



Test de provocation pour *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger réfrigérés

Remplace : 2010-11-24

Émis le : 2012-11-29

Entrée en vigueur : 2012-11-29

Bureau des dangers microbiens
Direction des aliments
Direction générale des produits de santé
et des aliments



Table des matières

| | |
|--|-----------|
| 1. But | 3 |
| 2. Champ d'action | 3 |
| 3. Contexte | 4 |
| 4. Mesures de sécurité..... | 4 |
| 5. Protocole expérimental suggéré..... | 5 |
| 5.1 Souches de <i>Listeria monocytogenes</i> | 5 |
| 5.2 Préparation et dénombrement des cellules | 6 |
| 5.2.1 Conservation des cultures et préparation de l'inoculum..... | 6 |
| 5.2.2 Concentration de l'inoculum..... | 7 |
| 5.3 Protocole d'échantillonnage destiné aux études de multiplication et de létalité..... | 9 |
| 5.3.1 Autres facteurs à prendre en compte à l'égard de l'étude de traitements de létalité ... | 11 |
| 5.4 Préparation des produits alimentaires | 11 |
| 5.5 Inoculation des produits alimentaires | 12 |
| 5.6 Conditions spéciales d'emballage des produits | 12 |
| 5.7 Incubation des produits alimentaires inoculés | 13 |
| 5.8 Méthodes de dénombrement et d'enrichissement..... | 13 |
| 5.9 Documentation des résultats | 15 |
| 6. Mesures à prendre lorsque les produits alimentaires favorisent la multiplication de <i>Listeria monocytogenes</i>..... | 15 |
| 7. Définitions..... | 16 |
| 8. Références..... | 16 |

1. But

L'objectif du présent document consiste à recommander un protocole expérimental aux fins d'études de provocation visant à déterminer le potentiel de multiplication de *Listeria monocytogenes* dans les aliments réfrigérés prêts-à-manger (PAM) et plus particulièrement à déterminer si un aliment PAM peut ou non supporter la multiplication de *L. monocytogenes*¹. De plus, des conseils sur le mode d'évaluation de l'efficacité des traitements de létalité appliqués à la bactérie dans les aliments PAM y figurent. Le présent document remplace le document intitulé *Test de provocation pour déterminer si Listeria monocytogenes peut se multiplier dans les aliments prêts-à-manger réfrigérés* du 24 novembre 2010.

2. Champ d'action

Le présent document a été conçu à l'intention des laboratoires universitaires, privés, industriels et/ou gouvernementaux concernés par la conception, la mise en application et l'interprétation des résultats d'études de provocation pour *L. monocytogenes*.

Les expériences réalisées conformément aux recommandations du présent document peuvent être utilisées pour déterminer si *L. monocytogenes* peut survivre et/ou se multiplier à une concentration préoccupante dans les aliments PAM réfrigérés. Par exemple, les études de provocation de *L. monocytogenes* peuvent être utilisées pour les aliments PAM suivants, mais sans en exclure d'autres : les produits de viande ou de volaille transformés, notamment les produits de charcuterie (saumurés ou non), le poisson fumé, les repas complets, les fromages à pâte molle, les soupes, les sauces, les salades préparées et les sandwiches. Dans la mesure du possible, les études de provocation devraient être effectuées en utilisant les paramètres du « pire » scénario, c.-à-d., dans les conditions les plus favorables pour la multiplication de *L. monocytogenes*.

En plus d'évaluer l'innocuité d'un produit en termes de multiplication de *L. monocytogenes*, les études de provocation peuvent être utilisées pour valider un traitement ou un processus visant à réduire ou éliminer la présence du pathogène. Les données obtenues des études de provocation peuvent contribuer à déterminer la durée de conservation (p. ex., la date limite de conservation telle que la date « meilleur avant » inscrite sur l'emballage) d'un produit.

Le présent document peut aussi guider les autorités réglementaires de l'innocuité alimentaire et les organismes d'inspection gouvernementaux dans leurs activités d'évaluation de la conception d'études de provocation de *L. monocytogenes* et d'interprétation des résultats obtenus.

¹ Les aliments PAM dans lesquels la multiplication de *L. monocytogenes* peut se produire correspondent aux produits dans lesquels la concentration en *L. monocytogenes* augmentera de plus de 0,5 log ufc/g pendant la durée de conservation du produit en conditions raisonnables de distribution, d'entreposage et de consommation (Santé Canada, 2011).

Un expert en microbiologie alimentaire devrait participer à toutes les étapes de l'étude, et surtout dans sa conception et l'interprétation des résultats obtenus. Si des clarifications ou des opinions d'expert sur les protocoles aux fins des tests de provocation de *L. monocytogenes* étaient requises, communiquer avec le [Bureau des dangers microbiens](#).

3. Contexte

Plusieurs éclosions et cas sporadiques de listériose ont été attribués à l'ingestion d'aliments PAM contenant la bactérie *L. monocytogenes* (Pagotto *et coll.*, 2006, Santé Canada, 2011). Les aliments à risque élevé comprennent les produits de charcuterie PAM, les hot dog, les pâtés et les fromages à pâte molle (Santé Canada, 2011). Les produits de charcuterie tranchés, le lait pasteurisé, les sandwichs préemballés, les fromages et les saucisses hot-dogs sont des exemples d'aliments PAM qui ont déjà provoqué des maladies. (ASPC, 2009; Anonyme, 2008; Dawson *et coll.*, 2006; Pagotto *et coll.*, 2006; Mead *et coll.*, 2006).

