



Procédure de laboratoire

MFLP-13
Novembre 2005

DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**L'ESSAI GENEQUENCE *LISTERIA* SPP. POUR LA DÉTECTION DE *LISTERIA*
DANS UNE VARIÉTÉ D'ALIMENTS ET DE SURFACES DE L'ENVIRONNEMENT**

Don Warburton
Division de l'évaluation
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments
Localisateur postal : 2204A1
DGPSA, Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Courriel : Don.Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détection de *Listeria* spp. dans une grande variété de produits alimentaires, dont le boeuf haché cru, le porc haché cru, la dinde de charcuterie, le jambon de charcuterie, les hot dogs, le lait pasteurisé, la crème glacée, le fromage parmesan, le brie, le fromage cottage, la mayonnaise, les crevettes, la chair de crabe cuite, le saumon fumé, la laitue, la macédoine de légumes et les germes de luzerne. Cet essai a aussi été validé pour les types d'échantillons environnementaux suivants : des échantillons sur écouvillon ou sur éponge prélevés sur de l'acier inoxydable, du plastique, du béton, de la fonte, de la céramique ou des surfaces de bois peint.

2. DESCRIPTION

L'essai GeneQuence *Listeria* est un outil diagnostique par sonde d'ADN sous forme de trousse qui permet une détection rapide et précise de *Listeria* spp. dans les aliments et sur les surfaces de l'environnement. Les résultats sont obtenus en 30 à 48 heures approximativement. Le test démontre une sensibilité équivalant à celle des procédures de cultures de référence et peut détecter la présence d'une quantité aussi faible qu'une cellule de *Listeria* dans un échantillon d'aliment de 25 g lorsque les protocoles d'enrichissement spécifiques sont utilisés. La méthode GeneQuence est conçue pour être utilisée par un personnel de laboratoire qualifié qui suit des pratiques microbiologiques normalisées.

3. PRINCIPE

Pour effectuer un essai GeneQuence par hybridation de l'ADN, on emploie des sondes d'ADN spécifiques aux *Listeria* spp. marquées à la peroxydase de raifort ainsi qu'un point de virage colorimétrique pour détecter la présence de *Listeria* spp. dans des échantillons d'aliments et/ou des échantillons de l'environnement à la suite de l'enrichissement dans un milieu de culture. Après le préenrichissement de l'échantillon et une période d'enrichissement sélectif, les cellules ciblées sont lysées par un enzyme à 37 °C et les sondes d'oligonucléotides spécifiques aux *Listeria* sont ajoutées pour une incubation par hybridation de 60 minutes à

45 °C. Si l'ARN ribosomique (ARNr) de *Listeria* est présent dans l'échantillon d'essai, une sonde de détection marquée directement à la peroxydase de raifort (HRP) et une sonde de capture avec séquence d'acide polydésoxyadénylique (poly dA) hybrident des séquences d'ARNr de l'organisme cible. Simultanément, l'appariement des bases entre la sonde de capture avec séquence de poly dA et les micropuits de polystyrène enrobés d'acide polydésoxythymidylique (poly dT) facilite une capture en phase solide des molécules hybrides ciblées par la sonde. Une sonde non liée est éliminée par lavage et un substrat chromogène est ajouté à chaque puits. La réaction du HRP avec le substrat chromogène produit une couleur bleue. La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique, qui change la couleur du substrat de bleue à jaune. Un lecteur de plaque à micropuits ou de bandelettes de micropuits (A450) mesure l'absorbance; l'absorbance excédant la valeur de seuil indique la présence de *Listeria* spp. dans l'échantillon d'essai. Les résultats d'analyse positifs doivent être confirmés par les méthodes de culture normalisées.

4. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

NOTE : Le superviseur de laboratoire doit s'assurer que l'analyse décrite dans la présente méthode est réalisée selon la norme internationale « ISO/IEC 17025:1999 (ou une version ultérieure) : Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. »

Les milieux énumérés ci-dessous sont disponibles dans le commerce et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 pour la formulation de chaque milieu.

NOTE : Si l'analyste utilise des variantes des milieux énumérés ci-après (un produit offert commercialement ou préparé à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au superviseur de laboratoire d'en assurer l'équivalence.

