



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉNOMBREMENT DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LES ALIMENTS

Franco Pagotto, Elaine Daley et J.M. Farber
Division de la recherche, Bureau de dangers microbiens,
Direction des aliments, Santé Canada,
Ottawa (Ontario)
DGPSA, Repère postal : 2204A2
K1A 0L2

Franco_Pagotto@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable au dénombrement des *Listeria monocytogenes* viables dans les aliments, y compris certains aliments prêts-à-manger (fruits de mer, produits laitiers, viandes rouges, volaille et légumes, etc.) et lorsqu'une détermination semi-quantitative est requise pour établir la conformité avec les normes publiées dans la dernière édition du Guide d'application de la réglementation régionale « Aliments prêts-à-manger contaminés par *L. monocytogenes* » (7.2). Cette méthode remplace la méthode MFLP-74 datée d'avril 1995.

2. PRINCIPE

Cette méthode semi-quantitative permet de déterminer par ensemencement direct en boîte le nombre de *L. monocytogenes* viables présents dans un produit. Sur le plan de l'intervention réglementaire, la méthode vise à détecter les aliments contenant d'importantes populations de *L. monocytogenes* (>100 UFC/g). Toutefois, s'il faut des mesures plus précises, il est possible d'utiliser d'autres dilutions qui permettent un dénombrement aussi petit que 1 UFC/g. Un échantillon du produit est mélangé à un diluant approprié, étalé sur la surface d'au moins deux géloses sélectives, lesquelles sont alors incubées pendant une période déterminée à une température donnée. On présume que dans ces conditions, chaque cellule viable de *L. monocytogenes* se multiplie pour former une colonie visible que l'on peut identifier. Le choix des milieux sélectifs est fondé sur les travaux d'autres chercheurs (7.4, 7.6, 7.7).

3. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'Annexe A du volume 3.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

4.1 Voir l'Annexe B du volume 3.

4.2 Au cours du transport, il faut garder toutes les unités d'échantillonnage réfrigérées (4° C) ou congelées, selon la nature du produit.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Voir la section du « Matériel et équipements spéciaux » de la méthode MFHPB-30.

Voir l'annexe G du Volume 3 pour la composition de chaque milieu.

Autres produits nécessaires :

- 1) Eau peptonée, 0.1 % (p/v)

Facultatif :

- 2) Gélose au chlorure de lithium et à la ceftazidime hémolytique (HCLA) – voir l'Annexe G du volume 3 pour la composition.
- 3) On peut utiliser des géloses chromatogènes et d'autres nouvelles géloses d'isolement, mais seulement de concert avec les milieux recommandés. Suivre les instructions du fabricant pour la préparation et l'utilisation.

6. MARCHE À SUIVRE

On peut connaître la distribution des *Listeria* spp en analysant chaque unité analytique séparément. Analyser chaque unité d'échantillonnage conformément au schéma d'échantillonnage du Tableau 1.

6.1 Manipulation et dilution des échantillons

- 6.1.1 Avant l'analyse au laboratoire, sauf dans le cas des aliments stables à température de la pièce, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5°C) ou au congélateur, selon la nature du produit. Faire dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.
- 6.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.
- 6.1.3 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 de l'unité d'échantillonnage.
- 6.1.4 Si l'on s'attend à trouver de **fortes populations** de *L. monocytogene*, ou encore, pour les besoins de l'intervention réglementaire, il faut utiliser une partie d'échantillon pour neuf parties de diluant (1:10).
- 6.1.5 Facultatif :

S'il faut dénombrer des **populations plus faibles**, mélanger une partie d'échantillon avec quatre parties de diluant (1:5).

6.2 Méthode par ensemencement direct

- 6.2.1 Préparer, dans une jarre de mélangeur ou un sac de stomacher, une dilution de 1:5 ou de 1:10 de l'échantillon, selon les besoins, dans de l'eau peptonée à 0,1 % (p/v). Bien mélanger au mélangeur ou au stomacher.
- 6.2.2 À partir de la dilution **1:10**, prélever immédiatement une portion de 0,1 ml de l'aliment dilué et l'étaler sur la surface de deux des quatre milieux sélectifs suivants : LPM, OXA, MOX, PAL ou gélose chromatogène. Faire en double.

