

COMPASS® *LISTERIA* AGAR

DETECTION ET DENOMBREMENT DE *LISTERIA* SPP. ET *LISTERIA MONOCYTOGENES*

1 DOMAINE D'UTILISATION

Méthode alternative validée ISO 16140-2 pour la recherche de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp.

La méthode COMPASS® *Listeria* est employée dans le cadre d'une méthode alternative rapide de recherche de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp, dans les produits d'alimentation humaine et échantillons de l'environnement.

Elle présente une seule étape d'enrichissement sélectif en bouillon Fraser ½, suivi d'un repiquage sur COMPASS® *Listeria* Agar. L'enrichissement peut être réalisé à 37°C pendant 18 à 24 heures, ou à 30°C pendant 22 à 28 heures.

La méthode est certifiée NF VALIDATION, selon le protocole de validation NF EN ISO 16140-2 de 2016 pour tous produits d'alimentation humaine et les échantillons de l'environnement de production industrielle. La méthode de référence utilisée pour la validation est la norme NF EN ISO 11290-1 de 2017.



BKR 23/02-11/02,
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE
POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification <http://nf-validation.afnor.org>

Se référer au certificat disponible sur le site NF VALIDATION pour la date de fin de validité de la méthode. Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les prises d'essai supérieures à 25 g n'ont pas été testées.

Méthode alternative validée ISO 16140-2 pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes*

La méthode COMPASS® *Listeria* est aussi employée dans le cadre d'une méthode alternative rapide de dénombrement de *L. monocytogenes* dans les produits d'alimentation humaine et échantillons de l'environnement, par ensemencement en surface ou en profondeur.



BKR 23/05-12/07
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE
POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification <http://nf-validation.afnor.org>

Se référer au certificat disponible sur le site NF VALIDATION pour la date de fin de validité de la méthode.

Méthode normalisée de recherche et de dénombrement de *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp

La formulation de la gélose COMPASS® *Listeria* Agar correspond à celle préconisée dans les normes internationales NF EN ISO 11290-1 et NF EN ISO 11290-2.

COMPASS® *Listeria* Agar s'inscrit comme premier milieu d'isolement obligatoire du protocole opératoire de recherche de *L. monocytogenes* et de *Listeria* spp, ainsi que comme milieu unique du protocole opératoire de dénombrement de *L. monocytogenes* et de *Listeria* spp.

2 HISTORIQUE

En 1991, MENGAUD *et al.* ont identifié une phospholipase C phosphatidyl-inositol spécifique (PI-PLC) produite par les deux espèces de *Listeria* pathogènes, *L. ivanovii* et *L. monocytogenes*, seule cette dernière l'étant pour l'homme. Ils ont suggéré que cette enzyme pouvait constituer un facteur de virulence. La même année, NOTERMANS *et al.* développèrent une méthode en double couche pour détecter la PI-PLC en milieu gélosé à l'aide de L- α -phosphatidylinositol. Dans ces conditions, les deux espèces de *Listeria* pathogènes forment des colonies entourées d'un halo opaque, alors que les colonies des espèces non pathogènes n'en présentent pas. Par ailleurs, l'utilisation d'un substrat chromogène, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside, permet de remplacer l'esculine qui était utilisée dans les milieux Oxford et PALCAM. La présence d'esculinase (β -glucosidase) peut ainsi être mise en évidence par la formation d'un précipité bleu sur la colonie. Le mélange sélectif contenu dans le milieu, permet l'inhibition de la presque totalité des bactéries contaminantes.

En associant ces trois principes, **COMPASS® *Listeria* Agar** permet la mise en évidence de colonies bleues entourées d'un halo opaque, bien typiques de *Listeria monocytogenes* et de certaines souches de *Listeria ivanovii*, et de colonies bleues sans halo, caractéristiques des autres espèces appartenant au genre *Listeria*.

3 PRINCIPES

Les peptones et les facteurs de croissance (extrait de levure, pyruvate de sodium et sulfate de magnésium) favorisent la croissance de *Listeria monocytogenes*.