6.1. Fournis avec la trousse

(n° 6708; 93 tests, Neogen Corporation, téléphone : (517) 372-9200, télécopieur : (517) 372-0108, Internet : www.neogen.com)

- 1 microplaque, 96 puits enduits, en bandelettes divisibles
- 1 bouteille de prétraitement concentré (étiquetée 1a)
- 1 bouteille de tampon de prétraitement (étiquetée 1b), 12 ml
- 1 bouteille de réactif de lyse concentré (étiquetée 2a)
- 1 bouteille de tampon de réactif de lyse (étiquetée 2b), 12 ml
- 1 bouteille de solution d'hybridation (étiquetée 3), 18 ml
- 1 bouteille de solution pour sonde à *Listeria* (étiquetée 4), 5 ml
- 1 bouteille de solution de lavage concentrée 20X (étiquetée 5), 50 ml
- 1 bouteille de solution de substrat chromogène (étiquetée 6), 15 ml
- 1 bouteille de solution d'arrêt de réaction (étiquetée 7), 5 ml
- 1 bouteille de contrôle positif (étiquetée +), 5 ml
- 1 bouteille de contrôle négatif (étiquetée -), 5 ml

Entreposer la microplaque, le contrôle positif, le contrôle négatif et les réactifs 1A, 2, 3 et 5, à une température de 2 à 8 °C. Les autres réactifs peuvent être entreposés à une température de 2 à 25 °C. Toute la trousse peut être entreposée à une température de 2 à 8 °C. Une fois que le réactif 1A est reconstitué, il doit être entreposé à -20 °C et est stable pendant 60 jours sous cette forme.

Mise en garde : La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique 4,0 N. La solution d'hybridation contient du formamide. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. Consulter la [fiche signalétique](#) pour plus de renseignements.

6.2. Bouillons d'enrichissement (voir la méthode MFHPB-7)

Bouillon Palcam
UVM

6.3. Matériel

6.3.1 Équipement

Mélangeur ou homogénéisateur
Incubateur à 30 et à 35 °C
Bain-marie ou bloc de chauffage à 37 °C
Bloc de 96 puits ou incubateur à 45 °C
Petit agitateur rotatif à plate-forme pouvant aller à 150 tr/min (facultatif)
Source de vide
Appareil de lavage pour microplaque avec 8 puits par orientation de bandelette
Micropipette ou pipette à répétition pour distribuer un volume de 100 µl
Pipette à 8 canaux (recommandée) ou pipette à répétition pour distribuer des volumes de 50 µl, de 125 µl et de 150 µl
Lecteur de microplaque ou de bandelettes à 450 nm avec discrimination d'au moins 0,01 unité d'absorbance
Cylindre gradué de 500 ml ou de 1 l
Support à éprouvettes
Minuterie

NOTE : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que la température des incubateurs ou des bains-marie est maintenue aux températures recommandées. Quand une température de 30 °C est recommandée dans la procédure, l'incubateur peut être à 30 ± 2,0 °C.

6.3.2 Fournitures

Bouteilles de culture pour le préenrichissement des échantillons
Tubes à culture pour des volumes d'échantillon de 11 ml
Éprouvettes, en verre, 12 x 75 mm, avec bouchons
Boîtes de Petri, 100 x 15 mm
Écouillons stériles
Solution saline tamponnée au phosphate (PBS), 10 mM de phosphate de sodium, 0,85 % de chlorure de sodium, pH de 7,4
Papier absorbant
Pipettes graduées jetables de 10 ou de 25 ml

7. MARCHE À SUIVRE

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

Suivre la procédure MFHPB-7

7.2 Préparation de l'analyse

Suivre la procédure MFHPB-7

7.3 Préparation des échantillons

Suivre la procédure MFHPB-7

7.4 Préenrichissement et enrichissement

Suivre la procédure MFHPB-7

7.5 Méthode d'analyse

NOTE : Tous les transferts à la pipette doivent être effectués en utilisant soit une pipette jetable et une poire à pipette ou une micropipette avec embouts jetables. Ne pas pipetter à la bouche. Cet essai doit être effectué dans des conditions normales d'essais en laboratoire quant à l'humidité, à l'éclairage, etc. Les étapes nécessitant une incubation à la température ambiante doivent être effectuées entre 18 et 30 °C. Les réactifs de la trousse qui ont été réfrigérés doivent être équilibrés à la température ambiante avant utilisation, mais ne doivent pas être laissés non réfrigérés pendant de longues périodes.

