



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**ISOLEMENT DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
DANS TOUS LES TYPES D'ALIMENTS  
ET LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX**

Franco Pagotto, Elaine Daley, Jeff Farber<sup>1</sup> et Don Warburton

Bureau des dangers microbiens  
Direction des aliments  
Repère postal : 2204A2  
Ottawa (Ont.) K1A 0L2  
Franco\_Pagotto@hc-sc.gc.ca  
Elaine\_Daley@hc-sc.gc.ca

**1. APPLICATION**

Cette méthode peut servir à la détection de *Listeria monocytogenes* viables dans les aliments (fruits de mer, produits laitiers, viande rouge, volaille, légumes, etc.) et permet d'établir s'il y a conformité avec les articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues peut servir aussi à analyser des échantillons environnementaux. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-30, datée de septembre 1998.

**2. PRINCIPE**

Cette méthode permet de déterminer la présence de *L. monocytogenes* viables dans le produit. Une portion du produit est enrichie d'abord dans un bouillon primaire et ensuite dans un bouillon sélectif, étalée sur une gélose précise et sur un autre milieu, et incubée pendant une période donnée à une température déterminée. On suppose que les *L. monocytogenes* viables se multiplient dans ces conditions et forment des colonies visibles qu'il est possible d'identifier. La méthode est fondée sur les méthodes de Lovett (7.1, 7.2), de Hitchins (7.2a) et de McClain et Lee (7.4), qui ont été modifiées à la lumière des données recueillies par Warburton et coll. (7.6, 7.7, 7.8) dans le cadre d'études comparatives. Dans la méthode modifiée, on a ajouté le bouillon de Fraser modifié (7.4), le milieu au chlorure de lithium, au phényléthanol et au moxalactame (7.3) et des géloses d'Oxford (7.6), d'Oxford modifiée (7.4) et de PALCAM (7.8). On pourra utiliser de nouvelles géloses chromatogènes et d'isolement de concert avec les milieux ci-dessus.

**3. DÉFINITIONS**

Voir l'Annexe A du volume 2.

**4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS**

4.1 Voir l'Annexe B du volume 2.

4.2 Pour prélever les échantillons environnementaux, procéder de la façon décrite dans la méthode MFLP-41.

## 5. MATÉRIEL ET PRODUITS SPÉCIAUX

**Bouillons de *Listeria* et géloses** (les milieux de base et les suppléments sont disponibles dans le commerce)

- 1) Bouillon d'enrichissement de *Listeria* (LEB)
- 2) Bouillon de Fraser modifié (MFB)
- 3) Gélose d'Oxford (OXA)
- 4) Milieu au chlorure de lithium, au phényléthanol et au moxalactame (LPM)
- 5) Gélose d'Oxford modifiée (MOX)
- 6) Gélose PALCAM (PAL)
- 7) Milieu chromatogène (suivre les consignes du fabricant pour la préparation et l'utilisation.)

<b>NOTE :</b>	La gélose d'Oxford qui sert à isoler <i>Listeria</i> utilise le cycloheximide comme agent sélectif. L'organisation qui détient le brevet sur cet antibiotique ne le produit plus et c'est pourquoi le cycloheximide ne sera plus disponible avant longtemps. Des fournisseurs de milieux comme Oxoid ont déjà produit des suppléments de remplacement pour leurs milieux. Il incombe toutefois aux utilisateurs de cette méthode de s'assurer que leurs données de validation internes satisfont à leurs critères. On peut obtenir du fabricant des données qu'il faudrait garder en dossier.
---------------	---

- 8) Cultures témoins (utiliser des souches ATCC ou l'équivalent)  
Témoins positifs : *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*,  
(*Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi* - optimal)
- 9) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent, mélangeur à tourbillons
- 10) Microscope
- 11) Étuves pouvant maintenir des températures de 30 °C et 35 °C.

<b>NOTE :</b>	Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les températures des études ou des bains-marie demeurent au niveau recommandé. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'étuve peut être à 35 +/- 1,0 °C. De même, les températures plus basses de 30 ou 25 °C peuvent être +/- 1,0 °C. Lorsqu'on recommande toutefois des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir les étuves ou les bains-marie à +/- 0,5 °C parce que les températures plus élevées peuvent être mortelles pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.
---------------	---

### **Milieux de confirmation et réactifs**

- 12) Bouillon de tryptose et gélose (TA)
- 13) Bouillon de trypticase-soja et gélose additionnés de 0,6 % d'extrait de levure (TSB-YE et TSA-YE)
- 14) Gélose au sang de cheval (gélose au sang de mouton - facultative)
- 15) Milieu pour l'étude de la motilité
- 16) Géloses ou bouillons de fermentation des glucides (mannitol, rhamnose et xylose). **Note :** Il est

possible de préparer ces produits biochimiques au moyen de troupes d'identification rapide (voir 6.8.1).