La demande croissante des consommateurs pour des aliments plus pratiques et plus frais contenant moins d'agents de conservation et à faible traitement thermique a contribué à l'augmentation des ventes d'aliments PAM à l'échelle mondiale. Plusieurs aliments PAM réfrigérés sont traités à l'aide de procédés thermiques dans lesquels les températures maximales atteignent habituellement entre 70 et 95°C, puis emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée (normalement en anaérobie) et réfrigérés (Peck, 2006). La combinaison d'un traitement thermique et d'un entreposage en anaérobie réfrigéré vise à empêcher la multiplication des pathogènes non sporulés et des organismes putréfiants. Cependant, les étapes inadéquates de destruction, la contamination post-transformation ou les caractéristiques du produit peuvent permettre aux pathogènes de survivre et se multiplier. La bactérie pathogène *L. monocytogenes* est particulièrement préoccupante en raison de sa capacité de multiplication en présence ou en absence d'oxygène à des températures de réfrigération ainsi que de sa capacité de survie dans l'usine de transformation où elle peut contaminer des aliments avant ou après le procédé de transformation (D'Amico et Donnelly, 2008). Une durée de conservation prolongée (p. ex., la date limite de conservation telle que la date « meilleur avant » inscrite sur l'emballage) peut exacerber le problème en donnant à *L. monocytogenes* plus de temps pour proliférer jusqu'à atteindre une concentration suffisante pour provoquer la maladie. De plus, une durée de conservation prolongée augmente les probabilités qu'une rupture survienne dans la chaîne du froid, permettant ainsi à toute bactérie *L. monocytogenes* présente dans le produit de proliférer jusqu'à atteindre des concentrations supérieures à 100 ufc/g, lesquelles sont tenues pour inacceptables par plusieurs instances (Santé Canada, 2011; US FDA, 2008; CCA, 2009a).

4. Mesures de sécurité

Le Bureau de la sécurité des laboratoires de l'Agence de la santé publique du Canada précise que *L. monocytogenes* doit être manipulé conformément au niveau de biosécurité 2. Le personnel doit être pleinement informé des dangers (c.-à-d., Fiche Technique Santé/Sécurité) (ASPC, 2012).

L'équipement et les installations de confinement devraient être utilisés pour toutes les activités mettant en cause du matériel clinique ou des cultures. Les enceintes de sécurité biologique devraient être utilisées pour les activités susceptibles de générer des aérosols. Le personnel de laboratoire devrait porter un sarrau, des gants et des lunettes de protection.

Le matériel potentiellement infectieux devrait toujours être entreposé dans des contenants scellés qui portent l'étiquette appropriée. Les contenants devraient être entreposés et transportés dans des plateaux ou des boîtes incassables et étanches. En cas de déversement accidentel, il est important de laisser le produit aérosol se déposer, de porter les vêtements de protection adéquats, de recouvrir doucement le matériel déversé à l'aide d'essuie-tout et d'appliquer de l'hypochlorite de sodium (1 %) en commençant par le périmètre du déversement et en progressant vers le centre (ASPC, 2012). Laisser l'hypochlorite de sodium agir au moins 30 minutes avant de nettoyer la surface.

Tout le matériel devrait être stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant au moins 15 minutes (ASPC, 2012). Les articles de verrerie utilisés et tout autre fourniture qui entre en contact avec le matériel infectieux doivent être placés dans un contenant thermorésistant robuste avant d'être placé dans l'autoclave. Le matériel jetable (gants, papier de coton, papier mince) doit être recueilli comme du matériel biologique dangereux et stérilisé à l'autoclave.

Aucun pathogène ou produit inoculé ne doit entrer dans les aires de production des aliments ou être utilisé sur l'équipement de production des aliments.

5. Protocole expérimental suggéré

5.1 Souches de *Listeria monocytogenes*

En règle générale, pour tenir compte de l'éventuelle variation entre la multiplication et la survie des différentes souches de *L. monocytogenes*, les études de provocation devraient être effectuées en recourant à un regroupement (c.-à-d., à un cocktail) d'au moins trois à cinq souches différentes. Un cocktail d'au plus dix souches différentes peut être utilisé si le mode de multiplication de l'organisme ou sa réaction à un produit alimentaire particulier est peu connu (NACMCF, 2010). L'inoculum devrait au moins comporter des souches des sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b. Dans la mesure du possible, il faudrait inclure des souches isolées d'un même aliment ou d'un aliment semblable à celui visé par l'étude. De plus, il conviendrait d'incorporer des souches isolées d'échantillons d'éclosions ou de cas sporadiques si l'on dispose de telles souches. Il est important de soigneusement pré-sélectionner et caractériser les souches en fonction de leur capacité de multiplication, tolérance et résistance possible au traitement (c.-à-d., résistance, entre autres, à la chaleur, au sel et à l'acidité), en plus de la concurrence possible entre les souches de *L. monocytogenes*, avant de les inclure dans le cocktail (Gorski *et coll.*, 2006). Plusieurs organismes considérés acceptables pour les tests de provocation ont été soigneusement caractérisés et regroupés dans des collections de cultures internationales disponibles. L'[ATCC](#) et l'[ILSI](#) conservent des collections de souches provenant d'un vaste éventail d'isolats.

Des organismes de substitutions devraient être utilisés au moment d'effectuer un test de provocation dans des installations de transformation alimentaire. L'organisme substitut utilisé devrait démontrer des caractéristiques de multiplication et de résistance équivalentes ou supérieures à celles de *L. monocytogenes*. L'organisme *Listeria innocua* peut être utilisé en tant qu'organisme substitut pour *L. monocytogenes* (Scott *et coll.*, 2005).

5.2 Préparation et dénombrement des cellules

5.2.1 Conservation des cultures et préparation de l'inoculum

Il faudrait entreposer les organismes en laboratoire selon une méthode permettant de minimiser ou d'éliminer les transferts (c.-à-d., dans du glycérol, entreposage à -80 °C) de façon à éviter toute mutation ou modification qui risquerait d'altérer les caractéristiques de multiplication ou de survie de l'organisme (Pagotto *et coll.*, 2005; Herruzo-Cabrera *et coll.*, 2004). Les lignes directrices internationales de l'AOAC pour les laboratoires (2006) recommandent de limiter à cinq le nombre de passages de la souche de référence.

