

TEST D'IDENTIFICATION DE LISTERIA MONOCYTOGENES ISOLÉE PAR CULTURE

(bioMérieux ref. 39500 / Hologic Cat. No. 102920)

UTILISATION

Le *Test AccuProbe Listeria monocytogenes* est un test rapide d'identification de *Listeria monocytogenes* par sonde ADN à partir de culture ou de pré-enrichissement. Ce test utilise la technique d'hybridation des acides nucléiques.

Un protocole de détection est également proposé et a été certifié par AFNOR Certification sous la référence N° BIO 12/4-02/95 (voir paragraphe CONTROLE MICROBIOLOGIQUE paragraphe C).

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes est un microorganisme d'origine tellurique qui a été dispersé dans l'environnement. On le trouve dans l'eau, les produits agricoles et chez les animaux. Microorganisme pathogène de l'homme connu depuis plus de 50 ans, *L. monocytogenes* est l'agent étiologique de la listériose, laquelle provoque méningites, encéphalites, septicémies, endocardites, avortements, abcès et lésions locales purulentes chez l'homme (2,4). Au cours de la dernière décennie, plusieurs épidémies de listériose ont été rattachées à la consommation de nourriture contaminée. Les femmes enceintes, les nouveau-nés, les patients immuno-déficients et les personnes âgées sont les plus exposés au risque de contracter une listériose (5).

En routine, l'identification de *L. monocytogenes* repose sur des méthodes physiologiques et biochimiques: morphologie, coloration de Gram, catalase, mobilité, bêta-hémolyse sur gélose au sang et fermentation des sucres (8).

Le *Test AccuProbe Listeria monocytogenes* permet la mise en évidence de *Listeria monocytogenes* en 35 minutes après préparation de l'échantillon.

PRINCIPE

Les tests par hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité de brins complémentaires d'acides nucléiques à s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaux stables (6). La méthode AccuProbe utilise une sonde ADN monocaténaire conjuguée à un marqueur chimiluminescent complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr) de l'organisme cible. Lorsque l'ARNr de l'organisme cible est libéré, la sonde s'hybride avec celui-ci pour former un complexe ADN-ARN stable. Le Réactif de Sélection permet de différencier les sondes hybridées des sondes non hybridées. Le luminomètre Hologic permet de mesurer le signal lumineux émis par les hybrides ADN-ARN. Le résultat est positif si le luminomètre indique une valeur supérieure ou égale à la valeur seuil; le résultat est négatif s'il indique une valeur inférieure.

RÉACTIFS

Remarque : Pour obtenir des informations sur les mentions de danger et de mise en garde qui pourraient être associées à ces réactifs, consultez la Safety Data Sheet Library (Bibliothèque des fiches techniques de sécurité) à l'adresse www.hologic.com/sds.

Les réactifs utilisés pour le *Test AccuProbe Listeria monocytogenes* sont fournis dans trois coffrets distincts:

COFFRET ACCUPROBE *Listeria monocytogenes*

(bioMérieux ref. 39500 / Hologic Cat. No. 102920)

Réactif Sonde (P) (4 x 5 tubes)
Listeria monocytogenes.

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES ACCUPROBE

(bioMérieux ref. 39305 / Hologic Cat. No. 102800)

Réactif 1 (Réactif de Lyse) (1) 1 x 10 ml
Solution tamponnée contenant 0,04% d'azide de sodium.

Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) (2) 1 x 10 ml
Solution tamponnée.

Réactif 3 (Réactif de Sélection) (3) 1 x 60 ml
Solution tamponnée.

COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION HOLOGIC

(bioMérieux ref. 39300 / Hologic Cat. No. 201791)

Réactif de Détection I (RI) 1 x 240 ml
0,1% d'eau oxygénée dans de l'acide nitrique 0,001 N.

Réactif de Détection II (RII) 1 x 240 ml
Hydroxyde de sodium 1 N.