### **Facultatif**

- 17) Trousse d'identification rapide comme les troupes de Vitek ou API *Listeria* (Bio Mérieux Vitek, Inc.) Micro-ID *Listeria* (Organon Teknika Corp.) ou épreuve Accuprobe<sup>MD</sup> pour le *Listeria* (Gen-Probe; MFLP-88), ou l'équivalent
- 18) Solution de colorants de Gram
- 19) Peroxyde d'hydrogène à 3 % (catalase)
- 20) Produits biochimiques - dextrose, esculine, maltose,  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside
- 21) Disques de bêta-lysine (Remel)
- 22) Antisérum de *Listeria monocytogenes*

## **6. MARCHE À SUIVRE**

Analyser chaque unité d'échantillonnage séparément ou regrouper les unités d'analyse en composites selon le plan d'échantillonnage présenté dans le Tableau 4. Il faut compter une partie d'échantillon pour 9 parties de bouillon d'enrichissement stérile. On peut obtenir des données sur la distribution de *Listeria* en analysant séparément chaque unité d'analyse. Effectuer l'analyse conformément aux instructions qui suivent.

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

- 6.1.1 Sauf dans le cas des aliments de longue conservation, il faut garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5 °C) ou au congélateur, selon la nature du produit, jusqu'au moment de l'analyse. Faire décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort bactériennes.
- 6.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage aussitôt que possible après leur arrivée au laboratoire.

### **6.2 Préparation de l'analyse**

- 6.2.1 Avoir sous la main du bouillon stérile d'enrichissement de *Listeria* (LEB).
- 6.2.2 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant.

### **6.3 Préparation de l'échantillon**

Pour obtenir une unité d'analyse représentative, agiter les liquides ou les matières fluides jusqu'à homogénéité. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, constituer l'unité d'analyse en prélevant des portions à plusieurs endroits.

### **6.4 Méthode d'enrichissement (voir la Figure 1)**

Ajouter l'éponge utilisée pour prélever l'échantillon environnemental à 100 mL de LEB ou le composite comportant jusqu'à 10 éponges à 100 mL de LEB par éponge (voir MFLP-41B). Ajouter 25 g ou 25 mL de l'aliment (l'unité d'analyse), à 225 mL de LEB dans le bocal d'un mélangeur ou dans un sac Stomacher. On peut aussi ajouter 50 g de l'aliment à 450 mL de LEB. Dans le cas des échantillons composites, ajouter un des composites d'unités d'analyse décrits dans le Tableau 4 à un volume suffisant de LEB. Conserver un rapport d'une partie d'échantillon pour 9 parties de LEB. Déposer les écouvillons d'échantillons environnementaux dans des éprouvettes contenant 10 mL de

LEB. Bien mélanger ou broyer au Stomacher ou au vortex. Le LEB ensemencé peut être incubé dans le sac Stomacher ou dans l'éprouvette, ou encore, être transféré dans un Erlenmeyer stérile. Incuber le LEB ensemencé à 30 °C pendant 48 heures.

## 6.5 Enrichissement sélectif

- 6.5.1 Après 24 et 48 heures d'incubation, mélanger le LEB en faisant tourner manuellement ou au vortex. Ensemencer des volumes de 10 mL de bouillon de Fraser modifié (MFB) avec 0,1 mL de la culture LEB. Incuber pendant 24 à 26 heures à 35 °C.

**CONSEIL PRATIQUE :** Après 20 à 24 heures, mélanger le MFB au vortex et incuber encore 2 à 6 heures avant d'interpréter la réaction. L'interprétation après 26 heures peut réduire considérablement le nombre d'ensemencements à réaliser après 48 heures.

- 6.5.2 Si la culture MFB est positive, l'étaler en stries sur des géloses. Un bouillon positif prend une couleur foncée et peut être noir, brun foncé ou vert foncé. Un bouillon négatif conserve la couleur paille du bouillon fraîchement préparé. Si la culture est négative, l'incuber pendant encore 24 heures puis, si elle devient positive, l'étaler en stries sur des géloses. Passer à l'étape 6.6.

## 6.6 Méthode d'isolement

- 6.6.1 Après 24 et 48 heures, étaler le bouillon MFB positif en stries sur deux géloses distinctes (l'étalement en stries du LEB est facultatif mais préférable si l'on veut déceler tous les *Listeria*). Utiliser une gélose d'Oxford (OXA) et l'une des géloses suivantes : gélose au chlorure de lithium, au phényléthanol et au moxalactame (LPM), gélose d'Oxford modifiée (MOX) ou gélose de PALCAM (PAL). Incuber les géloses LPM à 30 °C pendant 24 à 48 heures et les géloses OXA, MOX et PAL à 35 °C pendant 24 à 48 heures.