À partir d'un stock congelé de l'isolat, repiquer pour isoler une colonie sur une plaque de gélose non sélective (p. ex., gélose de soja Trypticase) et incubé à 37 °C durant 24 à 48 heures. Inoculer des cellules d'une seule colonie cultivée sur le milieu de gélose non sélective dans un bouillon nutritif non sélectif (p. ex., bouillon de soja Trypticase comportant 0,6 % d'extrait de levure ou une infusion cœur-cerveille) et incubé le bouillon inoculé à 37 °C durant 24 à 26 heures pour obtenir des cellules stationnaires à une concentration d'environ 1×10^9 cellules/mL. Il faudrait répéter cette procédure séparément pour chaque souche. À partir du bouillon, il faudrait entreposer un nombre suffisant d'aliquotes de stocks congelés provenant d'une seule colonie de façon à compléter toutes les études de provocation sans passages multiples d'un isolat. La viabilité de la souche et la rétention de ses importantes caractéristiques phénotypiques devraient être vérifiées avant d'amorcer toute étude de provocation.

Puisque les produits soumis au test sont réfrigérés, les souches devraient faire l'objet d'une sous-culture, être conservées dans un bouillon non sélectif et réfrigérées (à 4 °C) pendant environ 48 heures ou dès que les cellules passent en phase stationnaire (Scott *et coll.*, 2005). Chaque souche devrait être lavée par centrifugation et remise en suspension dans un milieu de transport, p. ex., une solution saline dans un tampon phosphate (PBS), une solution d'eau peptonée 0,1 % (PW) ou une portion homogénéisée de l'aliment. Des nombres égaux de chaque souche à utiliser dans le cocktail devraient être mélangés à fond avant d'effectuer des dilutions dans la solution de PBS ou PW pour obtenir la concentration souhaitée. Dans certaines situations, les souches devront peut-être être centrifugées pour les concentrer davantage. Après avoir préparé l'inoculum de travail mélangé, le laboratoire devait déterminer les populations viables et les populations affectées par ensemencement direct d'une série de dilutions sur plaques de géloses sélectives et non sélectives.

Les souches de l'étude de provocation devraient être dans le même état physiologique que celui dans lequel sont susceptibles d'être les cellules qui contamineraient le produit, habituellement dans la phase stationnaire. Dans certaines situations, les souches soumises à l'étude de provocation doivent faire l'objet d'une adaptation, par exemple, en abaissant le pH au moyen d'un bouillon contenant du glucose ou des acidifiants, à une activité de l'eau (a_w) inférieure à l'aide des agents réducteurs de l' a_w faisant partie de la composition du produit, ou à une température plus basse en entreposant les cultures au réfrigérateur ou en augmentant la résistance thermique en cultivant les souches à des températures supérieures aux températures optimales (NACMCF, 2010). Il conviendrait de consulter un expert en microbiologie alimentaire car les réactions d'adaptation des souches risquent de ne pas être explicites (Koutsoumanis et Sofos, 2004; Doyle *et coll.*, 2001).

Lorsque le procédé ou les conditions de transformation du produit sont susceptibles d'affecter l'organisme, le cas échéant, des cellules affectées devraient être utilisées dans l'étude de provocation (Comité des méthodes microbiologiques, 2011). Les traitements sub-létaux de séchage, chauffage, congélation, etc., peuvent être utilisés pour endommager (stresser) l'organisme. L'adaptation et l'endommagement devraient être effectués avant de préparer le mélange d'inoculum pour veiller à ce que chaque souche maintienne une représentation égale. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'adaptation des souches, consulter *Procédure pour endommager (ou stresser) des microorganismes dans les échantillons artificiellement contaminés*, soit l'annexe 4.2 du *Compendium de méthodes* (Comité des méthodes microbiologiques, 2011).

5.2.2 Concentration de l'inoculum

La concentration de l'inoculum utilisé dans l'étude de provocation de *L. monocytogenes* varie en fonction de l'objectif de l'étude : déterminer la stabilité et la durée de conservation du produit (p. ex., la date limite de conservation telle que la date « meilleur avant » inscrite sur l'emballage) ou valider une étape de létalité conçue pour réduire le dénombrement microbien. Le laboratoire devra peut-être effectuer des études de provocation à l'aide de plusieurs concentrations d'inoculum pour déterminer la marge de sécurité du processus (Scott *et coll.*, 2005).

Pour déterminer la stabilité d'un produit, l'inoculum devrait habituellement être dilué pour obtenir une concentration finale d'environ 10^2 à 10^3 ufc/g du produit (tableau 1). Un test de provocation dans lequel l'inoculum contient trop d'organismes peut surcharger le système de conservation associé au produit; d'autre part, un inoculum comportant trop peu d'organismes peut produire un résultat faussement négatif. De plus, les limites de détection de la méthode de dénombrement doivent être prises en compte. Si nécessaire, des concentrations d'inoculation plus faibles peuvent être utilisées (c.-à-d., <100 ufc/g), si ce niveau de contamination correspond davantage aux concentrations de contamination naturelle. Cependant, l'inoculation et le dénombrement cohérents peuvent se révéler difficiles en présence de très faibles concentrations. Dans ces cas, la précision du dénombrement peut être augmentée i) en augmentant la taille de l'échantillon, ii) en utilisant une méthode de nombre le plus probable (NPP) ou iii) en augmentant le nombre d'échantillons répétés à analyser (Corry *et coll.*, 2010; NACMCF, 2010).

Test de provocation pour *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger réfrigérés

Un test de provocation visant à valider un traitement de létalité exigera une concentration initiale de l'inoculum plus élevée, soit habituellement dans la plage de 10^6 - 10^7 ufc/g du produit (NACMCF, 2010; Scott *et coll.*, 2005; US FDA, 2001). Cependant, certaines études de létalité peuvent être conçues pour inactiver de faibles concentrations de microorganismes qui ont contaminé le produit au cours de l'étape post-transformation. Dans un tel cas, une inoculation en concentration de 10^3 ufc/g précédant le traitement post-létalité, le tout suivi par l'application d'une méthode d'enrichissement visant la détection de *L. monocytogenes* dans le but de déterminer sa présence ou son absence, pourrait être appropriée (tableau 1). Ces concentrations d'inoculation indiqueraient si le traitement post-létalité peut produire une réduction de 3 logs à de faibles concentrations de contamination (Santé Canada, 2011).