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- A. Pour diagnostic in vitro ou pour la microbiologie industrielle.
- B. Observer les précautions habituelles lors de la réalisation de ce test (3).
- C. A utiliser uniquement pour l'identification de *L. monocytogenes* à partir d'une culture.
- D. Utiliser uniquement le matériel fourni ou du matériel à usage unique.
- E. Certains réactifs utilisés dans ce test contiennent de l'azide de sodium susceptible de former, par réaction avec le plomb ou le cuivre des canalisations, des azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination de ces réactifs, prendre soin de toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azide dans la plomberie.
- F. Eviter le contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant d'essuyer.
- G. Pour obtenir des performances optimales, il est recommandé avant de commencer le test de regarder si le produit s'est déplacé. Si c'est le cas, taper le tube par le haut pour faire descendre le contenu au fond du tube.
- H. Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (exemple norme ISO 7218) (12).

CONSERVATION

Les tubes de Réactif Sonde doivent être conservés dans leur sachet en aluminium à 2° - 8°C. Ils sont stables avant ouverture jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le sachet doit être refermé hermétiquement et les tubes restants utilisés dans un délai de deux mois, dans la limite de la date de péremption.

Les autres réactifs du *Test AccuProbe Listeria monocytogenes* peuvent être conservés entre 2° et 25°C et sont stables jusqu'à la date de péremption.

NE PAS CONGELER LES REACTIFS

PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Le *Test AccuProbe Listeria monocytogenes* est conçu pour identifier *L. monocytogenes* isolée à partir d'une culture. La détection de *L. monocytogenes* dans les aliments se fait après une phase de pré-enrichissement.

DIAGNOSTIC IN VITRO

A. **Identification à partir de culture sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des cultures réalisées sur un milieu solide approprié, comme une gélose à 5% de sang de mouton, une gélose coeur-cerveille ou une gélose chocolat. Des milieux sélectifs comme la gélose McBride et la gélose LPM (Remel) peuvent également être utilisés. L'échantillon peut être testé dès que les colonies sont visibles et au cours des 72 heures suivantes.

1. L'échantillon peut être prélevé à l'aide d'une oese en plastique jetable de 1 µl, d'une oese métallique, d'une aiguille en plastique jetable ou d'un bâtonnet applicateur. Ne pas utiliser d'écouvillon en raison du faible volume de liquide dans lequel les bactéries vont être remises en suspension.
2. Il est possible de tester soit plusieurs petites colonies (3 ou 4), soit le contenu d'une oese de 1 µl, soit une seule colonie d'un diamètre d'au moins 1 mm.
3. Eviter de prélever du milieu de culture en même temps que les bactéries.
4. Le manipulateur peut décider d'ensemencer une autre boîte de Pétri pour confirmer la pureté de l'échantillon isolé.

B. **Identification à partir de bouillon de culture.** Le test peut être pratiqué à partir de bouillons de culture appropriés, comme le bouillon trypticase-soja, le bouillon coeur-cerveille ou le bouillon d'enrichissement pour *Listeria* LEB (*Listeria* Enrichment Broth), dont la turbidité doit être supérieure ou égale à 1 unité McFarland. Prélever à la pipette un échantillon de 50 µl de la suspension du bouillon parfaitement homogénéisé, et le distribuer dans le tube de Réactif Sonde en suivant les instructions du paragraphe « MODE OPERATOIRE »

CONTROLE MICROBIOLOGIQUE

Le protocole décrit au paragraphe C de ce chapitre est validé par certifié par AFNOR Certification.

A. **Identification ou détection à partir de culture sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des colonies isolées sur un milieu solide approprié (gélose à 5% de sang de mouton, géloses PALCAM, Oxford ou McBride). La culture doit avoir moins de 72 heures et peut être testée dès que les colonies sont visibles.

1. L'échantillon peut être prélevé à l'aide d'une oese en plastique jetable de 1 µl, d'une oese métallique, d'une aiguille en plastique jetable d'une pipette Pasteur boutonnée ou d'un

bâtonnet applicateur. Ne pas utiliser d'écouvillon en raison du faible volume de liquide dans lequel les bactéries vont être remises en suspension.

2. Il est possible de tester soit plusieurs petites colonies (3 ou 4), soit une seule colonie d'un diamètre d'au moins 1 mm (1 colonie contient de 10¹¹ à 10¹² bactéries), soit de prélever au point d'inoculation (oese de 1 µl).
3. Eviter de prélever du milieu de culture avec les bactéries.
4. Prélever, selon la richesse de la culture, soit l'ensemble des colonies présentes, soit celles présentes dans la zone d'inoculation.
5. L'opérateur peut décider d'ensemencer une autre boîte de Pétri pour confirmer la pureté de l'échantillon isolé.

