
COMPASS® *LISTERIA* AGAR (ISO 11290-1 et -2)

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

1 DOMAINE D'UTILISATION

La formulation de la gélose **COMPASS® *Listeria* Agar** est conforme à la **Gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti** décrite dans les normes internationales ISO 11290-1 et ISO 11290-2, ainsi que dans le Chapitre 10 du FDA's Bacteriological Analytical Manual (**FDA-BAM**).

COMPASS® *Listeria* Agar s'inscrit comme premier milieu d'isolement obligatoire du protocole opératoire de recherche de *L. monocytogenes* et de *Listeria* spp. (ISO 11290-1), ainsi que comme milieu unique du protocole opératoire de dénombrement de *L. monocytogenes* et de *Listeria* spp. (ISO 11290-2).

COMPASS® *Listeria* Agar répond aux exigences des normes NF V45-008 et NF V45-009 et peut-être utilisé selon le protocole décrit dans cette norme.

Aussi, COMPASS® *Listeria* Agar est utilisée comme méthode alternative, certifiée NF Validation par rapport au protocole de validation NF EN ISO 16140-2 : 2016 pour :

- La recherche de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. dans les produits d'alimentation humaine et échantillons de l'environnement selon NF EN ISO 11290-1 :2017.
- Le dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans les produits d'alimentation humaine et échantillons de l'environnement par ensemencement en surface ou en profondeur selon NF EN ISO 11290-2 :2017.

Se référer à la fiche technique de COMPASS® *Listeria* Agar (méthodes alternatives).

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 principes, **COMPASS® *Listeria* Agar** permet la mise en évidence de colonies bleues entourées d'un halo opaque, 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 étant conforme à la Gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti

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	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.
- 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.

✓ **Reconstitution :**
71,9 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121°C

Kit à reconstituer (BT008) :

- Faire fondre les flacons de 200 mL de milieu de base (R1) pendant le minimum de temps nécessaire à leur reliquéfaction 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.

NOTES:

- Il est fortement recommandé de préparer le milieu et couler en boîtes dès que possible afin qu'il conserve un aspect clair permettant une lecture aisée des colonies.
- Le milieu complet peut être maintenu en surfusion pendant 4 heures à 44-47 °C. 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 DETECTION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ET *LISTERIA SPP.* (ISO 11290-1)

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.

Se référer aux recommandations de la norme NF EN ISO 7218.

Mode d'emploi (voir schéma en Annexe 1)

- Préparer une suspension-mère de l'échantillon à analyser dans un bouillon Fraser-demi (bouillon d'enrichissement primaire) en respectant une dilution au 1/10^{ème}.
- Homogénéiser ou stomacher si besoin.
- Incuber le bouillon Fraser-demi à 30 ± 1 °C pendant 25 ± 1 heures
- Introduire 0,1 mL de bouillon Fraser-demi (bouillon d'enrichissement primaire) dans 10 mL de bouillon Fraser (bouillon d'enrichissement secondaire).
- Incuber le bouillon Fraser à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 heures.
- Après l'incubation des bouillons Fraser-demi (bouillon d'enrichissement primaire) et Fraser (bouillon d'enrichissement secondaire), effectuer :

- ✓ **Enrichissement primaire :**
25 ± 1 h à 30 ± 1°C
- ✓ **Enrichissement secondaire :**
24 ± 2 h à 37 ± 1°C
- ✓ **Ensemencement :**
En surface
- ✓ **Incubation :**
Jusqu'à 48 ± 2 h au total à 37 ± 1 °C

- Un isolement sur une boîte préparée ou le milieu COMPASS® *Listeria* pré-coulé prêt-à-l'emploi (BM123, BM124) à l'aide d'une øse stérile ou d'une pipette Pasteur. Incuber la boîte à 37 ± 1 °C pendant un total de 48 ± 2 heures. Arrêter l'incubation si des colonies présumées sont visibles à 24 h ± 2 h.
- Un isolement sur une deuxième gélose sélective, par exemple la gélose PALCAM ou la gélose Oxford, à l'aide d'une øse stérile ou d'une pipette Pasteur.

Se référer à la norme NF EN ISO 11290-1 pour plus de détails.

NOTE:

- Après l'enrichissement primaire, il est possible de stocker le bouillon Fraser-demi à 5 °C jusqu'à 72 h avant d'inoculer dans le bouillon Fraser.
- Avant l'ensemencement sur la gélose sélective, il est possible de stocker les bouillons Fraser-demi et Fraser à 5°C jusqu'à 72h.
- En cas de recherche de *Listeria spp.* autre que *Listeria monocytogenes*, 24 h supplémentaires d'incubation d'enrichissement secondaire peuvent permettre de récupérer davantage d'espèces.
- Après incubation, il est possible de stocker les boîtes à 5 °C jusqu'à 48 h avant la lecture.

