



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

 DÉTECTION DES *LISTERIA* SPP DANS LES ALIMENTS ET LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX
PAR LA MÉTHODE VIP

Don Warburton et Ann Boville
Bureau des dangers microbiens, Direction des Aliments
Repère postal : 2204A1
Santé Canada, Ottawa ON K1A 0L2

Courriel : Don_Warburton @hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

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

2. DESCRIPTION

La méthode VIP pour *Listeria* est un essai d'immunoprécipitation visuelle qui permet de détecter la présence de *Listeria monocytogenes* et les autres espèces de *Listeria*. Cette méthode emploie des anticorps hautement spécifiques qui visent des antigènes de *Listeria* et la formule en a été établie spécifiquement pour réduire au minimum la réactivité croisée tout en maintenant une sensibilité supérieure. La méthode a été modifiée par Warburton et coll. (8.3; et des données non publiées) afin de permettre l'utilisation d'un bouillon unique (le bouillon Palcam) comme milieu de pré-enrichissement pour tous les échantillons alimentaires et environnementaux.

3. PRINCIPE

La méthode VIP pour *Listeria* utilise un système de réactif exclusif pour former un complexe antigène-anticorps-chromogène en présence des *Listeria*. Cette méthode assure une très grande sensibilité et spécificité aux *Listeria*. On ajoute des échantillons enrichis de la façon requise à l'unité VIP; tout antigène *Listeria* se fixera au complexe anticorps chromogène en traversant une membrane de soutien. En présence de *Listeria*, le complexe antigène-anticorps-chromogène forme une ligne de détection dans la fenêtre de l'échantillon d'essai. L'échantillon continue de s'écouler le long de la membrane pour former une ligne témoin dans la fenêtre de vérification de l'essai, que l'échantillon contienne ou non des *Listeria*.

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 (2-6) sont disponibles commercialement et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir également l'annexe G du volume 3 et la référence 8.1 pour la formulation des milieux individuels.

NOTE: Si l'analyste utilise des variantes des milieux indiqués ici (qu'il s'agisse d'un produit disponible dans le marché ou fabriqué à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au superviseur du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 1) La trousse d'essai VIP *Listeria* (BioControl Systems Inc., tél: (425) 603-1123, (800) 245-0113, Fax: (425) 603-0080, site web: www.biocontrols.com.
- 2) Bouillon Palcam (disponible chez Merck, par VWR; sera également disponible chez Oxoid et Becton Dickinson en janvier 2003 (date approximative).
- 3) Bouillon UVM 2
- 4) Gélose Palcam (ou gélose équivalente)
- 5) Gélose Oxford (ou gélose équivalente)
- 6) Géloses chromatogènes (facultatif):
Géloses Rapid L. mono (Laboratoires Bio Rad)_
Géloses Aloa (Laboratoire AES)
- 7) Une pipette calibrée pour distribuer 100 µl avec embouts jetable
- 8) Stomacher et sacs à stomacher, mélangeur ou équivalent
- 9) Bain-marie (95-100° C) ou un système équivalent
- 10) Incubateurs capables de maintenir 30°C et 35°C

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

7. PROCÉDURE

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

7.1.1 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 décongeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.

7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse / Enrichissement primaire

- 7.2.1 Pour assurer que l'unité d'analyse soit vraiment représentative, agiter les liquides ou les solides fluides jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas d'un solide, prélever des portions à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.
- 7.2.2 Ajouter 25 g ou ml de l'aliment (l'unité d'analyse) à 225 ml de bouillon Palcam dans une jarre de mélangeur ou dans un sac à stomacher. On peut aussi ajouter 50 g de l'aliment à 450 ml de bouillon Palcam. Dans le cas des échantillons composés, ajouter un des composés d'unités d'analyse décrits dans le Tableau 1 à un volume suffisant de bouillon Palcam. Maintenir un ratio d'une partie d'échantillon pour 9 parties de bouillon Palcam. Presser les écouvillons environnementaux dans 10 ml d'agent neutralisant et ajouter cet échantillon à 90 ml de bouillon Palcam. Mélanger au broyeur, au stomacher ou au vortex selon les besoins pour obtenir un mélange complet et incubé à 35°C pendant 26 heures. Les éponge environnementales peuvent être ajoutées à 100 ml de bouillon Palcam ou être regroupées jusqu'à un maximum de 10 éponges avec 100 ml de bouillon Palcam par éponge (voir MFLP-41B).

7.3 Enrichissement secondaire

- 7.3.1 Agiter le bouillon Palcam suffisamment pour le mélanger et laisser déposer les grosses particules d'aliment. Transférer 1.0 ml de bouillon Palcam dans 9.0 ml de bouillon UVM 2. Incuber à 30° C pendant **26 (minimum) à 48 heures**.