Il est conseillé d'ajouter au produit un volume d'inoculum qui représente au plus 1 % du poids ou du volume du produit.

Tableau 1. Exemples de suggestions de concentrations d'inoculation

| Concentration recommandée | But | Référence |
|---|--|------------------------------------|
| Concentration d'inoculation se situant entre 1 et 10 ufc/g | Études de provocation axées sur la multiplication | Uyttendaele <i>et coll.</i> (2004) |
| Concentration d'inoculation se situant entre 10 et 30 ufc/g | Études de provocation axées sur la multiplication visant à faire la preuve de la classification à la catégorie 2A en lien avec la <i>Politique sur la présence de Listeria monocytogenes dans les aliments prêts-à-manger</i> (2011) de Santé Canada | Santé Canada (2012) |
| Cibler la concentration d'inoculation à 50 ufc/g, sans toutefois dépasser 100 ufc/g | Études de provocation axées sur la multiplication | Beaufort <i>et coll.</i> (2008) |
| 10^2 ufc/g | Évaluation de la multiplication de <i>L. monocytogenes</i> dans les aliments | Augustin <i>et coll.</i> (2010) |
| Entre 10^2 - 10^3 ufc/g du produit | Études de provocation axées sur la multiplication/la stabilité d'un produit | US FDA (2001) |

| | | |
|-----------------------------|---|--|
| Entre 10^2 - 10^3 ufc/g | Études axées sur la multiplication Des concentrations plus faibles peuvent être utilisées, si les méthodes de détection sont suffisamment sensibles. | NACMCF (2010) |
| Entre 10^2 - 10^5 ufc/g | Évaluation de l'agent antimicrobien ou tests de létalité post-transformation (inoculation à plus faible concentration) | Scott <i>et coll.</i> (2005) |
| Entre 10^6 - 10^7 ufc/g | Validation d'une étape de létalité du procédé, fondée sur un niveau ciblé de réduction (p. ex., 5 logs ou 3 logs) | NACMCF (2010); Scott <i>et coll.</i> (2005); US FDA (2001) |

5.3 Protocole d'échantillonnage destiné aux études de multiplication et de létalité

Les plans d'échantillonnage devraient être conçus en tenant compte de facteurs pratiques et de la validité statistique. Pour optimiser le protocole expérimental, il est conseillé de consulter un statisticien possédant de l'expérience en matière de protocoles expérimentaux pour la microbiologie alimentaire. Ci-dessous, figurent des recommandations d'ordre général au sujet de protocole d'échantillonnage destiné aux études de provocation ciblant la multiplication et la létalité.

Les temps d'échantillonnage devraient être établis de façon à ce que des ensembles suffisants de données puissent être recueillis (au minimum, de 3 à 4; p. ex., au début, au milieu, à la fin et à 1,5 x la fin de la durée de conservation) (Scott *et coll.*, 2005). Selon le comportement escompté de l'organisme, les analyses pourraient être plus fréquentes au début de l'étude.

D'autres analyses du produit, en duplicata, devraient être effectuées sur les échantillons pour évaluer l'influence des caractéristiques intrinsèques sur la survie et la multiplication de *L. monocytogenes* au cours de la durée de conservation du produit. Les analyses au temps zéro (c.-à-d., au moment où le produit est considéré prêt-à-manger), au milieu et à la fin de la durée de conservation devraient être effectuées en double et en considérant l' a_w , le pH, la concentration en agent antimicrobien, le dénombrement sur plaque en aérobie et l'analyse des gaz pour les produits emballés sous atmosphère modifiée. Dans la mesure du possible, une analyse devrait être effectuée une fois que la durée de conservation plus une période équivalente à la moitié de celle-ci se seront écoulées. Selon le type de produit, d'autres analyses pourraient prendre en compte la teneur en protéines et en lipides, l'acidité totale, la teneur en eau (humidité), la teneur

en sel, le dénombrement des bactéries lactiques et psychrophiles et des spores ainsi que le dénombrement en anaérobie, etc.

Qui plus est, des témoins « non inoculés » destinés à l'analyse de la microflore de fond (et à vérifier l'absence de *L. monocytogenes* contaminant naturellement le produit au moyen d'une méthode d'enrichissement), des propriétés physico-chimiques, de l'atmosphère modifiée, etc. seront requis aux fins de la surveillance des changements au cours de la période d'analyse. Les témoins « non inoculés » devraient être traités de la même façon que les échantillons inoculés. Selon le protocole d'étude et son objectif, des échantillons inoculés sans agent antimicrobien ou d'autres facteurs pourraient être requis. Ci-dessous, des exemples de témoins non inoculés :

1. Produit avec agent antimicrobien (sans inoculum)
2. Produit sans agent antimicrobien (sans inoculum)

La méthode d'échantillonnage devrait être appropriée pour l'aliment et le mode d'inoculation. Cette méthode peut comporter le rinçage/lavage de la surface de l'échantillon et l'analyse du produit de celle-ci. Idéalement, l'échantillon complet devrait être pesé, puis mélangé avec du diluant (Notermans, 1993). Les liquides peuvent être préparés par mélangeur, stomacher ou pulsification, avant d'analyser une aliquote.

Afin de réduire la variation autour des points de données, la taille de l'échantillon pour chaque point de données devrait être maximale. Pour obtenir plus de renseignements à l'égard des tailles particulières d'échantillon, reporter à la *Politique sur la présence de Listeria monocytogenes dans les aliments prêts-à-manger* publiée par Santé Canada (Santé Canada, 2011).