B. Identification à partir de bouillon de culture. Le test peut être pratiqué directement à partir d'un bouillon de culture approprié. Selon des études réalisées sur différents milieux (1, 7), seuls certains bouillons peuvent être utilisés directement. Des bouillons non-sélectifs comme les bouillons cœur-cerveille, trypticase-soja, Listeria Enrichment Broth ou Todd-Hewitt donnent de bons résultats tandis que certains plus sélectifs (L. PALCAMY, UVM, Fraser) diminuent la sensibilité du test, pouvant donner des résultats faussement négatifs. L'incubation doit être poursuivie pendant 48 heures à 30°C. **L'utilisation de bouillons Fraser, UVM, L. PALCAMY impose la réalisation d'une subculture sur milieu solide.**

Prélever 50 µl du bouillon de culture bien homogénéisé et les mettre dans le tube de Réactif Sonde suivant les instructions du paragraphe C du Mode Opérateur.

C. Protocole certifié par AFNOR Certification N° BIO 12/4-02/ pour tous produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement de production.

J0 1. Homogénéiser X g d'échantillon dans 9 X de bouillon Fraser demi puis incubé pendant 18-24 heures à 30° ± 1°C.

Note : dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les pesées supérieures à 25g n'ont pas été testées.

J0 + 24h 2. Après incubation, ensemencer le bouillon d'enrichissement à l'aide d'un écouvillon par la méthode en strie large sur une gélose Palcam (tous produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement de production) ou Oxford (produits laitiers) et l'incuber 18-24 heures à 37° ± 1°C (gélose N° 1).

3. L'incubation du bouillon Fraser demi est prolongée de 18-24 heures à 30° ± 1°C.

J0 + 48h 4. Après 18-24 heures d'incubation à 37° ± 1°C de la gélose N° 1, la détection de *Listeria monocytogenes* est faite à partir des colonies caractéristiques développées sur la gélose sélective, selon le protocole décrit dans la partie A de ce chapitre et en se rapportant au chapitre «MODE OPERATOIRE». En l'absence de colonies caractéristiques sur la boîte ou en cas de test AccuProbe négatif :

- prolonger l'incubation de la gélose N° 1 pendant 18-24H supplémentaires à 37° ± 1°C

- ensemencer une nouvelle gélose sélective (gélose N° 2) à partir du bouillon Fraser-demi, incubé pendant 48 heures. Incuber la gélose pendant 24 heures à 37° ± 1°C

J0 + 72h 5. Après 48 heures d'incubation (gélose N° 1) ou 24 heures d'incubation (gélose N° 2), procéder à la détection de *Listeria monocytogenes* selon le protocole décrit dans la partie A de ce chapitre et en se rapportant au chapitre «MODE OPERATOIRE». En l'absence de colonies caractéristiques mais en présence de colonies non caractéristiques, réaliser le test en prélevant l'échantillon au point d'inoculation.

Confirmation des résultats positifs : dans le cadre du protocole certifié NF VALIDATION, tout résultat trouvé positif par la méthode AccuProbe doit être confirmé. La confirmation sera réalisée grâce à l'une des trois options suivantes :

- par la mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification).
- par l'utilisation d'un milieu chromogène de type « *Listeria* selon Ottaviani et Agosti » décrit dans la norme ISO 11290-1 ou d'un milieu chromogène utilisé dans une méthode ayant fait l'objet d'une validation AFNOR. A l'aide d'une oese de 1µl, prélever au point d'inoculation sur la boîte PALCAM ayant donné un résultat AccuProbe positif et procéder à un isolement sur milieu chromogène. Incuber les boîtes dans les conditions de durée et de température indiquées dans les notices des fabricants. La présence de colonies caractéristiques isolées confirme le résultat positif du test AccuProbe. Les milieux chromogènes suivants ont été testés dans le cadre des validations AFNOR de 2003 et de 2007: *Compass L. Mono Agar (2003)*, *Chromagar Listeria (2003)*, *ALOA (2003)*, *Rapid' L. Mono (2003 et 2007)* et *OAA (2007)*.
- par l'utilisation de toute autre méthode certifiée par AFNOR Certification, de principe différents de celui de la méthode AccuProbe. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO, ou après isolement sur milieu chromogène ou par une autre méthode certifiée NF VALIDATION), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu. Dans le cas de l'utilisation d'un milieu chromogène, nous conseillons de prolonger l'incubation de 24H supplémentaires ou de procéder à un second isolement, éventuellement sur un milieu chromogène différent en repartant du milieu Palcam ou du milieu Oxford.