**CONSEIL PRATIQUE :** On peut utiliser d'autres milieux avec deux géloses sélectives (voir 6.5).

- 6.6.2 Géloses LPM - Pour repérer les colonies suspectes sur les géloses LPM, examiner les boîtes au moyen d'un faisceau de lumière blanche orienté de manière à toucher le fond de la boîte à un angle de 45° et assez puissant pour bien éclairer la boîte. Si la transillumination est optimale, les colonies de *Listeria* les plus isolées et les plus grosses (âgées de 48 heures) ont l'aspect de petites piles blanchâtres de verre concassé et présentent 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. Si la croissance est presque confluyente, on peut observer un reflet bleu-gris iridescent et homogène.
- 6.6.3 Géloses OXA et MOX - Après 24 heures, *L. monocytogenes* forme des colonies noires de 1 mm de diamètre entourées d'un halo noir. Après 48 heures, on observe des colonies noires de 2 à 3 mm de diamètre entourées d'un halo noir et dont le centre est affaissé. Les colonies peuvent aussi présenter une couleur 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* sans la coloration noire caractéristique. Certaines souches de *Listeria* autres que *L. monocytogenes* sont inhibées par ce milieu s'il est incubé à 35 °C.
- 6.6.4 Géloses PAL - Les colonies de *L. monocytogenes* ont une coloration gris-vert et mesurent environ 2 mm de diamètre. Leur centre est noir et affaissé et elles sont entourées d'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.

- 6.6.5 Gélose chromatogène - On peut utiliser de nouvelles géloses chromatogènes et d'autres géloses d'isolement, mais de concert avec les milieux ci-dessus. Suivre les consignes du fabricant pour les préparer et les utiliser.

## 6.7 Méthode d'identification - Confirmation

- 6.7.1 Si les colonies sont bien isolées sur les géloses sélectives : Prélever au moins cinq colonies caractéristiques de chaque gélose sélective pour les déposer sur de la gélose au sang de cheval (comme dans 6.7.2). Si les colonies ne sont PAS bien isolées sur les géloses sélectives : Prélever au moins cinq colonies caractéristiques de chaque gélose sélective pour les déposer sur de la gélose au tryptose (TA) ou de la gélose trypticase-soja avec de l'extrait de levure à 0,6 % (TSA-YE) en formant des stries pour la séparation. Incuber les géloses à 30 °C pendant 24 à 48 heures ou jusqu'à ce que la croissance soit satisfaisante. Examiner les boîtes sous l'éclairage déjà décrit en 6.6.2 pour déceler les colonies caractéristiques.

### CONSEIL PRATIQUE :

Il est possible de confirmer la présence de *Listeria* et la spéciation de *L. monocytogenes* en utilisant la motilité, l'hémolyse et des géloses 3 glucides (mannitol, rhamnose et xylose). D'autres épreuves biochimiques sont facultatives. Des trousse d'identification rapide peuvent aider à renforcer la confirmation de ces résultats et à distinguer les différentes souches de *Listeria* (voir 6.8.1).

#### 6.7.2 Hémolyse :

Quadriller le fond de boîtes de gélose au sang de cheval de façon à obtenir de 20 à 25 carrés. Prélever des colonies caractéristiques des géloses sélectives (si les colonies sont bien isolées) ou des géloses TA ou TSA-YE (si elles sont ensemencées de façon à assurer leur pureté) et ensemencer les géloses de sang de cheval par piqûre à raison d'une culture par carré. Ensemencer les géloses au sang, la gélose d'analyse de la motilité et les géloses aux glucides<sup>1</sup> simultanément à partir de la même colonie. Il faut s'assurer que chaque colonie est placée au même endroit dans tous les carrés. Il faut toujours ensemencer par piqûre des témoins positifs et négatifs (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. innocua*). Incuber pendant 24 heures à 35 °C. <sup>1</sup>**Note :** On peut remplacer les géloses aux glucides par des trousse d'identification rapide (voir 6.8.1).

Examiner par transillumination avec un éclairage intense les géloses au sang ensemencées par piqûre (tenir la gélose de telle façon que la lumière provient de l'arrière).

*L. monocytogenes* produit une zone d'hémolyse légère au point de piqûre. *L. innocua* ne produit aucune zone d'hémolyse tandis que *L. ivanovii* produit une zone franche d'hémolyse.

#### 6.7.3 Motilité :

Gélose : Ensemencer le milieu d'analyse de la motilité à partir de la gélose sélective TA ou TSA-YE. (Ensemencer la gélose au sang et la gélose aux glucides en même temps (voir 6.7.2).) Incuber pendant jusqu'à 48 heures à la température de la pièce. Observer tous les jours. Seules les cellules de *Listeria* produisent une croissance typique en forme de parapluie.

et/ou

Montage humide : Prélever au moins une colonie caractéristique sur chacune des géloses sélectives, TA ou TSA-YE. Inoculer les bouillons de TSB-YE et incuber jusqu'au lendemain à 30 °C. Transférer une pleine anse des cultures dans un bouillon TSB-YE frais et incuber à 25 °C pendant 6 heures. Déposer une goutte de chaque culture de 6 heures sur une lamelle de verre et examiner la motilité typique de *Listeria* au moyen d'un microscope à contraste de phase muni d'un objectif à

immersion. Les *Listeria* ressemblent à des bâtonnets fins, courts, qui bougent par culbute. Il faut toujours les comparer à une culture de *Listeria* connue. Les cocci, les gros bâtonnets et les bâtonnets qui se déplacent rapidement par des mouvements natatoires ne sont pas des *Listeria*.