Lecture :

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* présumées 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.

8 DENOMBREMENT DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ET *LISTERIA SPP.* (ISO 11290-2)

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, préparée ou le milieu pré-coulé (BM123, BM124), nécessaire. Il est également possible d'ensemencer 1 mL à la surface de 3 boîtes (Ø 90 mm) ou 1 grande boîte (Ø 140 mm).
- Étaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber les géloses à 37 ± 1 °C pendant un total de 48 ± 2 heures.

✓ **Ensemencement :**
0,1 mL en surface

✓ **Incubation :**
 48 ± 4 h à 37 ± 1 °C

NOTE : Dans le cadre de petits nombres, se référer à la norme ISO 7218.

Lecture :

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* présumées 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.

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

Compter toutes les colonies présumées de *L. monocytogenes* dans chaque boîte de Petri (Ø 90 mm) contenant moins de 150 colonies caractéristiques de *L. monocytogenes*, ou moins de 360 colonies caractéristiques de *L. monocytogenes* pour les grandes boîtes de Petri (Ø 140 mm).

Compter toutes les colonies présumées de *Listeria spp.* dans chaque boîte de Petri (Ø 90 mm) contenant moins de 150 colonies caractéristiques de *Listeria spp.*, ou moins de 360 colonies caractéristiques de *Listeria spp.* pour les grandes boîtes de Petri (Ø 140 mm).

En cas de mélange de colonies bleu-vert avec ou sans halo opaque, ou en cas du chevauchement entre des colonies bleu-vert avec des grands halos opaques, compter chaque boîte (Ø 90 mm) contenant moins de 100 colonies toutes les colonies caractéristiques de *Listeria spp.* ou moins de 240 colonies caractéristiques de *Listeria spp.* pour les grandes boîtes de Petri (Ø 140 mm).

9 CONFIRMATIONS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* & *LISTERIA SPP*

Tous les résultats positifs doivent être confirmés.

La formulation du **COMPASS® *Listeria* Agar** étant conforme à la **gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti** décrite dans les normes ISO 11290-1 et ISO 11290-2, procéder à la 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 sur une gélose TSYEA, à partir des colonies caractéristiques.

10 CONSERVATION

COMPASS® *Listeria* Agar :

Milieu 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.

11 PRESENTATIONS

COMPASS® *Listeria* Agar :

Milieux pré-coulés en boîtes de Petri COMPASS® *Listeria* Agar (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 COMPASS® *Listeria* Agar :

Flacon de 500 g	BK192HA
-----------------------	---------

Supplément d'enrichissement pour COMPASS® *Listeria* Agar :

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

Supplément sélectif lyophilisé pour COMPASS® *Listeria* Agar :

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

Bouillons enrichissement primaire (Fraser-demi) et secondaire (Fraser) :

Disponible dans différents formats et conditionnements, se référer aux fiches techniques correspondantes.

Diluant (Eau peptonée tamponnée) :

Disponible dans différents formats et conditionnements, se référer à la fiche technique correspondante.

PALCAM comme 2ème milieu d'isolement:

Disponible dans différents formats et conditionnements, se référer à la fiche technique correspondante.

Oxford comme 2ème milieu d'isolement:

Disponible dans différents formats et conditionnements, se référer à la fiche technique correspondante.

Milieu de l'étape de confirmation TSYEA :

Disponible dans différents formats et conditionnements, se référer à la fiche technique correspondante.

12 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 11290-1. Juillet 2017. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp.. 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* et *Listeria* spp... Partie 2 : Méthode de dénombrement.

NF V045-008. Mars 2009. Poissons transformés - Méthode pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* aux faibles niveaux de contamination dans le saumon fumé et la truite fumée.

NF V045-009. Avril 2023. Poissons transformés - Méthode pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* aux faibles niveaux de contamination dans le poisson fumé (Méthode de dénombrement par inclusion).

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

PR NF EN ISO 7218. Parution prévue février 2024. Microbiologie des Aliments. Exigences générales et recommandations.

