



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

 DÉTECTION DE *Listeria monocytogenes* DANS LES ALIMENTS ET
LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX PAR LA MÉTHODE VIDAS LMO 2™

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 de *Listeria monocytogenes* 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.

2. DESCRIPTION

La méthode VIDAS *Listeria monocytogenes* LMO 2 a été homologuée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) le 3 juillet 2002 en tant que méthode rapide d'analyse pour tous les produits alimentaires humains. Cette homologation a été obtenue en accord avec la méthode de référence décrite dans la norme française n BIO 12/9-07/02 (8.2). L'homologation a été appliquée aux échantillons environnementaux le 18 septembre 2002, selon la même méthode de référence. La méthode a été modifiée par Warburton et coll. (8.4) 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

L'essai VIDAS LMO 2 est un test d'immuno-analyse enzymatique par fluorescence à utiliser sur le système VIDAS pour la détection qualitative des *Listeria monocytogenes*. La surface interne du cône, un dispositif jetable semblable à un embout de pipette, est recouverte avec des anticorps *anti-L. monocytogenes* durant la production. La configuration de l'essai VIDAS LMO 2 empêche les réactions non-spécifiques avec le cône. Les réactifs nécessaires à un essai sont contenus dans une cartouche scellée à chambres multiples.

L'appareil VIDAS effectue toutes les étapes de l'analyse de façon séquentielle et automatique. L'échantillon est inoculé dans la cartouche de réactifs et subit ensuite un cycle d'aspiration /refoulement d'une durée déterminée dans le cône. Les antigènes *L. monocytogenes* présents dans l'échantillon se fixent sur les anticorps monoclonaux *anti-L. monocytogenes* fixés sur la paroi du cône. La partie non fixée de l'échantillon est éliminée par lavage. Par la suite, des anticorps conjugués à la phosphatase alcaline sont aspirés/refoulés dans le cône et réagissent avec les complexes antigène-anticorps de *L. monocytogenes* déjà fixés sur la paroi du cône. Le conjugué non fixé est éliminé par lavage.

Le substrat fluorescent, soit le 4-méthyl-umbelliferyl phosphate, est ensuite aspiré/refoulé dans le cône et il y est transformé par l'enzyme du conjugué en un produit fluorescent, le 4-méthyl-umbelliférol. L'intensité de la fluorescence est alors mesurée à 450nm.

VIDAS LMO 2™ est une marque de commerce déposée de bioMérieux.

4. DÉFINITIONS

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 (3-7) 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 VIDAS LMO 2 (réf. 30704): contient les réactifs nécessaires à l'analyse de 60 échantillons, y compris les standards et les contrôles. La trousse est disponible chez bioMérieux Canada, Inc., 4535 Dobrin, St-Laurent, Québec H4R 2L8, Tél : (514) 336-7321, Fax : (514) 336-6450.
- 2) Un système VIDAS 30 de grande capacité ou un miniVIDAS à capacité réduite.
- 3) Bouillon Palcam (disponible chez Merck, par VWR; sera également disponible chez Oxoid et Becton Dickinson en janvier 2003 (date approximative).
- 4) Bouillon UVM 2
- 5) Gélose Palcam (ou gélose équivalente)
- 6) Gélose Oxford (ou gélose équivalente)
- 7) Géloses chromatogènes (facultatif):
Géloses Rapid L. mono (Laboratoires Bio Rad)_
Géloses Aloa (Laboratoire AES)
- 8) Une pipette calibrée pour distribuer 500 µl avec embouts jetable
- 9) Stomacher et sacs à stomacher, mélangeur ou équivalent
- 10) Bain-marie (95-100° C) ou un système équivalent
- 11) 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 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.

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

7.2 Préparation pour l'analyse

7.2.1 Avoir à sa disposition du bouillon Palcam stérile.

7.2.2 Nettoyer la surface de travail à l'aide d'un désinfectant

7.3 Préparation de l'échantillon

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.