**CONSEIL PRATIQUE :**

L'épreuve de dépistage de la motilité peut être plus certaine lorsqu'on utilise la gélose. Il faudrait ensemencer la gélose d'analyse de la motilité en même temps que la gélose au sang et les géloses aux glucides, de la façon décrite ci-dessus.

6.7.4 Utilisation des glucides

Géloses Quadriller le fond des boîtes de gélose aux glucides (mannitol, rhamnose et xylose) de façon à obtenir de 20 à 25 carrés. Prélever des colonies caractéristiques des géloses sélectives ou des géloses TA ou TSA-YE et ensemencer les géloses par piqûre à raison d'une culture par carré. Il faut s'assurer que chaque colonie est placée au même endroit dans tous les carrés. Il faut toujours préparer des témoins positifs et négatifs (*L. ivanovii*, *L. monocytogenes* et *L. grayi*). Voir les conseils au tableau 1. Incuber pendant 24 heures à 35 °C.

et/ou

Bouillons Utiliser la culture sur TSB-YE pour ensemencer des bouillons pourpres additionnés de solutions de dextrose, d'esculine, de maltose, de mannitol<sup>1</sup>, de rhamnose<sup>2</sup>, d'α-méthyl-D-mannoside et de xylose<sup>3</sup> à 0,5 %. Incuber à 35 °C pendant 7 jours. Examiner les milieux tous les jours. *Listeria* acidifie le milieu sans dégager de gaz ou ne produit aucune réaction. Pour connaître les caractéristiques de fermentation des glucides des diverses espèces de *Listeria*, consulter le Tableau 1. Toutes les espèces de *Listeria* devraient fermenter le dextrose, l'esculine et le maltose et toutes les espèces de *Listeria*, à l'exception de *L. grayi* et de *L. murrayi*, devraient être mannitol-négatives.

**6.8 Méthode d'identification - Épreuves facultatives**

6.8.1 Trousses d'identification rapide

Trousses d'identification rapide comme les épreuves Vitek ou API *Listeria* (Bio Mérieux Vitek, Inc.) Micro-ID *Listeria* (Organon Teknika Corp.) ou l'épreuve *Listeria* Accuprobe<sup>MD</sup> (Gen-Probe) ou l'équivalent. Suivre les consignes du fabricant pour les utiliser.

6.8.2 Catalase

Soumettre une colonie caractéristique à une épreuve de dépistage de la catalase. Transférer une colonie sur une lame de verre propre et ajouter une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3 %. La formation de bulles indique une réaction positive. Les cellules de *Listeria* sont catalase-positives. Éviter de choisir des colonies de gélose contenant du sang, car elles peuvent produire un résultat faussement positif.

6.8.3 Coloration de Gram Le *Listeria* est un petit bâtonnet Gram-positif.

6.8.4. Épreuve de CAMP Sur une gélose au sang de mouton, étaler en stries verticales des isolats frais de souches de *Staphylococcus aureus* et de *Rhodococcus equi* β-hémolytiques. Espacer les stries verticales de manière à pouvoir étaler les souches à l'étude en stries horizontales sans toucher aux stries verticales. Après 24 à 48 heures d'incubation à 35 °C, rechercher les zones d'hémolyse à proximité des stries verticales.

6.8.4.1 L'hémolyse de *L. monocytogenes* et de *L. seeligeri* est plus prononcée à proximité

de la strie de *Staphylococcus* et celle de *L. ivanovii* est plus prononcée à proximité de la strie de *Rhodococcus*. Les autres espèces de *Listeria* sont Camp-négatives. L'épreuve permet de distinguer *L. ivanovii* de *L. seeligeri* et permet également de distinguer une souche de *L. seeligeri* faiblement hémolytique de *L. welshimeri*.

6.8.4.2 On peut également réaliser l'épreuve de CAMP au moyen de disques stériles de  $\beta$ -lysine vendus dans le commerce et qui renferment le facteur *S. aureus* (Remel 021-120). Déposer un disque de  $\beta$ -lysine au centre d'une gélose au sang de mouton et ensemercer la gélose en stries radiales au moyen de 4 ou 5 cultures de *Listeria* sans toucher le disque avec l'inoculum. Après 18 à 24 heures d'incubation à 35 °C, on peut observer une réaction très nette entre le disque et les cultures de *L. monocytogenes* ou de *L. seeligeri*. *L. ivanovii* est fortement hémolytique et produit une zone claire de  $\beta$ -hémolyse tout le long de la strie.