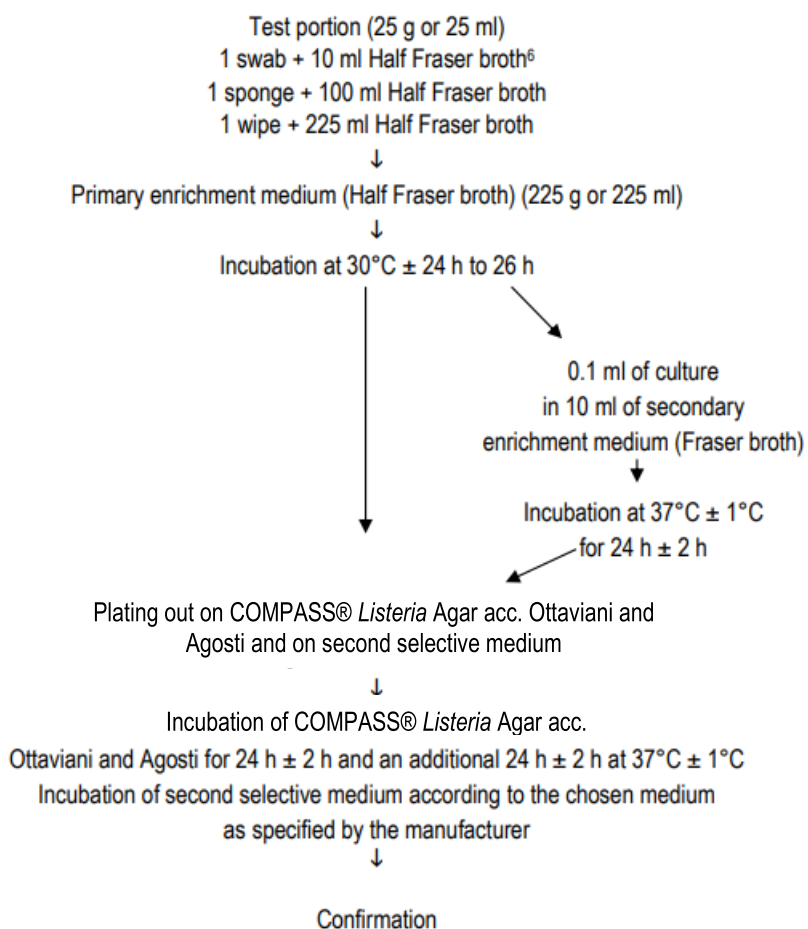
United States Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. <https://www.fda.gov/media/157717/download?attachment> Accessed March 2024.

13 AUTRES INFORMATIONS

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

Code document : **COMPASS LISTERIA_ISO 11290_V1 (fr)**
Date de création : 04-2024
Date de révision : -
Motif de la révision : -

ANNEXE 1: Détection des *Listeria monocytogenes* et *Listeria spp.* (ISO 11290-1)



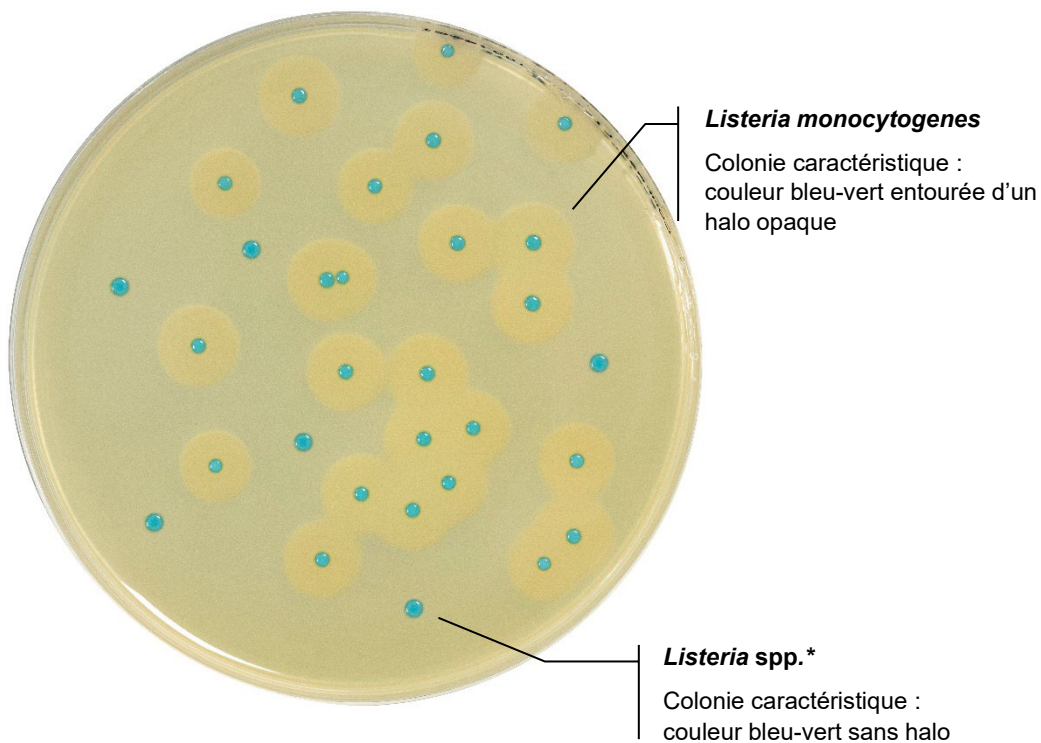
ANNEXE 2 : SUPPORT PHOTO

COMPASS® *Listeria* Agar

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

Lecture :

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



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