6.2.3 Facultatif :

À partir de la dilution **1:5**, prélever immédiatement une portion de 0,333 ml de l'aliment dilué et l'étaler sur la surface de deux des quatre milieux sélectifs suivants : LPM, OXA, MOX, PAL ou gélose chromatogène. Faire en triple.

Note : On peut utiliser des géloses chromatogènes et d'autres nouvelles géloses d'isolement, mais seulement de concert avec les milieux recommandés. Suivre les instructions du fabricant pour la préparation et l'utilisation. La gélose au chlorure de lithium et à la ceftazidime hémolytique (HCLA) permet de distinguer les *Listeria* hémolytiques des *Listeria* non hémolytiques.

6.2.4 Incuber la gélose LPM à 30°C pendant 24 à 48 h et toutes les autres géloses sélectives à 35°C pendant 24 à 48 h. Rechercher les colonies ayant une apparence typique (sections 6.3.1 à 6.3.4).

6.3 Identification présomptive

6.3.1 Gélose LPM – Pour repérer les colonies suspectes sur les géloses LPM, examiner les boîtes à l'aide d'un faisceau de lumière blanche assez puissant pour bien éclairer la gélose, orienté à un angle de 45° avec le fond de la boîte (7.1). Si la transillumination est optimale, les colonies de *Listeria* les plus isolées et les plus grosses (âgées de 48 heures) apparaissent comme des amas blanchâtres de verre pilé présentant 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.

6.3.2 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 ont de 2 à 3 mm de diamètre et sont noires, avec un halo noir et un centre affaissé. Elles peuvent aussi être 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.

6.3.3 Gélose PAL – Les colonies de *L. monocytogenes* mesurent environ 2 mm de diamètre et ont une coloration gris-vert. Elles présentent un centre noir et affaissé et 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.

6.3.4 Gélose HCLA – Les colonies ont un aspect semblable à celui qu'elles ont sur la gélose LPM, sauf que les *Listeria* spp. hémolytiques sont entourées d'une étroite zone d'hémolyse. Les techniques d'éclairage décrites ci-dessus (voir la section 6.3.1) peuvent servir à distinguer la coloration bleu-vert des *Listeria* spp. dans ce milieu (7.1).

6.4 Dénombrement et confirmation des colonies obtenues par ensemencement direct

6.4.1 Rechercher les colonies typiques dans chaque ensemble de géloses en double ou en triple de chacun des deux milieux sélectifs utilisés. Si possible, prélever au moins cinq colonies de chaque ensemble de géloses.

6.4.2 S'il y a plus de 10 colonies typiques dans un ensemble de géloses en double ou en triple d'un milieu sélectif, prélever au total 10 colonies (ou toutes les colonies, s'il y a en a moins de 10) et les ensemercer en stries sur des géloses TA ou TSA-YE pour la séparation et la pureté. Incuber les géloses à 30° C pendant 24 h à 48 h ou jusqu'à croissance satisfaisante. Rechercher les colonies typiques sur les géloses sous l'éclairage décrit ci-dessus (6.3.1).

- 6.4.3 Confirmer qu'il s'agit de *L. monocytogenes* en appliquant la marche à suivre décrite dans la méthode MFHPB-30 (7.3).

6.5 Interprétation

6.5.1 Dilution 1:10

Si, au total, il y a plus de deux colonies confirmées comme *L. monocytogenes* dans l'un des ensembles de géloses en double (p. ex., deux géloses LPM, deux géloses Oxford), rapporter un résultat positif, c'est-à-dire >100 UFC/g. Sinon, rapporter <100 UFC/g comme résultat.

6.5.2 Dilution 1:5

Si au moins une colonie ou plus est confirmée comme *L. monocytogenes* dans un ensemble de géloses en triple (p. ex., trois géloses LPM, trois géloses Oxford), rapporter un résultat positif, c'est-à-dire >1 UFC/g. Sinon, rapporter <1 UFC/g comme résultat.