7.4 Enrichissement primaire

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 éponges 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).

7.5 Enrichissement secondaire

7.5.1 Agiter le bouillon Palcam suffisamment pour le mélanger et laisser déposer les grosses particules d'aliment. Transférer 1 ml de bouillon Palcam dans 9 ml de bouillon UVM 2. Incuber à 30° C pendant **26 (minimum) à 48 heures**.

7.5.2 **Réfrigération des cultures d'enrichissement secondaire (UVM 2) - 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 7.5.3 et 7.6.

7.5.3 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 95-100 °C. Laisser refroidir le tube et effectuer l'essai VIDAS LMO 2. Conserver le bouillon d'enrichissement restant entre 2-8° C pour utilisation ultérieure de tests de confirmation à réaliser en cas d'essais VIDAS LMO 2 positifs.

7.6 Analyse

7.6.1 Sortir la trousse VIDAS LMO 2 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 2-8° C.

7.6.2 Inscrire sur chaque cartouche LMO 2, à l'endroit réservé à cet effet, le numéro d'identification de l'échantillon.

- 7.6.3 Suivre les instructions applicables à l'entrée des données sur le lot, l'échantillon, le standard et le contrôle, selon les instructions opérationnelles s'appliquant au système VIDAS utilisé (le système VIDAS 30 de grande capacité ou le miniVIDAS).

NOTE: Les composantes de différents lots ne peuvent être mélangées et ne peuvent être utilisées au delà de la date de péremption.

- 7.6.4 Lorsqu'un nouveau lot de trousse est utilisé, les spécifications (ou la courbe de calibration maîtresse du fabricant) doivent d'abord être entrées dans le système à l'aide de la carte d'entrée de lot incluse dans chaque trousse.
- 7.6.5 Le standard doit être étalonné au moins à tous les 14 jours et lorsqu'un nouveau lot de trousse est utilisé. Si un standard doit être testé, entrer "S1" pour l'identification de l'échantillon. Le standard doit être placé au début de la liste de travail, suivi par les contrôles C1 et C2. Le standard doit être effectué en double, les deux portant la même désignation S1, si cela doit être enregistré dans la mémoire.
- 7.6.6 Homogénéiser au vortex, les standards, les contrôles et les échantillons chauffés. A l'aide de la pipette, déposer 500 +/- 50 µl de standard, de contrôles et d'échantillon chauffé au centre du puits d'échantillon de la cartouche LIS. **Il est essentiel de chauffer tout bouillon d'enrichissement durant 15 minutes à 95-100° C et de le laisser refroidir à température ambiante avant d'effectuer l'essai sur le VIDAS.**
- 7.6.7 Placer la cartouche LMO 2 et le cône LMO 2 dans le VIDAS au niveau des positions indiquées par la liste de travail. S'assurer que les étiquettes colorées, indiquant le code à trois lettres de l'essai, du cône et de la cartouche sont concordantes.
- 7.6.8 Commencer l'analyse tel qu' indiquée dans le manuel d'opération VIDAS. L'analyse sera complétée en approximativement 70 minutes.
- 7.6.9 Consulter le feuillet d'instruction pour plus de détails.

7.7 Interprétation

Les tests dont la RFV (relative fluorescence value) est supérieure ou égale à 0,05 indiquent la présence présumée de *Listeria monocytogenes* dans l'échantillon. Tous les résultats présumés positifs doivent être confirmés par cultures.

7.8 Confirmation

- 7.8.1 Les résultats VIDAS LMO 2 positifs doivent être confirmés par l'ensemencement du bouillon réfrigéré d'enrichissement secondaire sur géloses sélectives Palcam et Oxford (ou l'équivalent (8.3)). 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 (8.3).
- 7.8.2 **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 NF EN ISO n BIO 12/9-07/02. 2002. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*.
- 8.3 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 des Méthodes*. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.
- 8.4 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* 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.