



**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE
SUIVANT LA NORME V 03-100**

N° attestation : UNI – 03/2 – 04/95

| | |
|-------------------------|-------------------|
| Date de validation : | 11.04.1995 |
| Dates de reconduction : | 11.04.1999 |
| | 24.06.2003 |
| Fin de validité : | 11.04.2007 |

La Société **OXOID**
(siège social 6, Route de Paisy – BP 13
et distributeur) 69671 DARDILLY CEDEX

Site de **UNIPATH Ltd**
production Priory Business Park
Bedford –
Bedfordshire MK44 3 UP – U.K.

est autorisée à faire référence à cette **attestation de validation AFNOR** pour la méthode alternative d'analyse ci-dessous :

Test Clearview *Listeria* OLRT : OXOID *Listeria* Rapid Test

Références du protocole : FT0401A x 4932D – FT0401M x 4899D – FT0405M x 5126D

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test, basé sur une immunochromatographie, est mis en œuvre après deux phases d'enrichissement (en Fraser demi, puis en bouillon BLEB).

Dans le cadre de la Validation AFNOR, tous les échantillons positifs à l'issue du test Clearview doivent être confirmés à partir du bouillon BLEB non chauffé de l'une des manières suivantes :

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification) en réalisant des isollements sur les milieux Palcam ou Oxford,
- ou bien par isolement sur le milieu OCLA et confirmation sur deux colonies caractéristiques (en incluant l'étape de purification) avec test d'hémolyse et test des glucides : galerie biochimique.

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Cette méthode ne permet pas la détection de *Listeria grayii subsp grayii* et de *Listeria grayii subsp murrayi*.

METHODES DE REFERENCE

Etude 1994/95 :

Norme AFNOR V 08-055 (décembre 1993) : Microbiologie alimentaire – Recherche de *Listeria monocytogenes* – méthode de routine

Etudes 1999 et 2003:

NF EN ISO 11290-1 (février 1997) : Microbiologie des aliments – méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* – Partie 1 : Méthode de recherche.

**Le Directeur Exécutif
Jacques BESLIN**

PRATICABILITE (Etude 1999)

- L'obtention des résultats **positifs** se fait en 5 à 6 jours avec le test Clearview Listeria contre 4 à 7 jours avec la méthode de référence NF EN ISO 11290-1.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec le test Clearview Listeria contre 5 à 7 jours avec la méthode de référence NF EN ISO 11290-1.
- Les résultats positifs par le test Clearview Listeria avec confirmation négative par la méthode de référence sont obtenus en 3 à 4 jours

La méthode alternative permet un gain de temps lorsque les échantillons négatifs sont présents en majorité dans une série d'échantillons.

SPECIFICITE (Etude 1994)

- 48 souches de *Listeria* ont été détectées sur 50 testées. Les 2 souches non reconnues sont des souches de *Listeria grayii* (voir restrictions d'emploi).
- l'étude de 30 souches n'appartenant pas au genre *Listeria* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

LIMITE DE DETECTION INTRINSEQUE (Etude 1994)

- La limite de détection intrinsèque, a été déterminée à l'aide des 4 souches pures de *Listeria* suivantes: *L.seeligeri* 1/2b, *L. monocytogenes* 4b, *L. monocytogenes* 1/2a, *L. innocua* 6a.
- Le nombre de *Listeria* à introduire pour obtenir une réponse positive avec la méthode Clearview Listeria est de $9,5 \cdot 10^4$ UFC/ml.

LIMITE DE DETECTION (Etude 1994)

Des essais ont été effectués en 1994, sur 4 aliments (fromage, charcuterie, poisson fumé, légume cru), contaminés artificiellement chacun par 4 souches de *Listeria*: (*Listeria monocytogenes* 1/2a, *Listeria monocytogenes* 4b, *Listeria innocua* 6a, *Listeria seeligeri* 1/2b) à 5 niveaux de contamination (0 ; 1 à 10 ; 5 à 50 ; 10 à 100 et 100 à 1000 UFC/25g).

Des essais complémentaires ont été effectués sur une matrice produit carné contaminée artificiellement par deux souches (*Listeria monocytogenes* 4b et *Listeria innocua* 1/2a) à 4 niveaux de contamination.

Les produits ont été analysés en double par le test Clearview Listeria et par la méthode de référence.

Les résultats globaux obtenus sont les suivants :

| Niveau de contamination en UFC/25g | Méthode alternative % d'échantillons détectés | Méthode de référence % d'échantillons détectés |
|------------------------------------|--|---|
| 1 à 10 | 84 | 84 |
| 11 à 46 | 95 | 79 |
| 53 à 89 | 97 | 91 |
| 421 à 960 | 100 | 100 |

Conclusion

La limite de détection de la méthode Clearview *Listeria* se situe entre 1 et 10 UFC/25 g.

Les 2 méthodes ont des limites de détection du même ordre (une souche de *Listeria seeligeri* n'a pas été détectée par les 2 méthodes).

JUSTESSE

Comparaison des performances de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence

Etude 1994 (méthode de référence V 08-055)

Des essais ont été effectués en 1994, sur 167 échantillons (produits carnés, laitiers, de la mer et végétaux), dont 81 naturellement contaminés et 86 naturellement non contaminés. Le protocole de confirmation comprenait les milieux Palcam et Oxford uniquement.

Les résultats sont les suivants :

- Faux positifs : 0
- Faux négatifs : 2
- Positif supplémentaire méthode alternative : 1
- Concordants : 164

Conclusion

Le taux de concordance entre la méthode de référence et la méthode Clearview *Listeria* est de 98,2%.

Etude 2003 (méthode de référence NF EN ISO 11290-1)

Des essais ont été effectués en 2003 afin d'inclure le milieu chromogène OCLA pour la confirmation des échantillons présumés positifs en plus des milieux Palcam et Oxford.

120 échantillons positifs ont été analysés par les deux méthodes, dont 51% naturellement contaminés.

Les résultats sont les suivants :

- Faux positifs : 0
- Faux négatifs : 3
- Positif supplémentaire méthode alternative : 0
- Concordants : 117

Conclusion

Le taux de concordance entre la méthode de référence et la méthode Clearview *Listeria* est de 97,5%.

FIDELITE (étude 2003)

Les valeurs de fidélité ont été déterminées au cours d'un essai effectué en 2003 comprenant 11 laboratoires. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait entier pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* 1/2a aux 4 niveaux suivants: 0, 1-10, 5-50, 10-100 bactéries/25 ml.

Les laboratoires ont testé, en double, un échantillon pour chaque niveau de contamination, soit 88 analyses au total.

Les résultats par niveau de contamination sont les suivants :

| Niveaux | Nombre d'échantillons total | Nombre d'échantillons analysés* | Nombre de résultats négatifs | Nombre de résultats positifs | Nombre de résultats inexploités* |
|----------|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 22 | 20 | 20 | 0 | 2 |
| 1 à 10 | 22 | 20 | 0 | 20 | 2 |
| 5 à 50 | 22 | 20 | 0 | 20 | 2 |
| 10 à 100 | 22 | 20 | 0 | 20 | 2 |

* Un laboratoire a reçu les échantillons à une température supérieure à 8°C. Les échantillons n'ont pas été analysés.

Listeria monocytogenes a été identifiée par l'ensemble des laboratoires collaborateurs à partir du milieu OCLA.

Conclusion

Le pourcentage de concordance globale avec les résultats attendus est de 100%.
La méthode Clearview *Listeria* est fidèle.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR CERTIFICATION toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFNOR CERTIFICATION tient à votre disposition un document de synthèse des études préliminaire et collaborative