6.8.5 Sérologie - Suivre les consignes du fabricant jointes aux antisérums.

## 6.9 Interprétation des résultats - Identification de l'espèce

Toutes les espèces de *Listeria* se présentent sous la forme de petits bâtonnets mobiles Gram-positifs. Elles sont catalase-positives, uréase-négatives et acidifient la pente et le culot du milieu TSI sans dégager de H<sub>2</sub>S. Les *Listeria* fermentent le dextrose, l'esculine et le maltose; certaines espèces fermentent également le mannitol, le rhamnose et le xylose et acidifient les milieux. Toutes les espèces montrent une réaction +/+ dans le bouillon RM-VP. *L. grayi* et *L. murrayi* sont les deux seules espèces à fermenter le mannitol et *L. murrayi*, la seule espèce à réduire les NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

*L. monocytogenes* et *L. ivanovii* hémolysent les géloses au sang de cheval et au sang de mouton; *L. seeligeri* est faiblement hémolytique dans ces milieux. Les trois espèces donnent une réaction positive à l'épreuve de CAMP. *L. monocytogenes* est la seule des trois espèces qui ne fermente pas le xylose mais fermente le rhamnose. L'épreuve de CAMP permet de distinguer *L. ivanovii* de *L. seeligeri*, puisque *L. seeligeri* produit une zone d'hémolyse prononcée uniquement à proximité de la strie de *Staphylococcus* et que *L. ivanovii* produit une zone d'hémolyse prononcée à proximité de la strie de *R. equi*.

*L. innocua* se différencie de *L. monocytogenes* uniquement par son incapacité à hémolyser la gélose au sang et par une épreuve de Camp négative. Si l'on ne procède pas à l'épreuve de CAMP, on risque de confondre *L. welshimeri*, qui est rhamnose-négatif, et *L. seeligeri*, qui est faiblement hémolytique.

On trouvera dans les tableaux ci-joints un sommaire des caractéristiques biochimiques et sérologiques, ainsi que de la pathogénicité des différentes espèces de *Listeria*. Il faut recueillir toutes les données avant de déterminer les espèces microbiennes.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

- 7.1 Lovett, J. 1987. *Listeria* isolation. Chapitre 29. Bacteriological Analytical Manual (BAM). AOAC. Arlington, Virginie.
- 7.2 Lovett, J. et A.D. Hitchins. 1988. *Listeria* isolation. Chapitre 29. Révisé le 13 octobre 1988. Bacteriological Analytical Manual (BAM). AOAC. Arlington, Virginie.
- 7.2a Hitchins, A.D. 1995. *Listeria monocytogenes*. Chapitre 10. Révisé 1998. Bacteriological Analytical Manual (BAM). AOAC International. Gaithersburg, MD.
- 7.3 McClain, D. et W.H. Lee. 1988. Development of USDA-FSIS Method for Isolation of *Listeria monocytogenes* from Raw Meat and Poultry. JAOAC. 71(3):660-664.
- 7.4 McClain, D. et W.H. Lee. 1988. FSIS Method for the Isolation and Identification of *Listeria*

*monocytogenes* from Processed Meat and Poultry Products. USDA-FSIS Laboratory Communication No. 57. Révisé le 24 mai 1989.

- 7.5 Seeliger, H.P.R. et D. Jones. 1986. The Genus *Listeria*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2. Williams and Wilkins, Baltimore. 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**(2):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**(9):669-676.
- 7.8 Warburton, D.W., J.M. Farber, C. Powell, N.P. Tiwari, S. Read, R. Plante, T. Babiuk, P. Laffey, T. Kauri, P. Mayers, M.-J. Champagne, T. Hunt, P. LaCasse, K. Viet, R. Smando et F. Coates. 1992. Comparison of Methods for Optimum Detection of Stressed and Low Levels of *Listeria monocytogenes*. J. Food Microbiol. **9**:127-145.

## 8. MILIEUX

### 8.1 Gélose au sang

Préparer les géloses au sang aussitôt que possible après avoir reçu du sang frais; utiliser la base pour gélose au sang ou, de préférence, une gélose trypticase-soja contenant du sang de cheval défibriné à 7 %. Réhydrater et stériliser les milieux selon les instructions du fabricant. La gélose et le sang doivent tous deux avoir atteint une température de 45-50 °C avant d'être mélangés et coulés dans des boîtes de Petri. On peut aussi utiliser des géloses commerciales. Les géloses se conservent à 4 °C pendant un mois.

Préparer et conserver de la même manière les géloses au sang de mouton employées dans l'épreuve de CAMP.

### 8.2 Bouillon et gélose de fermentation des glucides

#### 8.2.1 Bouillon de fermentation des glucides

Base de bouillon pourpre	16 g
Eau distillée	900 mL

Déposer des volumes de 9 mL dans des tubes de 16 x 125 mm contenant une cloche de Durham. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Préparer des solutions à 5 % de tous les glucides, à l'exception de l'esculine, et les stériliser par filtration. Ajouter 1 mL de solution de glucide à 9 mL de base de bouillon de manière à obtenir une concentration finale de 0,5 % de glucide.