Afin de tenir compte de la variation du produit, trois lots de produits devraient faire l'objet d'une analyse en triple pour *L. monocytogenes*, et ce, pour chaque temps d'échantillonnage. Toutefois, spécifiquement dans le contexte de la validation d'un changement de catégorie des aliments prêts-à-manger, soit de la catégorie 1 à la catégorie 2A ou 2B, en lien avec la *Politique sur la présence de Listeria monocytogenes dans les aliments prêts-à-manger* (2011) de Santé Canada, un minimum de trois lots de produits doit être analysé en triple pour *L. monocytogenes*, à chaque temps d'échantillonnage (c.-à-d., minimum de cinq² points temporels durant toute la durée de conservation prévue du produit, incluant le temps zéro et la fin de la durée de conservation) (Santé Canada, 2012). Pour les études ciblant la multiplication, la détermination quantitative de *L. monocytogenes* devrait être effectuée en recourant aux méthodes décrites à la section 5.8.

² Si le produit a une durée de conservation prolongée au réfrigérateur, des points temporels additionnels durant toute la durée de conservation prévue du produit devraient être considérés, afin de tenir compte des variations possibles lors de la prolifération de *L. monocytogenes*.

5.3.1 Autres facteurs à prendre en compte à l'égard de l'étude de traitements de létalité

Pour la validation des traitements de létalité, il faudrait utiliser la formulation du produit et les paramètres de traitement qui se situent dans la plage type et qui sont le plus susceptible de favoriser la survie. Cette approche permettra d'obtenir des renseignements sur le « pire » des scénarios et de régler en conséquence les limites minimales et maximales de contrôle pour une production normale. Doyle *et coll.* (2001) partagent des renseignements utiles sur les facteurs qui influencent la thermorésistance de *L. monocytogenes*. Cette information devrait être utilisée pour concevoir les aspects de l'étude liés à l'adaptation des souches et à la préparation du produit. Par exemple, pour la validation d'un traitement thermique, le laboratoire doit effectuer le test en utilisant un produit dont les valeurs d'humidité se situent à l'extrémité inférieure de la plage type observée pendant la production de l'aliment, car les pathogènes résistent beaucoup mieux à de faibles valeurs d'humidité. Une a_w plus faible peut aussi protéger *L. monocytogenes* contre le traitement à haute pression hydrostatique (Hayman *et coll.*, 2008).

S'il y a lieu, la cinétique d'inactivation devrait être déterminée en analysant les produits à plusieurs points (à tout le moins, à cinq points) tout au long du traitement (Scott *et coll.*, 2005). Pour prendre en compte les faibles niveaux de cellules qui auraient pu survivre au traitement et qui, par la suite, peuvent proliférer au cours de la durée de conservation, le produit devrait être analysé après le traitement dans le but d'y détecter la présence du microorganisme et de déterminer la concentration en celui-ci en recourant à une méthode de dénombrement (p. ex., par ensemencement direct sur plaque ou le NPP) et/ou à une méthode d'enrichissement (présence-absence) acceptable. Le recours aux étapes d'enrichissement devrait être utilisé lorsque les concentrations attendues de cellules survivantes sont inférieures à la limite de détection de l'ensemencement direct. À elles seules, les techniques de dénombrement risquent de ne pas permettre la ressuscitation des cellules endommagées, mais viables. C'est pourquoi, il importe d'envisager de recourir à la méthode présence-absence. Dans le cadre des études de létalité exigeant une étape d'enrichissement, la méthode d'enrichissement sélectionnée devrait correspondre à l'une de celles décrites à la section 5.8.

Au moins trois répétitions distinctes de l'expérience de létalité devraient être effectuées, et chaque échantillon doit être analysé en double à chaque point du temps.

5.4 Préparation des produits alimentaires

Les paramètres critiques et la variabilité du procédé du produit devraient être connus (c.-à-d., les valeurs moyennes et l'écart-type du pH, de l' a_w , de la concentration en agent antimicrobien, etc.). Des données devraient être recueillies afin de s'assurer que les conditions du test de provocation englobent cette variabilité (Scott *et coll.*, 2005). Il est généralement conseillé d'utiliser les « pires » conditions à l'intérieur de la plage type pour chaque paramètre critique, c.-à-d., effectuer le test sur la formulation qui favorise le mieux la multiplication. Par exemple, pour l'étude de la multiplication de *L. monocytogenes*, si la plage type de pH d'un produit se situe entre 5,5 et 5,9, le produit dont le pH est de 5,9 devrait être utilisé.

Le point du processus auquel l'aliment est inoculé avec les souches de provocation devrait se situer le plus près possible de celui auquel la contamination devrait survenir pendant la production de l'aliment. L'incidence de la microflore de fond concurrente sur la multiplication de *L. monocytogenes* devrait être prise en compte (NACMCF, 2010), et il conviendrait de surveiller les concentrations en microorganismes putréfiants tout au long de la durée de conservation afin de détecter des interactions possibles.

5.5 Inoculation des produits alimentaires

La méthode d'inoculation d'un aliment avec les souches de provocation devrait refléter la façon dont la contamination devrait survenir et les conditions actuelles du produit. Il est important de ne pas altérer les paramètres critiques du produit par l'ajout de l'inoculum.

Le laboratoire devra peut-être inoculer la surface des aliments solides pour simuler la contamination post-traitement thermique en immergeant l'aliment dans la suspension d'inoculation pendant une période prédéterminée. L'inoculum peut également être frotté sur la surface de l'aliment à l'aide d'une baguette de verre pliée ou d'une pipette stérile si un volume uniforme d'inoculum peut être ajouté. On peut aussi distribuer l'inoculum uniformément aux produits emballés en faisant pénétrer une aiguille stérile dans un septum placé au-dessus du matériel d'emballage. À titre de méthode supplémentaire, le laboratoire peut effectuer une inoculation par pistolet pulvérisateur pour distribuer l'inoculum sur le produit. L'inoculum devrait être réparti de façon égale à la surface du produit, laquelle doit être massée délicatement pour veiller à la répartition uniforme de celui-ci. Une période de séchage et d'attachement post-inoculation pourrait peut-être se révéler nécessaire afin de permettre un équilibre. S'il y a lieu, l'inoculum peut être ajouté directement durant le mélange, la mouture ou le moulage.