Les *Listeria* hydrolysent le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside (ou X- β -glucoside). Le produit résultant subit une dimérisation oxydative qui se traduit par la formation d'un précipité bleu sur les colonies.

Le phosphatidyl-inositol est utilisé comme substrat pour la détection de la phospholipase C de *Listeria monocytogenes*. Lorsqu'il est dégradé, un précipité opaque apparaît autour des colonies.

Le chlorure de lithium et le mélange sélectif constitué de plusieurs antibiotiques et d'un antifongique assurent l'inhibition de la microflore secondaire.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

COMPASS® *Listeria* Agar

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande	18,00 g
- Tryptone	6,00 g
- Extrait de levure.....	10,00 g
- Pyruvate de sodium	2,00 g
- Glucose	2,00 g
- Glycérophosphate de magnésium	1,00 g
- Sulfate de magnésium anhydre	0,50 g
- Chlorure de sodium	5,00 g
- L- α -phosphatidyl-inositol	2,00 g
- Hydrogénophosphate disodique anhydre.....	2,50 g
- Chlorure de lithium.....	10,00 g
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside	0,05 g
- Acide nalidixique.....	0,02 g
- Ceftazidime.....	0,02 g
- Polymyxine B (sulfate)	76700 UI
- Amphotéricine (ou Cycloheximide 0,05 g)	0,01 g
- Agar agar bactériologique.....	12,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,2 \pm 0,2.

5 PREPARATION

Déshydraté et suppléments associés

- Mettre en suspension 71,9 g de milieu de base déshydraté (BK192) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
 - Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
 - Répartir en flacons (100 mL ou multiples de 100 mL).
 - Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
 - Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- ✓ **Reconstitution :**
71,9 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121°C
- Reprendre le lyophilisat du supplément sélectif (BS071) en y ajoutant aseptiquement 10 mL d'eau distillée stérile.
 - Ajouter stérilement 1 mL de supplément pour 100 mL de base et homogénéiser.
 - Au moment de l'utilisation du milieu complet, ajouter 3 mL de supplément d'enrichissement (BS070) ramené à température ambiante.
 - Homogénéiser et couler en boîtes.

Kit à reconstituer (BT008) :

- Faire fondre les flacons de 200 mL de milieu de base (R1) pendant le minimum de temps nécessaire à leur reliqufaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Reprendre le lyophilisat du supplément sélectif (R2) en y ajoutant 2 mL d'eau distillée stérile.
- Dans chaque flacon de 200 mL, ajouter stérilement 2 mL de supplément sélectif et homogénéiser.
- Au moment de l'utilisation du milieu complet, ajouter 6 mL de supplément d'enrichissement (R3) ramené à température ambiante.
- Homogénéiser et couler en boîtes.

NOTE :

Le milieu complet peut être maintenu en surfusion pendant 4 heures à 44-47 °C.

Il est cependant recommandé de préparer le milieu au fur et à mesure des besoins et de l'utiliser dès que possible afin qu'il conserve un aspect clair permettant une lecture aisée des colonies.

Après un maintien en surfusion du milieu complet, procéder à une forte homogénéisation du milieu avant usage.

6 CONTROLE QUALITE

Aspect, couleur milieu complet : gélose ambrée, opalescente.

Réponse culturale typique après 48 heures d'incubation à 37 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)	Caractéristiques
<i>Listeria monocytogenes</i>	WDCM 00021	$P_R \geq 50\%$	Colonies bleu-vert entourées d'un halo opaque
<i>Listeria monocytogenes</i>	WDCM 00109	$P_R \geq 50\%$	Colonies bleu-vert entourées d'un halo opaque
<i>Listeria innocua</i>	WDCM 00017	Bonne	Colonies bleu-vert sans halo
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Inhibée	-
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée	-

7 METHODE ALTERNATIVE RAPIDE DE DETECTION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ET *LISTERIA SPP* (CERTIFIEE NF VALIDATION)

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
Se référer aux recommandations de la norme NF EN ISO 7218.

Mode d'emploi

- Préparer une suspension-mère de l'échantillon à analyser dans un bouillon de Fraser-demi en respectant une dilution au 1/10ème.
- Incuber la suspension-mère à 30 ± 1 °C pendant 22 à 28 heures.