Ajouter l'esculine directement à la base de bouillon pour produire une solution à 0,5 % et stériliser à 115 °C pendant 15 minutes. À la température ambiante, la solution d'esculine à 5 % est gélatineuse et ne peut être prélevée au moyen d'une pipette.

#### 8.2.2 Gélose de fermentation des glucides

a. Milieu de base :

Base de bouillon pourpre	16 g
Pourpre de bromocrésol à 1,6 % (aqueux)	1 mL
Gélose	16 g
Eau distillée	950 mL



b. Solution de glucides :

Stériliser par filtration 100 mL de chacune des solutions aqueuses de rhamnose, de mannitol et de xylose à 20 %. Stériliser la base à 121 °C pendant 15 minutes. Laisser refroidir, ajouter les 50 mL de solution glucidique stérile, puis couler en couches épaisses. Les géloses se conservent à 4 °C pendant au moins 2 ou 3 semaines. Chaque laboratoire doit valider les périodes de garde plus longues.

**8.3 Bouillon d'enrichissement de *Listeria* (LEB)**

a. Milieu de base :

Protéose peptone	5 g
Tryptose	5 g
Poudre Lab lemco (Oxoid)	5 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,35 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12 g
Esculine	1 g
<sup>1</sup> Acide nalidixique à 2 % dans du NaOH 0,1 M	1 mL
Eau distillée	1000 mL

<sup>1</sup> **Note :** La quantité d'acide nalidixique indiquée ici correspond à la moitié de la quantité recommandée dans la formulation initiale.

Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Ne pas surchauffer; refroidir immédiatement après le retrait du stérilisateur et conserver à 4 °C. Le LEB est disponible sur le marché sous le nom de formulation UVM 1.

b. Solution d'acriflavine :

Stériliser par filtration 25 mL de solution aqueuse d'acriflavine à 1,2 %. La solution se conserve à 4 °C pendant 2 mois.

Le jour même de l'emploi, ajouter 1,0 mL de solution d'acriflavine à 1000 mL de milieu de base.

**8.4 Milieu au chlorure de lithium, au phényléthanol et au moxalactame (LPM)**

a. Milieu de base :

Gélose au phényléthanol	35,5 g
Anhydride de glycine	10,0 g
Chlorure de lithium	5,0 g
Eau distillée	1000 mL

b. Solution de moxalactame :

Moxalactame (sel d'ammonium ou de sodium, Sigma)	1 g
Tampon au phosphate de potassium, 0,1 M, pH 6,0	100 mL

Stériliser par filtration. Conserver la solution congelée en volumes de 2 mL.

Stériliser le milieu de base à 121 °C pendant 15 minutes. Refroidir à 45-50 °C et ajouter 2 mL de solution de moxalactame. Couler dans des boîtes de Petri à raison de 12-15 mL par boîte et conserver à 4 °C. Le milieu de base ne peut être préparé à l'avance pour ensuite être réchauffé.

**8.5 Bouillon de fraser modifié (MFB)**

a. Milieu de base :

Protéose peptone	5 g
Tryptose	5 g

Poudre Lemco lab (Oxoid)	5 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,35 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12 g
Esculine	1 g
Chlorure de lithium	3 g
Acide nalidixique (à 2 % dans de l'eau distillée)	1 mL
Eau distillée	1000 mL

b. Solutions-mères :

- Acriflavine à 0,25 % dans de l'eau distillée
- Citrate d'ammonium ferrique (5,0 % dans de l'eau distillée)

Stériliser les solutions par filtration. Les solutions se conservent à 4 °C pendant 2 mois.

Répartir le milieu de base en volumes de 10 mL dans des tubes de 16 x 150 mm. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Ne pas surchauffer; refroidir immédiatement après le retrait des tubes du stérilisateur et conserver à 4 °C. Avant d'utiliser, ajouter à chaque tube 0,1 mL de chacune des solutions-mères.

OU :

Répartir le milieu de base en volumes de 100 mL dans des flacons à bouchon vissé et stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Refroidir immédiatement après la stérilisation et conserver à 4 °C. Juste avant d'utiliser, ajouter 1,0 mL de chacune des solutions-mères dans chaque flacon de 100 mL et bien mélanger. Répartir aseptiquement en volumes de 10 mL dans des tubes de 16 x 150 mm stérilisés au préalable.

