



**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS**

**OTTAWA**

**DÉTECTION DES *LISTERIA* SPP DANS LES ALIMENTS AU MOYEN DE LA MÉTHODE  
OXOID *LISTERIA* RAPID TEST (LA TROUSSE CLEARVIEW)**

**Don Warburton et Ann Boville**

**Division de l'évaluation**

**Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments**

**Repère postal : 2204A1**

**DGPSA, Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

**Don\_Warburton@hc-sc.gc.ca**

**1. APPLICATION**

Cette méthode est applicable à la détection des *Listeria* spp. viables dans les aliments et autres échantillons afin de déterminer s'il y a conformité aux articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*.

**2. DESCRIPTION**

Divers auteurs ont étudié à fond (8.2 - 8.4) la méthode Oxoid *Listeria* Rapid Test (Clearview), qui a été révisée par Warburton *et al.* (DGPSA, données non publiées). On a démontré que la méthode révisée décrite ici produit de meilleurs résultats avec les produits laitiers, le poisson, la viande, les légumes et les échantillons environnementaux contaminés naturellement. Cette méthode révisée peut servir à détecter la présence de *Listeria* dans d'autres aliments, ingrédients alimentaires et spécimens environnementaux.

**3. PRINCIPE**

L'antigène flagellaire de *Listeria* est extrait d'un échantillon produit par culture au cours de deux enrichissements séquentiels. L'épreuve immunologique est constituée d'une bandelette membranaire à écoulement latéral sur laquelle est immobilisée une ligne d'anticorps spécifiques à l'antigène flagellaire B de *Listeria*. Cet antigène est commun à toutes les espèces de *Listeria* à l'exception de *L. grayi*. Des anticorps additionnels spécifiques pour *Listeria*, liés à des particules de latex en couleur, sont déposés sur la bandelette d'essai en présence de l'échantillon analysé. Si l'antigène de *Listeria* est présent dans l'échantillon, il forme un sandwich avec le complexe

anticorps- latex et anticorps immobilisés, ce qui produit une « ligne bleue » clairement visible comme résultat positif. Une deuxième ligne d'anticorps non spécifiques est immobilisée plus haut sur la bandelette d'essai. Cette deuxième ligne fixe l'excès d'anticorps liés au latex, qu'il y ait présence d'antigènes ou non, ce qui constitue un contrôle interne. Les colonies présumées positives sont déterminées en 52 h. Des épreuves biochimiques et sérologiques de confirmation sont réalisées sur des colonies purifiées.

#### 4. DÉFINITIONS

Voir l'Annexe A du volume 3.

#### 5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'Annexe B du volume 3.

#### 6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

Les milieux et réactifs suivants (1-2 et 10-12) sont disponibles dans le commerce 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 de milieux individuels.

- 1) Enrichissement primaire - Bouillon Palcam (Merck)
- 2) Enrichissement secondaire - UVM 2
- 3) Trousse *Listeria* Rapid Test (Clearview)
- 4) Éprouvettes en verre
- 5) Pipettes de 1,0 ml ou pipette mécanique et embouts
- 6) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 7) Plaque chauffante/incubateur 80°C ± 2° C
- 8) Cultures contrôles (utiliser des cultures ATTC ou l'équivalent)  
*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Listeria seeligeri*  
La trousse comprend un contrôle positif (3 fioles) de *Listeria monocytogenes* non viable.
- 9) Incubateurs capables de maintenir 30° et 35°C

<p><b>NOTE:</b> Il incombe à chaque laboratoire d'assurer que les incubateurs ou les bains-marie demeurent 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 peut-être à +/- 1,0 °C. 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 de la température recommandée. Une température plus élevée peut être létale pour le micro-organisme que l'on cherche à isoler.</p>
---

### Milieux de confirmation et réactifs

- 10) Gélose sélective pour *Listeria* (Oxford)
- 11) Gélose sélective Palcam ou autres milieux énumérés dans les méthodes MFHPB-30.
- 12) Antisérums spécifiques pour *Listeria* (facultatif)

## **7. MÉTHODE**

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités d'analyse peuvent être regroupées. Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes :

### **7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage**

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder réfrigérées (0-5°C) ou congelées, selon la nature du produit, toutes les unités d'échantillonnage à l'exception des unités provenant d'aliments stables à la température de la pièce. Décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou pendant des périodes et à des températures qui ne favorisent pas la croissance ou la mort des bactéries.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur réception au laboratoire.

### **7.2 Préparation de l'analyse**

- 7.2.1 Préparer du bouillon Palcam stérile.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail à l'aide d'un désinfectant approprié.