MATÉRIEL FOURNI

Test AccuProbe Listeria monocytogenes
(bioMérieux ref. 39500 / Hologic Cat. No. 102920)

20 Tests
4 x 5 tubes

Réactif Sonde (P)

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Oeses de 1 µl en plastique stériles, oeses métalliques, aiguilles en plastique, pipettes Pasteur boutonnées ou bâtonnets applicateurs pour prélever les colonies.

Souches de contrôle

Incubateur ou bain-marie (37° ± 1°C)

Bain-marie ou bloc chauffant* (60° ± 1°C)

Micropipettes (50 µl, 300 µl)

Pipettes répétitives (50 µl, 300 µl)

Vortex

* Les emplacements à l'intérieur du bloc chauffant doivent être adaptés à des tubes de 12 X 75 mm. L'utilisation des blocs chauffants Hologic est recommandée.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DISPONIBLE CHEZ VOTRE DISTRIBUTEUR HOLOGIC:

Luminomètre Hologic Leader 50i

(bioMérieux réf. 39400 / Hologic Cat. No. 103100i)

Bloc chauffant Hologic (60° ± 1°C)

(bioMérieux réf. 39406)

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES ACCUPROBE

(bioMérieux réf. 39305 / Hologic Cat. No. 102800)

COFFRET DE REACTIFS DE DETECTION HOLOGIC

(bioMérieux réf. 39300 / Hologic Cat. No. 201791)

MODE OPERATOIRE

A. PREPARATION DU MATERIEL

1. Régler l'incubateur ou le bain-marie à 37° ± 1°C.
2. Régler le bain marie ou le bloc chauffant à 60° ± 1°C.
3. Préparer le luminomètre Hologic. S'assurer que la quantité de Réactifs de Détection I et II est suffisante pour pratiquer les tests.

B. CONTROLES

Des souches de contrôle positif et négatif doivent être testées en routine dans chaque laboratoire, selon la réglementation en vigueur. Une culture de *L. monocytogenes* (American Type Culture Collection, ATCC 35152) peut être utilisée comme contrôle positif et une culture de *Listeria grayi* (ATCC 19120) peut être utilisée comme contrôle négatif.

C. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR HYBRIDATION

1. Découper horizontalement la partie supérieure des sachets en aluminium. Retirer le nombre nécessaire de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Refermer le sachet hermétiquement en rabattant plusieurs fois son extrémité et en la fixant par un ruban adhésif ou une pince. **Ne pas retirer le sachet dessiccant.**
2. Identifier un nombre suffisant de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et les souches de contrôle. Oter et conserver les bouchons.
3. Distribuer 50 µl du Réactif 1 (Réactif de Lyse) dans chaque tube de Réactif Sonde. Si le test est pratiqué sur des souches isolées à partir de bouillon de culture, ne pas ajouter de Réactif 1 dans les tubes de Réactif Sonde.
4. Transférer l'échantillon provenant du milieu solide ou 50 µl du bouillon de culture correctement homogénéisé dans les tubes de Réactif Sonde suivant les instructions du chapitre « PREPARATION DE L'ECHANTILLON ». Si le test est réalisé à partir d'un milieu solide, agiter l'oese ou l'aiguille dans le Réactif 1 pour remettre les microorganismes en suspension.
5. Reboucher les tubes de Réactif Sonde et les incubent à 37° ± 1°C, pendant 5 minutes dans un bain-marie ou pendant 10 minutes dans un incubateur.

D. HYBRIDATION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou de l'incubateur. Oter et conserver les

bouchons. Distribuer 50 µl de Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) dans chaque tube de Réactif Sonde.