## 8.6 **Gélose d'Oxford modifiée (MOX)**

La gélose d'Oxford modifiée est une gélose sélective pour *Listeria* qui a été légèrement modifiée (Préparation Oxford).

a. Milieu de base :

Base de gélose au sang Columbia (selon la marque utilisée)	39-44 g/L
Gélose	2 g/L
Esculine	1 g/L
Citrate d'ammonium ferrique	0,5 g/L
Chlorure de lithium	15 g/L
Solution de colistine à 1 %; voir b.	1 mL
Eau distillée	1 000 mL

Réhydrater le milieu en brassant constamment avec un agitateur magnétique et ajuster le pH à 7,2 au besoin. Stériliser à 121 °C pendant 10 minutes, mélanger de nouveau et refroidir rapidement à 46 °C dans un bain-marie.

b. Solution de colistine :

Colistine, sulfonate de méthane	1 g
Tampon au phosphate de potassium 0,1 M, pH 6,0	100 mL

La solution de colistine n'est pas stérilisée. La conserver à -20 °C en portions aliquotes de 3 à 5 mL.

c. Solution de moxalactame :

Moxalactame (sel de sodium ou d'ammonium)	1 g
Tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 6,0	100 mL

Stériliser par filtration et conserver à -20 °C en portions aliquotes de 2 mL. Ajouter 2 mL de solution de moxalactame au milieu de base, bien mélanger et couler à raison de 12 mL par boîte. Le milieu de base et les solutions sont disponibles sur le marché.

### 8.7 Milieu d'étude de la motilité

Réhydrater et stériliser le milieu selon les instructions du fabricant. Répartir en volumes de 6 mL dans des tubes à bouchon vissé de 16 x 125 mm ou en volumes de 3 mL dans des tubes à bouchon vissé de 13 x 100 mm.

### 8.8 Gélose d'Oxford (OXA)

a. Milieu de base :

Base de gélose Columbia	39,0 g
Esculine	1,0 g
Citrate d'ammonium ferrique	0,5 g
Chlorure de lithium	15,0 g
Cycloheximide	0,4 g
Colistine	0,02 g
Acriflavine	0,005 g
Eau distillée ou désionisée	1000 mL

Suspendre les ingrédients dans l'eau et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Refroidir à 50 °C.

b. Suppléments :

Céfotétan	0,002 g
Fosfomycine	0,01 g

Ajouter le céfotétan et la fosfomycine ou les suppléments du fabricant, bien mélanger et couler dans des boîtes de Petri. Ce milieu est vendu dans le commerce.

### 8.9 Gélose de PALCAM (PAL)

a. Milieu de base :

Peptone	23,0 g
Amidon	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	13,0 g
Mannitol	10,0 g
Citrate d'ammonium ferrique	0,5 g
Esculine	0,8 g
Dextrose	0,5 g
Chlorure de lithium	15,0 g
Rouge de phénol	0,08 g
Eau distillée ou désionisée	1000 mL

Suspendre les ingrédients dans l'eau et ajuster le pH à  $7,2 \pm 0,1$  au besoin. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Refroidir à 50 °C, ajouter aseptiquement les suppléments du fabricant, qui contiennent du sulfate de polymixine-B, de la ceftazidime et de l'acriflavine, puis couler dans des boîtes de Petri.

### 8.10 Bouillon et gélose au tryptose pour les tests de confirmation et de sérologie

Tryptose (Difco)	20,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g

Dextrose	1,0 g
Gélose (omettre pour la préparation du bouillon)	15,0 g
Eau distillée	1000 mL

Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Préparer des géloses à pente fortement inclinée.

**8.11 Bouillon trypticase-soja additionné d'extrait de levure à 0,6 % (TSB-YE)**

Bouillon trypticase-soja	30,0 g
Extrait de levure	6,0 g
Eau distillée	1000 mL

Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes et répartir dans des tubes de 16 x 100 mm.

**8.12 Gélose trypticase-soja additionnée d'extrait de levure à 0,6 % (TSA-YE)**

Gélose trypticase-soja	40,0 g
Extrait de levure	6,0 g
Eau distillée	1000 mL

Répartir dans des tubes à bouchon vissé, stériliser à 121 °C pendant 15 minutes et couler en géloses inclinées.

Tableau 1

Caractéristiques distinctives des espèces du genre *Listeria*<sup>a</sup>

Caractéristiques	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>
Coloration de Gram	) <sup>b</sup>	)	)	)	)	)	)
β-hémolyse	+ <sup>c</sup>	)	+	)	+ <sup>d</sup>	)	)
Mannitol	)	)	)	)	)	+	+
L-rhamnose	+	d	)	d	)	)	d
D-xylose	)	)	+	+	+	)	)
Épreuve de CAMP ( <i>S. aureus</i> )	+ <sup>e</sup>	)	+	)	)	)	)
Épreuve de CAMP ( <i>R. equi</i> )	)	)	)	)	+	)	)
Acidification de :	d	)	)	)	)	+	+
L-arabinose	)	)	)	)	d	+	+
dextrine	)	)	)	)	)	)	)
galactose	d	+	)	)	+	+	+
glycogène	)	)	)	)	)	+	+
lactose	d	d	)	)	d	)	)
D-lyxose	)	)	)	)	)	)	)
mélézitose	+	+	)	)	+	+	+
mélibiose	+	+	) <sup>f</sup>	+	)	)	)
α-méthyl-D-glucoside	d	)	)	)	)	)	)
α-méthyl-D-mannoside	)	d	)	)	d	)	)
sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
amidon soluble	)	)	)	)	)	)	)
sucrose	)	)	)	)	)	)	)
Voges-Proskauer	+	+	)	)	+	)	)
Hydrolyse :	d	d	)	)	)	)	)
cellulose	d	d	)	)	+	)	)
hippurate	+	+	)	)	+	+	+
amidon	)	)	)	)	)	)	+
Lécithinase	+	)	)	)	+	)	)
Phosphatase	)	)	)	)	)	)	)
Réduction des NO <sub>3</sub> en NO <sub>2</sub>	)	)	)	)	)	)	)
Pathogénicité pour la souris	)	)	)	)	)	)	)