Les produits liquides sont plus faciles à inoculer en ajoutant le plus petit volume possible d'inoculum puis en mélangeant le produit à fond.

Pour confirmer la concentration de l'inoculation du produit alimentaire, un échantillon devrait être prélevé et le dénombrement devrait avoir lieu immédiatement après l'inoculation et, s'il y a lieu, après la phase de séchage post-inoculation, avant l'entreposage ou la mise en œuvre du traitement de létalité. La section 5.8 traite des méthodes de dénombrement.

5.6 Conditions spéciales d'emballage des produits

Le produit inoculé devrait être emballé tel que pour la vente au détail. Pour les produits emballés à atmosphère modifiée, il serait important pendant l'inoculation d'éviter de perturber l'atmosphère d'espace libre et de modifier la composition de l'environnement gazeux, ce qui peut s'avérer difficile si le contenu de l'emballage est sous vide. Dans cette situation, le produit peut être inoculé avant l'emballage, ou emballé de nouveau après l'inoculation, pourvu que cela ne pose aucun risque de sécurité. Le laboratoire peut également utiliser un couvercle ou un septum qui se referme immédiatement après l'inoculation. L'atmosphère devrait être définie et analysée tout au long de la période de test pour confirmer qu'elle n'a pas été modifiée.

Suite à l'inoculation, des étiquettes de mise en garde de danger biologique devraient être apposées sur les échantillons du produit. De plus, ces échantillons doivent demeurer sous le contrôle de l'enquêteur. Le produit inoculé ne doit pas entrer dans les aires de production des aliments.

5.7 Incubation des produits alimentaires inoculés

Pour les études de produits inoculés et emballés, il est conseillé d'utiliser une période totale d'incubation qui est au moins équivalente à celle de la durée de conservation prévue pour le produit (ou jusqu'à ce que le produit devienne impropre à la consommation humaine). Dans la mesure où il est possible de le faire, le produit devrait être incubé pendant 1,5 fois sa durée de conservation prévue (tableau 2). Au minimum, le dénombrement visant à déterminer la multiplication ou la survie de *L. monocytogenes* devrait être analysé au temps zéro (au moment auquel le produit est considéré prêt-à-manger), ainsi qu'au milieu et à la fin de la durée de conservation et, si possible, à 1,5 fois la durée de conservation. Si le produit comporte différentes composantes, l'analyse devrait être interrompue le jour suivant toute détérioration marquée d'une des composantes.

Il est important d'utiliser une gamme convenable de températures pour analyser l'effet de la température d'entreposage. Les températures choisies pour l'étude de provocation devraient refléter les conditions d'entreposage anticipées et la possibilité de rupture dans la chaîne du froid chez le consommateur (tableau 2). Spécifiquement dans le contexte de la validation d'un changement de catégorie des aliments prêts-à-manger, soit de la catégorie 1 à la catégorie 2A ou 2B (en lien avec la *Politique sur la présence de Listeria monocytogenes dans les aliments prêts-à-manger* (2011) de Santé Canada), ces études doivent être effectuées à une température d'au moins 7°C (Santé Canada, 2012).

5.8 Méthodes de dénombrement et d'enrichissement

En vue du dénombrement, l'échantillon devrait se trouver en dilution de 1:5 au moyen d'un diluant liquide approprié. Pour les matrices alimentaires exigeant une dilution plus importante afin de faciliter l'étalement du bouillon aliment-diluant sur la plaque de gélose, il est possible de recourir à une dilution de 1:10. La détermination quantitative de *L. monocytogenes* devrait être effectuée conformément à la méthode MFLP-74 (Direction générale des produits de santé et des aliments de Santé Canada) - *Dénombrement de Listeria monocytogenes dans les aliments* (Pagotto *et coll.*, 2011a). Si de faibles concentrations de *L. monocytogenes* sont escomptées, il est conseillé d'utiliser une méthode de dénombrement par NPP (idéalement à l'aide d'un minimum de 5 répétitions), en plus de la méthode d'ensemencement direct sur plaque décrite ci-dessus.

Dans le cadre des études de létalité exigeant une étape d'enrichissement, le laboratoire devrait recourir à une méthode d'enrichissement (p. ex., MFHPB-30, *Isolement de Listeria monocytogenes dans tous les types d'aliments et dans les échantillons environnementaux*

Test de provocation pour *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger réfrigérés

(Pagotto *et coll.*, 2011b) ou n'importe quelle méthode d'enrichissement pour *L. monocytogenes* publiée dans le Compendium de méthodes d'analyse de Santé Canada et dont la section *Application* est appropriée aux fins prévues (p. ex., méthodes MFHPB et méthodes MFLP)). Le recours aux étapes d'enrichissement est indiqué lorsque les concentrations escomptées de cellules survivantes sont inférieures à la limite de détection de l'ensemencement direct.

Tableau 2. Exemples de suggestions de températures d'incubation et de périodes d'entreposage*

| Température | Durée | Référence |
|---|--|---------------------|
| Températures de distribution, d'entreposage et d'utilisation | Au minimum, une période équivalente à la durée de conservation prévue, y compris une marge de sécurité | CCA (2009b) |
| 7°C, puisqu'il s'agit d'une température qui reflète des conditions raisonnablement prévisibles de distribution, d'entreposage et d'utilisation | Jusqu'à la fin de la durée de conservation prévue | Santé Canada (2012) |
| 7 °C, puisqu'il s'agit de la température qu'on peut s'attendre d'un entreposage chez le consommateur en présence d'une légère rupture dans la chaîne du froid | Au minimum, pendant la durée de conservation prévue; idéalement, ajouter une marge de sécurité; 25 % si la durée de conservation prévue est de 3 à 6 mois et 50 % si la durée de conservation prévue est de 7 à 10 jours | NACMCF (2010) |
| Sélectionner des températures auxquelles le produit devrait normalement être exposé; tenir compte du cycle thermique | Période minimale pour la durée de conservation souhaitée du produit; une marge de sécurité est même préférable | US FDA (2001) |

| | | |
|---|--|---------------------------------|
| Cycle thermique : Exemple - 1/3 de la période à 8 °C pour l'entrepôt du fabricant; 1/3 de la période à 12 °C pour la vitrine du détaillant et 1/3 de la période à 12 °C pour l'entreposage du consommateur. | La période est justifiée par des renseignements détaillés – selon la situation et l'étude. | Beaufort <i>et coll.</i> (2008) |
| 4, 10 et 25 °C | 1,5 fois la durée de conservation souhaitée | Santé Canada (2010) |