2. Reboucher les tubes de Réactif Sonde et les incuber pendant 15 minutes dans le bain-marie ou le bloc chauffant à $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

E. SELECTION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou de l'incubateur. Oter et conserver les bouchons. Distribuer 300 µl de Réactif 3 (Réactif de Sélection) dans chaque tube. Refermer les tubes et les agiter à l'aide d'un vortex jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
2. Incuber les tubes de Réactif Sonde pendant 5 min dans le bain-marie ou le bloc chauffant à $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Retirer les tubes du bain-marie ou du bloc chauffant et les laisser revenir à température ambiante pendant au moins 5 minutes. Oter et jeter les bouchons. **Lire les résultats à l'aide du luminomètre dans l'heure qui suit.**

F. DETECTION

1. Sélectionner le protocole approprié sur le luminomètre.
2. Afin de retirer tout résidu de la surface des tubes, les essuyer à l'aide de papier absorbant humide. Placer ensuite les tubes dans le luminomètre et suivre les instructions du manuel d'utilisation.
3. Lorsque l'analyse est terminée, retirer les tubes du luminomètre.

REMARQUES

- A. REACTIFS: le Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) peut précipiter. Le chauffer et l'agiter à $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$ pour dissoudre le précipité.
- B. TEMPERATURE: l'hybridation et la sélection sont des réactions thermo-dépendantes. Par conséquent, il est impératif de maintenir le bain-marie, l'incubateur ou le bloc chauffant à la température préconisée.
- C. DUREE DES OPERATIONS:
1. La réaction d'hybridation doit être initiée dans l'heure qui suit l'introduction de l'échantillon et du Réactif 1 dans les tubes de Réactif Sonde.
 2. Les réactions d'hybridation et de sélection sont dépendantes du temps. L'hybridation doit durer au moins 15 minutes, mais pas plus de 20 minutes. Pendant l'étape de SELECTION, incuber les tubes de Réactif Sonde pendant au moins 5 minutes, mais pas plus de 6 minutes.
- D. BAIN-MARIE: le niveau d'eau doit être maintenu de manière à ce que la totalité du liquide réactionnel contenu dans les tubes de Réactif de Sonde soit immergée.
- E. UTILISATION DU VORTEX: il est important d'avoir un mélange homogène lors de l'étape de SELECTION, plus particulièrement après l'addition du Réactif 3.
- F. RESOLUTION D'INCIDENTS
1. Les valeurs élevées de contrôle négatif (*Listeria grayi* ATCC 19120), supérieures à 20.000 RLU (Relative Light Units) sur le luminomètre Leader ou 600 PLU (Photometric Light Units) sur le luminomètre AccuLDR (anciennement PAL), peuvent être dûes soit à une homogénéisation

insuffisante après l'addition du Réactif 3 (Réactif de Sélection), soit à la présence de différents types de colonies. Pour vérifier si l'on est en présence d'une culture mixte, repiquer une partie de l'échantillon sur un milieu de culture gélosé approprié et le mettre à incuber. Vérifier l'aspect des colonies.

2. Des valeurs faibles de contrôle positif (*Listeria monocytogenes* ATCC 35152), inférieures à 50.000 RLU sur le luminomètre Leader ou 1.500 PLU sur le luminomètre AccuLDR, peuvent être dues à un nombre insuffisant de bactéries ou lorsque des cultures mixtes ou âgées sont testées. Pour vérifier si l'on est en présence d'une culture mixte, repiquer une partie de l'échantillon sur un milieu de culture gélosé approprié et le mettre à incuber. Vérifier l'aspect des colonies.

RÉSULTATS

A. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats du *Test AccuProbe Listeria monocytogenes* sont interprétés en fonction d'une valeur seuil. Les échantillons produisant un signal lumineux de valeur supérieure ou égale à ce seuil sont considérés comme positifs. Les signaux lumineux inférieurs à ce seuil sont considérés comme négatifs. Lorsque le résultat est situé dans la zone d'incertitude, le test doit être répété. Si la seconde analyse donne toujours des résultats équivoques, il faut repiquer la souche afin de vérifier sa pureté.

