrichissement TSB-YE à 100 °C durant 15 minutes et de le laisser refroidir à la température de la pièce (<35 °C) avant d'effectuer l'essai avec le système EiaFoss.**
- 7.2.6 Charger le plateau d'échantillons dans la chambre EiaFoss et entreprendre l'épreuve en suivant les instructions figurant sur la carte du programme et dans le guide d'utilisation. L'épreuve sera complétée en 90 minutes environ.
- 7.2.7 Pour des détails supplémentaires, consulter l'encart joint à l'emballage.

7.3 Interprétation

Les épreuves qui produisent une fluorescence relative (Rf) de $\geq 0,10$ indiquent la présence présumée de *Listeria* spp dans l'échantillon. Il faut confirmer par culture tous les résultats présumés positifs.

7.4 Confirmation

Il faut confirmer les résultats positifs en ensemençant les bouillons réfrigérés d'enrichissement secondaire (mFB et TSB-YE) sur les géloses sélectives Palcam et Oxford (ou équivalent (8.3)). Incuber les plaques à 35 °C jusqu'à 48 heures et identifier les colonies caractéristiques en suivant les méthodes standard d'identification bactérienne décrites dans la méthode MFHPB-30 (8.3).

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 MacPhee, S., A.R. Bennett et R.P. Betts. 1997. Evaluation of the EiaFoss Listeria System for the Detection of Listeria Species in Foods. Campden & Chorleywood Food Research Association. R&D Report No. 45. Août 1997.
- 8.2 Atlas, R.M. 1997. Handbook of Microbiological Media. Deuxième édition. L.C. Parks (éditeur). CRC Press.
- 8.3 Pagotto, F., E. Daley, J. Farber et D. Warburton. 2001. MFHPB-30. Isolement de Listeria monocytogenes dans les échantillons alimentaires et environnementaux. Dans : Volume 2. *Compendium de méthodes*. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.