

LISTERIA MONOCYTOGENES KULTURBESTÄTIGUNGSTEST

(bioMérieux Best.Nr. 39500 / Hologic Kat. Nr. 102920)

VERWENDUNGSZWECK

Der ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist ein DNA-Sonden-Schnelltest, der nach dem Prinzip der Nukleinsäurehybridisierung arbeitet und die Identifizierung von *Listeria monocytogenes* aus Kulturisolaten ermöglicht.

Darüber hinaus wird ein Nachweisverfahren vorgeschlagen, das von der AFNOR Certification zertifiziert wurde (Referenz-Nr. BIO 12/4-02/95 (siehe Abschnitt MIKROBIOLOGISCHE KONTROLLE Abschnitt C).

ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

Listeria monocytogenes ist ein vor allem im Boden vorkommendes Bakterium, das in der Natur weit verbreitet ist. Es wurde in Wasser, landwirtschaftlichen Produkten und in Tieren gefunden. *Listeria monocytogenes* ist seit über 50 Jahren als humanpathogener Erreger bekannt und wurde als ätiologisches Agens der Listeriose identifiziert, welches beim Menschen zu Meningitis, Enzephalitis, Septikämie, Endokarditis, Abort, Abszessen und lokalen eitrigen Infektionen führt (2, 4). Mehrere epidemische Häufungen von Listeriosen während der letzten 10 Jahre wurden mit dem Verzehr kontaminierter Lebensmittel in Verbindung gebracht. Zu den Personengruppen mit erhöhtem Listeriose-Risiko gehören Schwangere, Neugeborene, immungeschwächte Personen und ältere Menschen (5).

Die gängigen Identifizierungsmethoden basieren auf klassischen, physiologischen und biochemischen Methoden. Dazu zählen Gramfärbung, Katalase, Beweglichkeit, β -Hämolyse auf Blutagar und Zuckerfermentation (8).

Der ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist eine schnelle und objektive Methode zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* innerhalb von 35 min nach der Probenvorbereitung.

PRINZIP

Die Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen, spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (6). Der AccuProbe Test enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemilumineszenzmarker gekoppelt ist. Diese Sonde ist der rRNA der Zielsequenz komplementär. Nachdem die rRNA des Zielorganismus freigesetzt ist, verbindet sich die Sonde mit dieser und bildet einen stabilen DNA-RNA Komplex. Ein Selektionsreagenz baut den Chemilumineszenzmarker der ungebundenen Sonde ab, während der Marker der gebundenen Sonde intakt bleibt. Das Hologic Luminometer misst das von den DNA-RNA-Hybriden abgegebene Lichtsignal. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn der vom Luminometer angezeigte Wert gleich oder größer ist als der Grenzwert (cut-off). Liegt der Wert unterhalb des Grenzwertes, ist das Ergebnis negativ.

REAGENZIIEN

Hinweis: Informationen zu eventuell mit den Reagenzien verbundenen Gefahren- und Vorsichtshinweisen finden Sie in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologic.com/sds.

Die Reagenzien des ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES KULTURBESTÄTIGUNGSTEST werden in drei separaten Kits geliefert:

ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES TEST
(bioMérieux Best.Nr. 39500 / Hologic Kat.Nr. 102920)

Sondenreagenz (P) (4 x 5 Röhrchen)
Listeria monocytogenes.

ACCUPROBE KULTURBESTÄTIGUNGS-REAGENZIENKIT
(bioMérieux Best.Nr. 39305 / Hologic Kat.Nr. 102800)

Reagenz 1 (Lysereagenz) (1) 1 x 10 ml
Pufferlösung mit 0,04% Natriumazid.

Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) (2) 1 x 10 ml
Pufferlösung.

Reagenz 3 (Selektionsreagenz) (3) 1 x 60 ml
Pufferlösung.