	AccuLDR (anciennement PAL)	Leader
Valeur seuil	1,500 PLU	50,000 RLU
Zone d'incertitude	1,200-1,499 PLU	40,000-49,999 RLU

B. CONTRÔLE DE QUALITÉ ET ACCEPTABILITÉ DES RESULTATS

Les contrôles négatifs (par ex. *Listeria grayi*, ATCC 19120) et positifs (par ex. *Listeria monocytogenes*, ATCC 35152) doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

	AccuLDR (anciennement PAL)	Leader
Contrôle négatif	< 600 PLU	< 20,000 RLU
Contrôle positif	> 1,500 PLU	> 50,000 RLU

Si les contrôles se trouvent en-dehors de ces zones, les résultats du test ne doivent pas être pris en considération.

LIMITES DU TEST

Cette méthode a été testée sur des cultures fraîches réalisées sur les milieux solides et sur les types de bouillons de culture cités dans le paragraphe « PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON ». Les performances de ce test n'ont pas été évaluées quand il est réalisé directement sur des échantillons cliniques (liquide céphalo-rachidien ou sang par exemple).

Les résultats du TEST D'IDENTIFICATION ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES doivent être interprétés en fonction des autres données du laboratoire et corrélés avec les données cliniques.

VALEURS ATTENDUES

Le *Test AccuProbe Listeria monocytogenes* a été comparé à des méthodes traditionnelles d'identification biochimique de culture sur 175 souches de *L. monocytogenes* et 102 autres souches appartenant à 21 genres différents. Une seconde évaluation a porté sur 296 souches isolées à partir de nourriture suspectée d'être contaminée. Les échantillons ont été déclarés soit positifs (> 50.000 RLU),

soit négatifs (< 40.000 RLU). Les résultats observés allaient de 520 à 27.990 RLU pour les cultures négatives et de 77.088 à 1.283.789 RLU pour les cultures positives. La comparaison de ces résultats avec les méthodes d'identification traditionnelles figure dans les tableaux ci-dessous:

ACCUPROBE / IDENTIFICATION DE CULTURE

AccuProbe Culture	Pos Pos	Pos Nég	Nég Pos	Nég Nég	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 1	175	0	0	102	100% / 100%	100%
Site 2	81	1	0	110	100% / 99.5%	99.7%
Total	256	1	0	212	100% / 99.7%	99.8%

La seule souche AccuProbe -positive / Culture-négative du site 2 a été re-testée avec le test ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES et a donné un résultat négatif.

PERFORMANCE DU TEST

A. PRÉCISION INTRA-ESSAI

La précision intra-essai du *Test AccuProbe Listeria monocytogenes* a été calculée en testant trois concentrations différentes d'ARN ribosomal de *L. monocytogenes*. Chaque échantillon a été testé 10 fois dans une même série.

Echantillon	A	B	C
Nombre d'essais	10	10	10
Réponse moyenne (RLU)	132.370	72.720	41.074
Ecart-type	9.981	3.126	3.837
Coefficient de variation	7,5%	4,3%	9,3%

B. PRÉCISION INTER-ESSAI

La précision inter-essai a été calculée en analysant en simple les mêmes trois concentrations d'ARN ribosomal de *L. monocytogenes* au cours de 12 séries distinctes.

Echantillon	A	B	C
Nombre d'essais	12	12	12
Réponse moyenne (RLU)	146.469	77.240	41.074
Ecart-type	19.793	8.634	4.343
Coefficient de variation	13,5%	11,2%	10,8%

C. SPECIFICITE

Un total de 97 souches ATCC a été testé avec le TEST D'IDENTIFICATION ACCUPROBE *Listeria monocytogenes*. Ces souches représentaient au total 87 espèces issues de 53 genres différents. Un panel de 15 souches de 7 espèces de *Listeria* a été testé (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*). Seules les souches de *L. monocytogenes* ont donné des résultats positifs avec le TEST D'IDENTIFICATION ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES.

D. TEST DE SURCHARGE

5 séries de dilutions de *L. monocytogenes* (de 0 à 30 millions de microorganismes) ont été testées en présence de 30 millions de microorganismes d'espèces autres que *L. monocytogenes* (*L. grayi*, *L. ivanovii*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Brochothryx thermophacta*). Aucune interférence ni réaction croisée n'a été observée.