*- Les températures et les périodes d'entreposage sont fournies à titre d'exemples. Les températures et les périodes d'entreposage appropriées pour le produit alimentaire, ainsi que ses conditions d'entreposage, devraient être utilisées dans la conception des études de provocation pour des produits alimentaires particuliers.

5.9 Documentation des résultats

Tous les aspects de l'étude de provocation devraient être documentés dans un rapport, notamment l'information sur les souches sélectionnées et leur préparation, les propriétés et la durée de conservation visée du produit alimentaire à l'étude, la méthode d'inoculation, la justification des conditions et des périodes d'entreposage, le protocole et la méthode d'échantillonnage, les méthodes de dénombrement et d'isolation, les données brutes, les représentations graphiques et les calculs, de même que les conclusions et l'interprétation. Chaque sous-ensemble de l'expérience devrait être documenté indépendamment les uns des autres. Le raisonnement et les données statistiques qui ont mené à chaque décision devraient également être documentés.

6. Mesures à prendre lorsque les produits alimentaires favorisent la multiplication de *Listeria monocytogenes*

Pour des directives sur les procédures et les pratiques recommandées en vue de réduire le risque de présence de *L. monocytogenes* dans les produits alimentaires PAM, veuillez consulter la *Politique sur la présence de Listeria monocytogenes dans les aliments prêts-à-manger* (Santé Canada, 2011). En général, l'innocuité alimentaire est régie par l'observation de bonnes pratiques d'hygiène et des procédures fondées sur l'analyse des risques et la maîtrise des points critiques (HACCP).

Il serait peut-être possible de reformuler un produit alimentaire pour prévenir la multiplication de *L. monocytogenes* en altérant la composition de celui-ci, c.-à-d., diminuer le pH, réduire l' a_w au moyen d'agents adéquats, ajouter des agents antimicrobiens autorisés, etc. Une nouvelle évaluation des traitements de létalité et/ou de la durée de conservation sera peut-être nécessaire. L'évaluation de la qualité microbiologique de chaque ingrédient peut également fournir des renseignements utiles.

7. Définitions

Durée de conservation

Selon l'article B.01.001 du titre 1 de la Partie B (Aliments) du *Règlement sur les aliments et drogues*, la *durée de conservation* désigne : « ... la période, commençant le jour de l'emballage pour la vente au détail, pendant laquelle un produit préemballé qui est en stockage dans des conditions qui conviennent audit produit, retiendra, sans détérioration appréciable, la nature saine, le caractère agréable au goût et la valeur nutritive que possède ordinairement ce produit, ainsi que toute autre qualité revendiquée par le fabricant » (*durable life*) (Gouvernement du Canada, 2012).

Date limite de conservation :

Selon l'article B.01.001 du titre 1 de la Partie B (Aliments) du *Règlement sur les aliments et drogues*, la *date limite de conservation* désigne : « ... la date où la durée de conservation d'un produit préemballé prend fin » (*durable life date*) (Gouvernement du Canada, 2012).

8. Références

ASPC (Agence de la santé publique du Canada). (2009). [Éclosion de la bactérie *Listeria*](#). Consulté le 23 octobre 2012.

ASPC (Agence de la santé publique du Canada). (2012). [Listeria monocytogenes – Fiche Technique Santé/Sécurité : Agents Pathogènes](#). Consulté le 23 octobre 2012.

Analytical Laboratory of Accreditation Criteria Committee. (2006). AOAC International Guidelines for Laboratories Performing Microbiological and Chemical Analyses of Food and Pharmaceuticals. AOAC International.

Anonyme. (2008). [Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Associated with Pasteurized Milk from a Local Dairy - Massachusetts, 2007](#). CDC-MMWR 57(40): p. 1097 à 1100. Consulté le 23 octobre 2012.

Augustin, J.-C., Bergis, H., Midelet-Bourdin, G., Cornu, M., Couvert, O., Deni, C., Huchet, V., Lemonnier, S., Pinon, A., Vialette, M., Zuliani, V. et V. Stahl. (2010). Design and Challenge Testing Experiments to Assess the Variability of *Listeria monocytogenes* Growth in Foods. *Food Microbiol.* 28: p. 746 à 754

Beaufort, A., Cornu, M., Bergis, H., Lardeux, A-L. et B. Lombard. (2008) [Technical Guidance Document on Shelf-Life Studies for *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods](#). Version 2. Consulté le 23 octobre 2012.

Comité des méthodes microbiologiques. (2011). [Annexe 4.2 : Procédure d'élaboration et de gestion des méthodes microbiologiques dans les aliments - Procédure pour endommager \(ou stresser\) des microorganismes dans les échantillons artificiellement contaminés](#). Méthodes officielles d'analyse microbiologique des aliments. Compendium de méthodes, volume 1. Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada. Consulté le 23 octobre 2012.

CCA (Commission du Codex Alimentarius). (2009a). [Avant-projet de critères microbiologiques pour *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-consommer](#). - Alinorm 09/32/13 - Appendice II - Étape 5- Consulté le 23 octobre 2012.

CCA (Commission du Codex Alimentarius). (2009b). [Hygiène des denrées alimentaires \(textes de base\)](#). 4^e éd. Consulté le 23 octobre 2012.