7.5.1 Avant de commencer l'essai :

- 7.5.1.1 Laisser les réactifs réfrigérés s'équilibrer à la température ambiante.
- 7.5.1.2. Allumer le bain-marie ou le bloc chauffant et en ajuster la température à 37 °C ± 1 °C. Remplir le bain-marie à un niveau d'environ 3,8 cm (1,5 pouce) ou remplir les puits du bloc de chauffage environ au tiers avec de l'eau déionisée.
- 7.5.1.3. Préparer le réactif de pré-traitement en ajoutant 12 ml de tampon de prétraitement (bouteille 1b) directement au prétraitement concentré (bouteille 1a). Dissoudre le contenu en remuant doucement.
- 7.5.1.4. Préparer le réactif de lyse en ajoutant 12 ml de tampon de réactif de lyse (bouteille 2b) directement à la bouteille du réactif de lyse concentré (bouteille 2a). Dissoudre le contenu en remuant doucement.

NOTE : Le réactif de prétraitement préparé à l'étape 3 et le réactif de lyse préparé à l'étape 4 peuvent être mélangés dans la bouteille 2b. Les réactifs de prétraitement ou de lyse séparés, ou les réactifs mélangés dans la bouteille 2a, sont stables sous forme reconstituée pendant 60 jours lorsqu'ils sont entreposés à -20 °C. Pour décongeler, placer les bouteilles à la température ambiante. Lorsque décongelées, remuer doucement le contenu. Entreposer de nouveau les réactifs reconstitués à -20 °C immédiatement après chaque utilisation.

- 7.5.1.5. Pour chaque échantillon à analyser, étiqueter une éprouvette en verre borosilicaté de 12 x 75 mm avec l'identification d'échantillon appropriée et la placer dans un support. Inclure des tubes pour 1 contrôle positif et 1 contrôle négatif par série d'essai expérimental.
- 7.5.1.6. Préparer la solution de lavage en mélangeant le contenu d'une bouteille de solution de lavage concentrée (bouteille 5) avec 950 ml d'eau distillée ou déionisée (si lavée manuellement avec une bouteille de lavage de 500 ml, utiliser 25 ml de concentré avec 475 ml d'eau). Remplir le réservoir à tampon de l'appareil de lavage de plaques (voir les instructions du fabricant pour le réglage et l'utilisation).

NOTE : La solution de lavage peut être entreposée jusqu'à 60 jours dans une bouteille fermée à la température ambiante.

- 7.5.1.7. Préparer un mélange d'hybridation/sonde dans une proportion de 4 pour 1 en mélangeant la solution d'hybridation (bouteille 3) et la solution pour sonde (bouteille 4) dans un contenant de plastique. Pour les directives de mélange, consulter la charte de mélange de *Listeria* spp. incluse dans la

trousse d'essais ou utiliser la formule ci-dessous (où N représente le nombre d'échantillons à analyser, y compris les contrôles).

Volume de la solution d'hybridation (bouteille 3) = $[(N \times 0,1) + 1,6]$ ml
Volume de la solution pour sonde (bouteille 4) = $[(N \times 0,025) + 0,4]$ ml

NOTE : La formule ci-dessus prévoit un excédent de volume de 2,0 ml; un excédent de volume différent peut être approprié selon le type de contenant utilisé pour préparer le mélange.

7.5.1.8. Sans toucher le fond des puits, placer le nombre approprié de micropuits dans le cadre de la plaque, en remplissant le cadre de gauche à droite et de l'avant à l'arrière en rangées de 8. Inclure des puits pour le blanc de réactif, le contrôle négatif et le contrôle positif.

7.5.2. Procédure d'essai

7.5.2.1. Mélanger les échantillons d'essai en agitant doucement les tubes d'essai. Agiter les solutions de contrôle positif et de contrôle négatif en retournant les bouteilles plusieurs fois. Ajouter 0,2 ml de chaque échantillon de contrôle et d'essai aux tubes correctement étiquetés.

7.5.2.2. Ajouter 0,05 ml du réactif de prétraitement reconstitué à chaque tube et 0,05 ml de réactif de lyse reconstitué (bouteille 2a), ou ajouter 0,1 ml de la solution combinée de prétraitement/lyse (bouteille 2a) à chaque tube. Mélanger en agitant manuellement et doucement le support à tubes pendant 5 secondes. La solution résultante doit être de couleur bleue. Si l'un des tubes n'est pas vert, vérifier que les réactifs ont été correctement ajoutés. Incuber le support à tubes dans le bain-marie ou le bloc de chauffage à 37 °C pendant 5 minutes.

7.5.2.3. Retirer les tubes de la source de chaleur. Transférer 0,150 ml de chaque échantillon lysé, y compris les contrôles, dans un micropuits désigné. Le premier puits doit être réservé pour le blanc de réactif et ne doit pas recevoir d'échantillon. Le deuxième puits doit être utilisé pour le contrôle négatif et le troisième, pour le contrôle positif.