Ou (protocole court)

- Préparer une suspension-mère de l'échantillon à analyser dans un bouillon de Fraser-demi préchauffé en respectant une dilution au 1/10ème.
- **Incuber la suspension-mère à 37 ± 1 °C pendant 18 à 24 heures.**
- Déposer 100 µL de la culture obtenue sur **une** boîte de COMPASS® *Listeria* Agar préparée ou pré-coulée et réaliser un isolement à l'aide d'une öse stérile ou d'une pipette Pasteur.
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 heures à 48 heures. Les lectures peuvent être réalisées dès 22 heures d'incubation.

✓ **Enrichissement :**
Au 1/10^{ème} en Fraser ½
22 h à 30 °C ou 18 h à 37°C

✓ **Détection :**
100 µL en surface

NOTE :

Le protocole court (incubation 18 heures à 37°C) est uniquement applicable aux bouillons Fraser ^{1/2} de la marque BOKAR DIAGNOSTICS.

Lecture

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* et certaines souches de *Listeria ivanovii* apparaissent bleues à bleu-vert et sont entourées d'un halo opaque. Les autres espèces de *Listeria* forment des colonies bleues à bleu-vert, sans halo.

NOTE :

Après enrichissement, pour des raisons d'organisation des laboratoires, les bouillons de Fraser-demi peuvent être conservés jusqu'à 3 jours à 2-8 °C avant d'être repiqués sur **COMPASS® *Listeria* Agar**.

8 METHODE ALTERNATIVE RAPIDE DE DENOMBREMENT DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (CERTIFIEE NF VALIDATION)

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
Se reporter à la norme NF EN ISO 7218 pour l'ensemencement, le comptage des colonies et pour les calculs et expression des résultats.

Mode d'emploi

- Préparer une suspension-mère de l'échantillon à analyser dans un bouillon de Fraser-demi (avec antibiotiques) ou dans de l'eau peptonée tamponnée en respectant une dilution au 1/10ème.
- Transférer 0,1 mL de la suspension-mère et/ou des dilutions retenues à la surface de chaque boîte nécessaire. Il est également possible d'ensemencer 1 ml à la surface de 3 boîtes.
- Étaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.

OU

- Transférer 1 mL de la suspension-mère et/ou des dilutions retenues dans une boîte de Petri stérile. Couler environ 15 mL de milieu complet. Homogénéiser parfaitement et laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber les géloses à 37 ± 1 °C pendant 24 à 48 ± 2 heures.

✓ **Ensemencement :**
0.1 mL en surface ou
1 mL en profondeur

✓ **Incubation :**
48 h à 37 °C.

Lecture :

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* apparaissent bleues à bleu-vert et sont entourées d'un halo opaque. Certaines souches de *Listeria ivanovii* peuvent également être caractéristiques.

Une première lecture peut être réalisée après 24 heures d'incubation pour une détection plus simple et plus rapide des échantillons fortement contaminés, cependant le résultat final est donné après 48 heures.

Si les colonies sont caractéristiques après 24 heures d'incubation, les confirmations peuvent être réalisées à ce stade. Réaliser le dénombrement définitif après 48 ± 2 heures d'incubation.

9 CONFIRMATIONS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Tous les résultats positifs doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

Méthodes normalisées ou validées ISO 16140-6

La formulation du COMPASS LISTERIA étant conforme à la gélose Listeria selon ottaviani et Agosti décrite dans les normes ISO 11290-1 et ISO11290-2, les méthodes suivantes peuvent être utilisées :

- Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), en repartant des colonies caractéristiques (bleues à bleu-vert entourées d'un halo opaque) isolées sur COMPASS® Listeria Agar.
- Mise en œuvre de méthodes certifiées selon l'ISO 16140-6 en repartant des colonies caractéristiques (bleues à bleu-vert entourées d'un halo opaque) isolées sur COMPASS® Listeria Agar

Méthodes certifiées NF VALIDATION

Les géloses peuvent être conservées 72 heures à 2-8 °C avant de réaliser les tests de confirmation.

- Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), en repartant des colonies caractéristiques (bleues à bleu-vert entourées d'un halo opaque) isolées sur COMPASS® Listeria Agar.
- Mise en œuvre de **CONFIRM' L. mono Agar®**, à partir d'une colonie caractéristique
 - Prélever une colonie caractéristique à la surface de COMPASS® Listeria Agar et ensemercer en une strie la gélose (jusqu'à 6 stries radiales par boîte).
 - Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 3 heures.
 - La présence d'une colonie caractéristique se traduit par une croissance sur la gélose, avec décoloration jaune et apparition d'un halo d'opacification.
- Mise en œuvre du **Bouillon CONFIRM' L. mono**, à partir d'une colonie caractéristique
 - Repiquer une colonie par tube de bouillon.
 - Incuber à 37 ± 1 °C pendant 6 à 24 heures.
 - Le virage au jaune du tube confirme la présence de *Listeria monocytogenes*.

NOTES :

- Un résultat négatif ou une coloration brunâtre après 6 heures est discordant. Le laboratoire doit procéder à des tests complémentaires pour vérifier la validité du résultat rendu, par exemple en poursuivant l'incubation jusque 24 heures.

- En cas de réaction douteuse après 24 heures d'incubation, mettre en œuvre un autre test de confirmation (galerie biochimique par exemple).

- Mise en œuvre d'une **galerie d'identification biochimique**, à partir d'une colonie isolée (option de type 2).
- Utilisation de **toute autre méthode certifiée NF VALIDATION**, de principe différent (option de type 3).

Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes. Les deux méthodes validées (l'une utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronc commun.

Dans le cadre de la méthode **COMPASS® Listeria Agar**, lorsque la présence de *Listeria monocytogenes* a déjà été confirmée lors de la recherche, il est possible de s'affranchir de l'étape de confirmation à l'issue du dénombrement, en cas de résultat positif. Et inversement, lorsque la présence de *Listeria monocytogenes* a été confirmée lors du dénombrement, il est également possible de s'affranchir de l'étape de confirmation à l'issue de la détection.

NOTES :

- En cas de résultats discordants (positifs par la méthode alternative, non confirmés par l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.
- Le fait de ne pas confirmer 5 colonies en dénombrement implique un risque de rendre un résultat surestimé du fait de la présence éventuelle de colonies caractéristiques qui ne seraient pas des *Listeria monocytogenes*.

10 CONFIRMATIONS DE LISTERIA SPP

Tous les résultats positifs doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

Méthodes normalisées ou validées ISO 16140-6

La formulation du COMPASS LISTERIA étant conforme à la gélose Listeria selon ottaviani et Agosti décrite dans les normes ISO 11290-1 et ISO11290-2, les méthodes suivantes peuvent être utilisées :

- Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), par exemple, tests Gram et Catalase, en repartant des colonies caractéristiques isolées sur COMPASS® Listeria Agar.
- Mise en œuvre de méthodes certifiées selon l'ISO 16140-6 en repartant des colonies caractéristiques isolées sur COMPASS® Listeria Agar

Méthodes certifiées NF VALIDATION

Les géloses peuvent être conservées 72 heures à 2-8 °C avant de réaliser les tests de confirmation.

- Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), par exemple, tests Gram et Catalase, en repartant des colonies caractéristiques isolées sur COMPASS® Listeria Agar.
- Mise en œuvre de la gélose **PALCAM (Formule décrite dans les normes ISO 11290)**.
 - Prélever une colonie caractéristique à la surface de COMPASS® Listeria Agar (colonie bleu-vert avec ou sans halo) et ensemencer par piqûre ou strie la gélose PALCAM (jusqu'à 15 piqûres par gélose).
 - Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 3 heures.
 - La présence d'une colonie caractéristique (vert olive entourée d'un halo noir) confirme l'appartenance au genre *Listeria*.
- Mise en œuvre d'une **galerie d'identification biochimique**, à partir d'une colonie isolée.
- Utilisation de **toute autre méthode certifiée NF VALIDATION**, de principe différent.

Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes. Les deux méthodes validées (l'une utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronc commun.