Corry, J.E.L., Jarvis, B. et A.J. Hedges. (2010). Minimising the Between-Sample Variance in Colony Counts on Foods. *Food Microbiol.* 27: p. 598 à 603

D'Amico, D.J. et C.W. Donnelly. (2008). Enhanced Detection of *Listeria* spp. in Farmstead Cheese Processing Environments through Dual Primary Enrichment, PCR, and Molecular Subtyping. *J. Food Prot.* 71(11): p. 2239 à 2248

Dawson, S.J., Evans, M.R.W., Willby, D., Bardwell, J., Chamberlain, N. et D.A. Lewis. (2006). *Listeria* Outbreak Associated with Sandwich Consumption from a Local Hospital Retail Shop, Royaume-Uni. *Euro. Surveill.* 11(6): p. 89 à 91

Doyle, M.E., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W. et V.N. Scott. (2001). Heat Resistance of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 64(3): p. 410 à 429

Gorski, L., Flaherty, D. et R.E. Mandrell. (2006). Competitive Fitness of *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains in Mixed Cultures with and without Food in the U.S. Food and Drug Administration Enrichment Protocol. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1): p. 776 à 783

Gouvernement du Canada (2012). [Règlement sur les aliments et drogues](#). Consulté le 23 octobre 2012.

Hayman, M.M., Kouassi, G.K., Anantheswaran, R.C., Floros, J.D. et S.J. Knabel. (2008). Effect of Water Activity on Inactivation of *Listeria monocytogenes* and Lactate Dehydrogenase During High Pressure Processing. *Int. J. Food Microbiol.* 124(1): p. 21 à 26

Herruzo-Cabrera, R., Vizcaino-Alcaide, M.J. et M.J. Fernández-Aceñero. (2004). The Influence of Laboratory Adaptation on Test Strains, such as *Pseudomonas aeruginosa*, in the Evaluation of the Antimicrobial Efficacy of Ortho-phthalaldehyde. *J. Hosp. Inf.* 57: p. 217 à 222

- Koutsoumanis, K.P. et J.N. Sofos.** (2004). Comparative Acid Stress Response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium After Habituation at Different pH Conditions. *Lett. Appl. Micro.* 38: p. 321 à 326
- Mead, P.S., Dunne, E.F., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Sauders, B.D., Hayes, P., Dewitt, W., Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Slutsker, L. et B. Swaminathan.** (2006). Nationwide Outbreak of Listeriosis due to Contaminated Meat. *Epidemiol. Infect.* 134: p. 744 à 751
- NACMCF (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods)** (2010). Parameters for Determining Inoculated Pack / Challenge Study Protocols. *J. Food Prot.* 73: p. 140 à 202
- Notermans, S., Veld, P., Wijtzes, T. et G.C. Mead.** (1993). A User's Guide to Microbial Challenge Testing for Ensuring the Safety and Stability of Food Products. *Food Microbiol.* 10: p. 145 à 157
- Pagotto, F., Corneau, C., Scherf, P., Clark, L.C. et J.M. Farber.** (2005). Molecular Typing and Differentiation of Foodborne Bacterial Pathogens. Dans: P.M. Fratamico, A.K. Bhunia, et S.L. Smith (éd.), *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*, Caister Academic Press, p. 51 à 75
- Pagotto, F., Ng, L-K., Clark, C., Farber, J. et le Réseau des laboratoires de santé publique du Canada.** (2006). Canadian Listeriosis Reference Service. *Foodborne Pathogens and Disease.* 3(1): p. 132 à 137
- Pagotto, F., Trottier, Y-L., Upham, J., and Iugovaz, I.** (2011a) [MFLP-74 : Dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans les aliments.](#) Méthodes pour l'analyse microbiologique des aliments. Compendium de méthodes, volume 3. Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada. Consulté le 23 octobre 2012.
- Pagotto, F., Hébert, K., Farber, J.** (2011b) [MFHPB-30: Isolement de *Listeria monocytogenes* et autres *Listeria* spp. dans les aliments et les échantillons environnementaux.](#) Méthodes pour l'analyse microbiologique des aliments. Compendium de méthodes, volume 2. Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada. Consulté le 23 octobre 2012.
- Peck, M.W.** (2006). *Clostridium botulinum* and the Safety of Minimally Heated, Chilled Foods: an Emerging Issue? *J. Appl. Microbiol.* 101(3): p. 556 à 570
- Santé Canada.** (2010). [Test de provocation pour déterminer la capacité de *Clostridium botulinum* de se multiplier et de produire des toxines dans les aliments prêts-à-manger.](#) Direction des aliments, Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada. Consulté le 23 octobre 2012.

Santé Canada. (2011). Politique sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger. Direction des aliments, Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada. Consulté le 23 octobre 2012.

Santé Canada (2012). Validation du changement de catégorie des aliments prêts-à-manger, soit de la catégorie 1 à la catégorie 2A ou 2B – en lien avec la Politique sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger (2011) de Santé Canada.

Scott, V. N., Swanson, K., Frier, T. A., Pruett jr., W. P., Sveum, W. H., Hall, P.A., Smoot, L. A. et D.G. Brown. (2005). Guidelines for Conducting *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Foods. *Food Prot. Trends* 25(11): p. 818 à 825

US FDA. (2001). Safe Practices for Food Processes. Chapitre 6: Microbiological Safety of Controlled and Modified Atmosphere Packaging of Fresh and Fresh Cut Produce. Consulté le 23 octobre 2012.

US FDA. (ébauche, 2008). Compliance Policy Guide. Chapitre 5-Foods, Colors and Cosmetics. Sec. 555.320 *Listeria monocytogenes*. Consulté le 23 octobre 2012.

Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., François, K., Devlieghere, F. et J. Debevere. (2004). Evaluation of a Challenge Testing Protocol to Assess the Ability of Ready-to-Eat Cooked Meat Products Against Growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 90: p. 219 à 236