<sup>a</sup> Adapté d'après la référence 7.5.

<sup>b</sup> Symboles standard : (+) positif; ( ) négatif. + : 90 % et plus de positifs; ) : 90 % et plus de négatifs; d : entre 11 et 89 % des souches sont positives.

<sup>c</sup> Toutes les souches de *L. monocytogenes* ne sont pas nécessairement bêta-hémolytiques - la souche ATCC 15313 n'hémolyse pas le sang de cheval, de mouton ou de bœuf.

<sup>d</sup> Les souches de *L. ivanovii* présentent habituellement une zone d'hémolyse très large ou des zones multiples d'hémolyse.

<sup>e</sup> Des 30 souches étudiées, seule la souche type ATCC 15313 n'a pas donné de réaction positive.

<sup>f</sup> Des 10 souches étudiées, une seule a donné une réaction positive.

**Tableau 2**

**Sérotype, activité hémolytique et virulence pour la souris de différentes espèces de *Listeria***

Espèce	Sérotype	Hémolyse de piqûre au sang de cheval (7 %)	Virulence pour la souris
<i>L. monocytogenes</i>	½a, ½b, ½c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4b(x), 4c, 4D, 4e, «7»	+	+
<i>L. ivanovii</i>	5	+	+
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, in*	)	)
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b	)	)
<i>L. seeligeri</i>	½b, 4c, 4d, 6b, In*	+	)

\*in = Indéterminé

**Tableau 3**

**Réactions de différentes espèces de *Listeria* à l'épreuve de Camp**

Espèce	Réaction d'hémolyse	
	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	)
<i>L. ivanovii</i>	)	+
<i>L. innocua</i>	)	)
<i>L. welshimeri</i>	)	)
<i>L. seeligeri</i>	+	)

Tableau 4

**Plan d'échantillonnage pour la recherche de *L. monocytogenes* (LM)  
dans les aliments prêts-à-manger<sup>1</sup> (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 <sup>2</sup> )	5 unités d'échantillonnage (100 g ou 100 mL chacune) prélevées au hasard dans chaque lot.	unités d'analyse <sup>4</sup> de 5 x 10 g ou de 2 x 25 g analysées séparément ou comme échantillon composite.	<b>ENRICHISSEMENT SEULEMENT</b>
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, sandwiches 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 <sup>4</sup> de 5 x 5 g analysées séparément ou comme échantillon composite.	<b>ENRICHISSEMENT SEULEMENT</b>
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 <sup>3</sup> (p. ex., fruits de mer cuits, salades emballées, crème glacée, fromage à pâte ferme, 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 <sup>4</sup> de 5 x 10 g analysées séparément.  Lorsqu'il est nécessaire de faire un enrichissement <sup>4</sup> 5x5 g unités d'analyse <sup>5</sup> sont analysées séparément ou comme échantillon composite.	<b>ENSEMENCEMENT DIRECT</b>  <b>ENRICHISSEMENT</b>

<sup>1</sup> 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*.

<sup>2</sup> Pour le moment, ce produit ne se retrouve pas couramment sur le marché canadien.

<sup>3</sup> 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.

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

<sup>5</sup> 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.

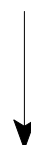
**Figure 1**

**Schéma de la méthode d'isolement**

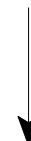
Mélanger ou broyer au Stomacher dans le bouillon LEB.  
Incuber à 30 °C pendant 48 heures.



Après 24 et 48 heures, transférer 0,1 mL  
de LEB dans le MFB. Incuber à 35 °C pendant 24 à 48 heures.  
Consigner les réactions observées dans **tous** les tubes.  
Étaler le LEB en stries sur des géloses (facultatif mais préférable).



Étaler en stries  
le MFB positif sur une gélose sélective.  
Incuber de nouveau le bouillon MFB négatif pendant encore 24 heures.  
Incuber les plaques pendant 24 à 48 heures.



Tests de confirmation

motilité,  
hémolyse,  
mannitol, rhamnose et xylose;  
autres produits biochimiques ou  
trousses d'identification rapide,  
selon le cas.