E. PERFORMANCES SPECIFIQUES

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, l'étude préliminaire a abouti aux résultats suivants:

- Inclusivité/exclusivité : 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées. L'étude de 18 souches de *Listeria* non monocytogenes et 12 souches n'appartenant pas au genre *Listeria* n'a pas mis en évidence de réactions croisées.
- Niveau de détection relatif : la limite de détection 50% est identique pour la méthode AccuProbe et la méthode EN ISO 11290-1 et est comprise entre 0.3 et 5.2 UFC/25 g.
- Etude comparative : sur 346 échantillons testés simultanément avec la méthode AccuProbe (gélose Palcam) et la méthode EN ISO 11290-1, les résultats suivants ont été obtenus :
 - Faux négatifs AccuProbe : 3
 - Positifs supplémentaires AccuProbe : 8
 - Résultats concordants : 335

Le paramètre AccuProbe *Listeria monocytogenes* est certifié par AFNOR Certification en tant que méthode alternative d'analyse pour tous produits alimentaires et échantillons d'environnement de production par rapport à la méthode de référence décrite dans la norme internationale EN ISO 11290-1/A1 et selon le protocole décrit dans la norme EN ISO 16140.

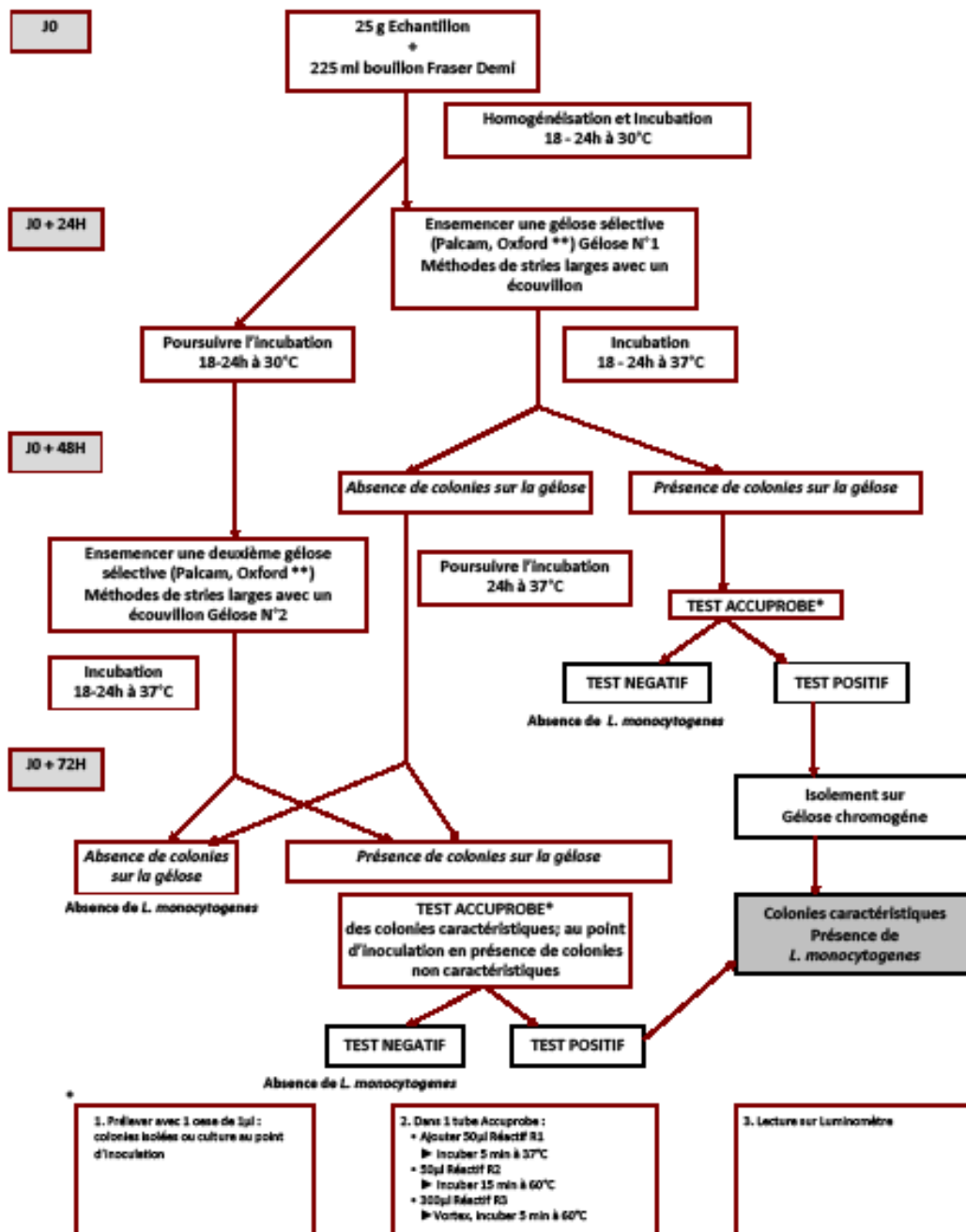
L'attestation BIO- 12/4 – 02/95 peut être obtenue auprès de notre service Assistance Technique ou auprès d'AFNOR Certification. La date de fin de validité de la certification NF VALIDATION est précisée sur l'attestation.