NOTE :

En cas de résultats discordants (positifs par la méthode alternative, non confirmés par l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

11 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

Supplément d'enrichissement : 2-25 °C.

Supplément sélectif : 2-8 °C.

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri : 2-8 °C.

Kit : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu de base préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Milieu complet préparé en flacons (*) : 4 heures à 44-47 °C

Suppléments lyophilisés réhydratés (*) : 15 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Milieu complet préparé en boîtes, avec suppléments (*) : 15 jours à 2-8 °C.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

12 PRESENTATIONS

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 90 mm) :

Coffret de 20 boîtes BM12308

Coffret de 120 boîtes BM12408

Kit COMPASS® *Listeria* Agar :

Coffret de 6 flacons de 200 mL (R1), de 6 flacons de supplément sélectif lyophilisé (R2)
et de 6 flacons de supplément d'enrichissement liquide (R3) BT00808

Milieu de base déshydraté :

Flacon de 500 g BK192HA

Supplément d'enrichissement :

Pack de 8 flacons pour 8 x 1 L de milieu de base BS07008

Supplément sélectif lyophilisé :

Coffret de 8 flacons pour 8 x 1 L de milieu de base BS07108

CONFIRM' *L.mono* bouillon:

Coffret de 18 flacons de 1 mL BM16208

CONFIRM' *L.mono* Agar®:

Coffret de 10 boîtes BM13908

13 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., AGOSTI, M.. 1997. Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari, **36** : 1-3.

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., and AGOSTI, M.. 1997. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. 16-18 June 1997.

NF EN ISO 16140-2. Juillet 2016. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence - Microbiologie des aliments.

NF EN ISO 11290-1. Juillet 2017. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 1 : Méthode de recherche.

NF EN ISO 11290-2. Mai 2017. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 2 : Méthode de dénombrement

NF EN ISO 7218. Octobre 2007. Microbiologie des Aliments. Exigences générales et recommandations. Modifiée en Octobre 2013 par l'amendement A1.

NF EN ISO 16140-6. Décembre 2019. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 6 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) pour la confirmation microbiologique et le typage.

COMPASS est une marque de BIOKAR DIAGNOSTICS (division de SOLABIA SAS.)

Code document : COMPASS LISTERIA_FR_V16.

Date de création : 05-2007

Date de révision : 02-2021

Motif de la révision : Modifications options de confirmation, prise en compte consignes NF EN ISO 7218 pour le dénombrement.

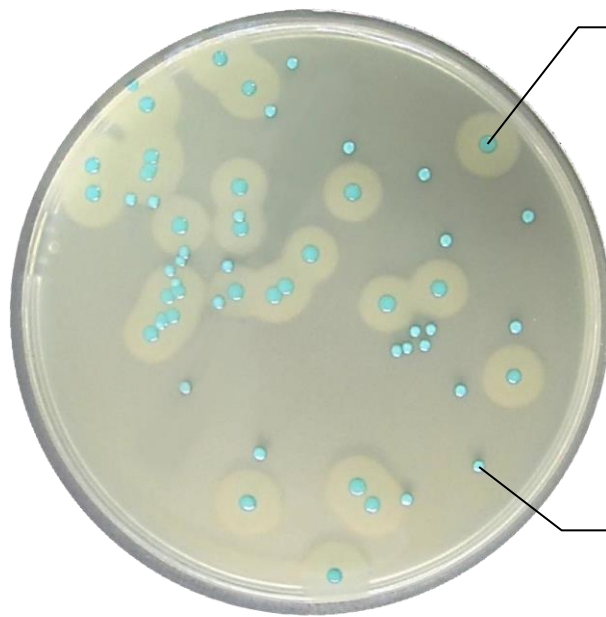
SUPPORT PHOTO

COMPASS® *Listeria* Agar

Détection et dénombrement des *Listeria* spp. et *Listeria monocytogenes*.

Lecture :

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 37 °C.



Listeria monocytogenes

Colonie caractéristique :
couleur bleu-vert entourée d'un
halo opaque

Listeria spp.*

Colonie caractéristique :
couleur bleu-vert sans halo

*autres que *Listeria monocytogenes* et certaines *Listeria ivanovii*