7.5.2.4. Mélanger vigoureusement la solution d'hybridation/sonde préparée plus tôt. Ajouter 0,125 ml à chaque puits et mélanger bien chacun 5 fois à l'aide de la pipette. Ne pas ajouter la solution d'hybridation/sonde au micropuits de blanc de réactif.

7.5.2.5. Incuber la plaque à 45 °C pendant 60 minutes.

7.5.2.6. Laver les puits à l'aide d'une des procédures suivantes :

a) Appareil de lavage de plaque : Laver 5 fois à la température ambiante. Pour chaque cycle de lavage, traiter une bandelette de 8 puits à la fois, en aspirant le liquide, en remplissant les puits et en passant ensuite à la bandelette suivante. Après le dernier lavage, aspirer le liquide des puits, enlever ensuite le liquide résiduel en inversant la plaque et en la secouant sur un papier absorbant. Tenir la plaque en pressant doucement les côtés du cadre pour garder les bandelettes en place.

b) Manuellement : Bien laver les micropuits au moins 5 fois en utilisant un flacon laveur en plastique rempli de la solution de lavage préparée précédemment. Laver en vidant les puits dans un contenant approprié, en secouant la plaque inversée sur un papier absorbant, en remplissant complètement les puits de solution de lavage et en secouant vigoureusement la plaque pour enlever le contenu.

NOTE : Toutes les bulles d'air DOIVENT être enlevées avant de passer à la prochaine étape. S'il reste des bulles d'air, frapper vigoureusement de nouveau les puits sur un papier absorbant sur une surface plane jusqu'à ce qu'elles soient éliminées.

- 7.5.2.7. Ajouter 0,150 ml de la solution de substrat chromogène (bouteille 6) à chaque micropuits, y compris le micropuits du blanc de réactif. Incuber la plaque à la température ambiante pendant 20 minutes.
- 7.5.2.8. Ajouter 0,05 ml de la solution d'arrêt (bouteille 7) à chaque micropuits, y compris le micropuits de blanc de réactif.
- 7.5.2.9. Taper doucement le côté du cadre de la plaque à quelques reprises pour s'assurer que le tout est mélangé.
- 7.5.2.10. Lire l'absorbance à 450 nm en utilisant un lecteur de plaque ou de bandelette conformément aux instructions du fabricant. Faire le blanc en utilisant le premier puits contenant le substrat chromogène et la solution d'arrêt (ne pas faire le blanc avec de l'air).

7.6 Interprétation des résultats

7.6.1 Valeurs des contrôles

La valeur d'absorbance pour le contrôle négatif doit être $< 0,15$. Sinon, l'essai est erroné et doit être répété.

La valeur d'absorbance pour le contrôle positif doit être $> 1,00$. Sinon, l'essai est erroné et doit être répété.

7.6.2 Critère négatif

Les analyses produisant une valeur d'absorbance $< 0,10$ indiquent l'absence de *Listeria* spp. dans l'échantillon d'essai.

7.6.3 Critère positif

Les analyses produisant une valeur d'absorbance de $> 0,10$ indiquent la présence de *Listeria* spp. dans l'échantillon d'essai. Ces échantillons doivent être confirmés par des procédures de cultures normalisées.

7.7 Confirmation des résultats positifs

Les échantillons positifs doivent être confirmés par des cultures de la façon décrite dans la méthode MFHPB-30. Ensemencer des plaques des géloses sélectives spécifiées et confirmer à l'aide de procédures biochimiques et sérologiques.

8. BIBLIOGRAPHIE

- 8.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.2 Pagotto, F., E. Daley et D. Warburton. 2005. MFHPB-30. Isolement de *Listeria monocytogenes* dans tous les types d'aliments et les échantillons environnementaux. Santé Canada, Direction générale des produits de santé et des aliments, Direction des aliments, Bureau des dangers microbiens. *Compendium des méthodes*, Volume 2. Ce document est disponible à l'adresse suivante : http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mfhpb30_f.pdf

- 8.3 USDA-FSIS. 1998. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from meat, poultry and egg products. Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd ed. Government Printing Office, Washington, DC. <http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/Mlgbook.pdf>
- 8.4 US Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual Online. Washington: Chapter 10, *Listeria monocytogenes*.
Ce document est disponible à l'adresse suivante : <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>
- 8.5 US Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual Online. Washington: Chapter 24 Identification of Foodborne Bacterial Pathogens by Gene Probes <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-24.html>