**BIO 12/4 - 02/95
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification
www.afnor.org**

**ANNEXE
PROTOCOLE DE LA
« METHODE RAPIDE DE DETECTION DE LISTERIA MONOCYTOGENES »
CERTIFICATION AFNOR N° BIO 12/4-02/95**

*AFNOR: Association Française de Normalisation



** Palcam: tous produits alimentaires et échantillons d'environnement ; Oxford : produits laitiers

BIBLIOGRAFIA

1. **Bobbitt J. A. y R. P. Betts.** 1992. Confirmation of *Listeria monocytogenes* using a commercially available nucleic acid probe. *Food Microbiol.*, Volume 9, p. 311-317.
2. **Bortolussi, R., W. F. Schlech, III y W. Albritton.** 1985. *Listeria*, p. 205-208. In E. H. Lennette, et al. (ed.) *Manual of clinical microbiology*, 4th Ed. American Society for Microbiology, Washington D. C.
3. **Centers for Disease Control and Prevention.** 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. 37:377-382, 387-388.
4. **Gilchrist, M. J. R.** 1988. *Listeriosis* p. 353-359. In Balows, et al. (ed.). *Laboratory diagnosis of infectious diseases, principles and practice*. Volume 1. Springer-Verlag, New York.
5. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*. 1989. p. 1-56. In Jones, G.L. (ed.) U.S. Department of Health and Human Service, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
6. **Kohne, D. E., A. G. Steigerwalt y D. J. Brenner.** 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus *Legionella*, p. 107-108. In C. Thornsberry, et al. (ed.) *Legionella: proceedings of the 2nd international symposium*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. **Ninet B., E. Bannerman y J. Bille.** 1992. Assessment of the ACCUPROBE *Listeria monocytogenes* Culture Identification Reagent Kit For Rapid Colony Confirmation and its application in various enrichment broths. *Applied Environ. Microbiol.*, Volume 58, p. 4055-4059.
8. **Seeliger, H. P. R. y D. Jones.** 1986. Genus *Listeria* pirie 1940. p. 1235-1245. In P. H. A. Sneath, et al, (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.

Other selected papers:

9. Evaluation of a DNA-Probe assay for the identification of *Listeria monocytogenes*. By L. Herman and H. De Ridder. *Milchwissenschaft* 48 (3), 1993, p. 126-128.
10. Evaluation of a chemiluminescent DNA probe assay for the rapid confirmation of *Listeria monocytogenes*. O. Okwumbua, B. Swaminathan, P. Edmonds, J. Wenger, J. Hogan y M. Alden. *Res. Microbiol.* 143, 1992, p 183-189.
11. ISO 11290-1/A1 - Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1: méthode de recherche (2004).
12. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations - ISO 7218.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 (USA)



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, AccuProbe, et Leader sont des marques commerciales et/ou des marques déposées d'Hologic, Inc. et/ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.

Toutes les autres marques commerciales qui peuvent apparaître dans ce notice sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.

ALOA est une marque de commerce de Biolife Italiana S.r.l.

CHROMAGAR est une marque de commerce d'Alain Rambach.

Ce produit peut faire l'objet d'un ou plusieurs brevets américains décrits à l'adresse www.hologic.com/patents.

103051F-01-FR Rev. 003 2018-03
©1990 – 2018 Hologic, Inc. Tous droits réservés.