- 6.5.3 Consigner séparément les résultats de chacun des deux types de milieu sélectif. Cependant, par souci de simplicité et de commodité, il faudrait rapporter seulement le résultat le plus élevé. Si l'une des cinq unités d'échantillonnage est positive, il faudrait rapporter que le lot est positif, c'est-à-dire >1 UFC/g ou >100 UFC/g.

7. RÉFÉRENCES

- 7.1 American Public Health Association (APHA). 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Quatrième édition. Chapitre 35. F.P. Downes et K. Ito (éditeurs), American Public Health Association, Washington, D.C.
- 7.2 Santé Canada, 1994. *Dans : Guide d'application de la réglementation régionale. Aliments prêts-à-manger contaminés par Listeria monocytogenes*, 1994 (ou édition la plus récente).
- 7.3 Pagotto, F., E. Daley, J. Farber et D. Warburton. 2001. Isolement de *Listeria monocytogenes* dans tous les types d'aliments et les échantillons environnementaux (MFHPB-30). *Compendium de méthodes*, volume 2. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.
- 7.4 Poysky, F.T., R.N. Paranjpye, L.C. Lashbrook, M.E. Peterson, G.A. Pelroy et M.W. Eklund. 1993. Selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from foods. *J. Food Prot.* **56**:326-329, 332.
- 7.5 Seeliger, H.P.R. et D. Jones. 1986. Genus *Listeria* pirie. *Dans : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, vol. 2. (éd.) R.G.E. Murray. Williams and Wilkins, Baltimore MD. pp. 1235-1245.
- 7.6 Warburton, D.W., J.M. Farber, A. Armstrong, R. Caldeira, T. Hunt, S. Messier, R. Plante, N.P. Tiwari et J. Vinet. 1991. A comparative study of the "FDA" and "USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **13**:105-118.
- 7.7 Warburton, D.W., J.M. Farber, A. Armstrong, R. Caldeira, N.P. Tiwari, T. Babiuk, P. LaCasse et S. Read. 1991. A Canadian comparative study of modified versions of the "FDA" and "USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **54**:669-676.

Tableau 1

**Échantillonnage des aliments prêts-à-manger¹ (PAM)
pour le dénombrement de *L. monocytogenes* (LM)**

Catégorie d'aliment	Échantillonnage	Analyse	Type d'analyse
Aliments PAM favorisant la croissance de LM qui ont une durée de vie sous réfrigération \leq 10 jours, et tous les aliments qui ne permettent pas la croissance ² (p. ex., crème glacée, fromage à pâte dure, salami sec, poisson séché salé, céréales pour petit déjeuner et autres produits céréaliers)	5 unités d'échantillonnage (100 g ou ml chacun) prélevées au hasard dans le lot.	5x10 g unités d'analyse ⁴ sont analysées séparément.	Ensemencement direct
		Lorsqu'il faut faire un enrichissement ⁵ , 5x5 g unités d'analyse ⁴ sont analysées séparément ou comme composite.	Enrichissement

¹ Pour une définition des aliments PAM, consulter la dernière version du Guide d'application de la réglementation régionale intitulé « Aliments prêts-à-manger contaminés par *Listeria monocytogenes* » (7.2).

² Les aliments qui ne permettent pas la croissance de *LM* comprennent ceux qui satisfont aux critères suivants:
 (a) pH de 5,0 à 5,5 et $a_w < 0,95$
 (b) pH $< 5,0$, peu importe l' a_w
 (c) $a_w \leq 0,92$, peu importe le pH
 (d) aliments congelés

Il faudrait mesurer le pH et l' a_w de 3 des 5 unités d'analyse. On considère que l'aliment favorise la croissance de *L. monocytogenes* si les mesures de pH et d' a_w d'au moins une des unités d'analyse se situent dans l'échelle de valeurs permettant la croissance de cet organisme.

³ La liste d'exemples n'est pas exhaustive.

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

⁵ Pour ces aliments, si les BPF sont insuffisantes et qu'on a décelé *L. monocytogenes* dans les aires de manutention du produit fini, ou encore s'il est impossible de faire un examen afin d'établir le niveau des BPF, on peut utiliser les deux méthodes MFLP-74 et MFHPB-30, selon les besoins.