7.3.2 Réfrigération des cultures d'enrichissement secondaire (UVM2) - 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 mercredi ou 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. Procéder de la façon décrite en 7.3.3 et 7.4.

- 7.3.3 Après incubation, transférer 2 ml du bouillon d'enrichissement dans un tube à essai et chauffer le tube durant 15 +/- 2 minutes au bain-marie à 100 °C. Laisser refroidir le tube et effectuer l'essai VIP LIS. Conserver le bouillon d'enrichissement restant entre 2-8° C pour utilisation ultérieure de tests de confirmation à réaliser en cas d'essais VIP *Listeria* positifs.

7.4 Méthode d'essai VIP

- 7.4.1 Ouvrir l'enveloppe scellée contenant les unités VIP et prendre le nombre nécessaire. Il faut une unité par échantillon. Les unités VIP ne sont pas réutilisables. Assurez-vous de resceller immédiatement les unités VIP inutilisées dans l'enveloppe contenant un agent déshydratant. Garder à la température de la pièce, à un endroit frais et sombre.
- 7.4.2 Agiter doucement l'aliquot de 2 ml du bouillon d'enrichissement secondaire chauffé et laisser ensuite les particules d'aliments se déposer.
- 7.4.3 Transférer 0,1 ml du bouillon inoculé dans le puit d'échantillon.

Note : Les particules d'échantillon peuvent ralentir l'écoulement. On recommande d'utiliser des filtres pour pipetter l'échantillon.

- 7.4.4 Incuber à la température de la pièce pendant 10 minutes.

7.5 Lecture des résultats

- 7.5.1 Examiner l'unité VIP pour y déceler la présence d'une ligne distincte dans la fenêtre de vérification de l'essai. Cette ligne doit être sombre sur le fond blanc et s'étendre sur toute la

fenêtre. L'absence de ligne témoin indique que le résultat du test n'est pas valide. Communiquer avec BioControl Technical Services.

- 7.5.2 Observer la fenêtre de l'échantillon d'essai. La présence d'une ligne distincte décrite ci-dessus indique un échantillon présumé positif. L'absence de ligne est un résultat négatif. Les intensités différentes des lignes d'essai et des lignes témoins sont acceptables tant qu'il y a présence d'une ligne témoin.

Note : Examiner l'unité après 10 minutes. Ne pas lire les résultats après 20 minutes, car des lignes ténues peuvent faire leur apparition à cause d'une coloration non spécifique. Il ne faut pas en tenir compte.

- 7.5.3 Il faut exécuter des cultures témoins positives et négatives pour se familiariser avec l'interprétation des résultats.

- 7.5.4 Autoclaver les unités à 121 °C pendant 15 minutes avant de les jeter.

7.6 Confirmation des échantillons VIP positifs

- 7.6.1 Les résultats VIP *Listeria* positifs doivent être confirmés par l'ensemencement du bouillon réfrigéré d'enrichissement secondaire sur géloses sélectives Palcam et Oxford (ou l'équivalent (8.2)). Incuber les géloses à 35°C jusqu'à 48 heures et identifier les colonies caractéristiques en suivant les méthodes standard d'identification bactérienne telles que décrites dans la méthode MFHPB-30 (8.2).

- 7.6.2 **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.**

8. RÉFÉRENCES

- 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, J. Farber and D. Warburton. 2001. Isolement de *Listeria monocytogenes* dans les aliments et les échantillons environnementaux. Dans: Volume 2. *Le Compendium de méthodes*. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.
- 8.3 A.M. Sewell, Warburton, D. W., Boville, A., Daley, E. F. and Mullen, K. 2002. A Comparison of the Health Products and Food Branch and the Enzyme Linked Fluorescent Assay Methods for the Isolation and Identification of *Listeria* spp. from Foods. *Int. J. Food Micro*. In press.

Tableau 1

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

Aliment	Échantillonnage	Analyse	Type d'analyse
1. Les aliments PAM liés causalement à 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 > 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 permettant la croissance de LM et ayant une durée de conservation sous réfrigération > 10 jours (p. ex. viandes emballées sous vide, sandwichs emballés sous atmosphère modifiée, fruits de 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. Tous les autres aliments PAM favorisant la croissance de LM et ayant une durée de conservation sous réfrigération ≤ 10 jours et les aliments PAM ne permettant pas la croissance ³ (p. ex., fruits de 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 est nécessaire de faire un enrichissement ⁴ , 5x5 unités d'analyse ⁵ sont analysées 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 *Listeria 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) pH < 5,0 peu importe l' a_w

c) $a_w \leq 0,92$ peu importe le pH

d) aliments congelés

Les mesures de pH et d' a_w devraient être effectuées sur 3 des 5 unités d'analyse. On considère que l'aliment permet 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 qui permettent la croissance de cet organisme.

⁴ L'unité d'analyse désignée doit être prélevée à partir de chaque unité d'échantillonnage.

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