### **7.3 Préparation de l'échantillon**

- 7.3.1 Pour assurer que l'unité d'analyse est vraiment représentative, agiter les liquides ou les substances fluides jusqu'à ce qu'ils soient homogènes. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, obtenir l'unité d'analyse en prélevant une portion à plusieurs endroits de l'unité d'échantillonnage. Afin de réduire la charge de travail, on peut regrouper les unités d'analyse pour l'analyse. Il est recommandé que l'échantillon composite ne contienne pas plus de cinq unités d'analyse.

<b>Note :</b>	Lorsqu'on analyse des volumes plus importants, il faut pré-chauffer le bouillon d'enrichissement à 30 °C
---------------	--

- 7.3.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en ajoutant, dans des conditions aseptiques, 25 g ou ml (l'unité d'analyse) à 225 ml du bouillon Palcam. Passer au stomacher ou au mélangeur. Dans le cas des échantillons environnementaux, écouvillonner la surface spécifiée et tremper l'écouvillon de façon aseptique dans un volume de 10 ml d'agent neutralisant. Ajouter l'échantillon à 90 ml de bouillon Palcam.
- 7.3.3 Incuber le mélange enrichi et les témoins pendant 26 heures à 35°C.

#### **7.4 Enrichissement secondaire**

Transférer 1 ml de l'échantillon du bouillon Palcam dans 10 ml de bouillon UVM 2.  
Incuber à 35°C pendant 26 h.

#### **7.5 Protocole analytique**

- 7.5.1 Amener à la température de la pièce le nombre requis de *Listeria* plaquette-test.
- 7.5.2 Transférer 2 ml de l'échantillon de l'enrichissement secondaire dans l'éprouvette en verre.
- 7.5.3 Faire chauffer les échantillons sur une plaque chauffante ou dans un bain-marie à 80°C pendant 20 minutes.
- 7.5.4 Laisser refroidir et, en dedans de 1 heure après le chauffage, transférer 135 µl d'échantillon dans la Fenêtre-Échantillon de la plaquette-test *Listeria*.
- 7.5.5 Incuber à la température de la pièce pendant 20 minutes.
- 7.5.6 Un contrôle positif contenant des antigènes est fourni avec la trousse. Voir les instructions du fabricant pour la reconstitution et l'utilisation.
- 7.5.7 Si un contrôle négatif est requis, ajouter 135 µl de bouillon UVM 2 à une autre plaquette-test.

#### **7.6 Interprétation des résultats**

- 7.6.1 Observer le développement d'une ligne bleue dans la Fenêtre-Contrôle et dans la Fenêtre-Résultat.
- 7.6.2 Toute ligne bleue dans la Fenêtre-Résultat, même ténue, est considérée comme un résultat positif en autant qu'une ligne bleue est également observée dans la Fenêtre-Contrôle.
- 7.6.3 En de rares occasions, un excès d'antigènes flagellaires peut produire une intensité réaction dans la Fenêtre-Résultat avec aucune réaction dans la Fenêtre-Contrôle. Préparer une dilution 1:10 de l'échantillon chauffé avec du bouillon ULM 2 frais et re tester sur une nouvelle plaquette-test.
- 7.6.4 Si aucune ligne n'apparaît dans l'une et l'autre des fenêtres, une autre plaquette-test doit être préparée en utilisant le même extrait à condition qu'il ne soit pas vieux de plus d'heure.

#### **7.7 Étapes de confirmation**

Il faut procéder à des tests de confirmation en ensemençant des géloses sélectives et en suivant les procédures de la méthode MFHPB-30.

## 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.2 Holbrook, R., T.A. Briggs, J.A. Anderson, J.A. Blades and P.N. Sheard. 1993. Detection of *Listeria* species in foods in 43 hours using enrichment and the *Listeria* Clearview Immunoassay. 7<sup>th</sup> International Congress On Rapid Methods and Automation in microbiology and Immunology.
- 8.3 Holbrook, R., T. Briggs, J. Anderson, J. Blades and P.N. Sheard. 1994. A 43 hour test for detecting *Listeria* in foods using the Unipath Clearview Immunoassay. 81<sup>st</sup> Annual Meeting of the International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, Inc., San Antonio.
- 8.4 Parry, S.H., T. Briggs, J.A. Blades, M. Garni, and J. Piron. 1993. A rapid Clearview Immunoassay for the detection of *Listeria* species. 7<sup>th</sup> International Congress on Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology.
- 8.5 Seeliger, H.P.R. and D. Jones. 1986. Genus *Listeria* Pirie. In: Sneath, P.H.A., H.S. Mair, N.E. Sharp and J.G. Holt, (Eds): *Bergey's Manual of Bacteriology*. Williams & Wilkin Co. Baltimore.