HOLOGIC DETEKTIONSREAGENZIEN-KIT
(bioMérieux Best.Nr. 39300 / Hologic Kat.Nr. 201791)

Detektionsreagenz I (RI) 1 x 240 ml
0,1% Wasserstoffperoxid in 0,001 N Salpetersäure.

Detektionsreagenz II (RII) 1 x 240 ml
1 N Natriumhydroxyd.

VORSICHTSMASSNAHMEN

- A. Nur für die in vitro Diagnostik verwenden.
- B. Beachten Sie während der Testdurchführung die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (3).
- C. Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von *Listeria monocytogenes* aus der Kultur.
- D. Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.
- E. Einige Reagenzien dieses Kits enthalten Natriumazid, das mit Blei- oder Kupferrohren zu explosiven Metallaziden reagieren kann. Beim Ableiten in die Kanalisation sollten die Reagenzien immer mit reichlich Wasser verdünnt werden.
- F. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten. Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten einer dieser Reagenzien die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.
- G. Um eine optimale Testperformance zu gewährleisten, ist es empfehlenswert, die Röhrchen vor der Testung auf eventuell losgelöstes Material zu überprüfen. Wenn dies der Fall sein sollte, klopfen Sie die Röhrchen auf den Labortisch, so dass sich der Röhrcheninhalt auf dem Boden absetzt.
- H. Halten Sie die Regeln der Guten Laborpraxis ein (z.B. Norm ISO 7218) (12).

LAGERUNG

Die Sonden-Reagenzröhrchen bei 2° - 8°C in den Aluminiumbeuteln lagern. Die original verpackten Sondenröhrchen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen des Beutels sind die Röhrchen 2 Monate, längstens jedoch bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Beutel müssen nach jedem Gebrauch wieder fest verschlossen werden.

Die übrigen Reagenzien des ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES KULTURBESTÄTIGUNGSTEST sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

DIE REAGENZIEN NICHT EINFRIEREN.

PROBENVORBEREITUNG

Der ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES TEST dient zur Identifizierung von *Listeria monocytogenes* aus Kulturisolaten. Der Nachweis von *L. monocytogenes* in Lebensmitteln erfolgt nach einer Voranreicherungsphase.

KLINISCHE IN VITRO DIAGNOSTIK

- A. **Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen, die auf geeigneten Medien wie 5% Schafblutagar, Hirn-Herz-Bouillon oder Chocolat-Agar angezüchtet wurden. Darüber hinaus können auch Selektivmedien wie McBride Agar und LPM Agar (Remel) verwendet werden. Die Kulturen können getestet werden, sobald Wachstum sichtbar ist. Sie sollten nicht älter als 72 h sein.
1. Nehmen Sie Teile des Zellrasens mit einer 1 µl Einweg-Plastiköse, einer Metallöse, einer Einweg-Plastiknadel oder einem Spatel ab. Verwenden Sie wegen des geringen Flüssigkeitsvolumens, in dem die Zellen anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
 2. Wenn Sie nur eine Kolonie testen, sollte diese einen Durchmesser von mindestens 1 mm haben. Sie können 1 µl Zellen (1 Öse) oder mehrere (3 bis 4) kleinere Kolonien testen.
 3. Achten Sie darauf, dass beim Abnehmen der Zellen kein Nährboden mit abgenommen wird.
 4. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit des Stammes zu überprüfen.
- B. **Flüssige Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen aus Trypcase Soja Bouillon, Hirn-Herz-Bouillon oder Listeria Anreicherungsbouillon, deren Trübung gleich oder größer ist als McFarland Standard 1. Pipettieren Sie 50 µl Probe aus dem gut gemischten Flüssigkulturmedium in die Sonden-Reagenzröhrchen, wie im Abschnitt TESTDURCHFÜHRUNG beschrieben.

MIKROBIOLOGISCHE KONTROLLE

Das unter Punkt C dieses Abschnitts beschriebene Verfahren wurde von der AFNOR Certification zertifiziert.

- A. **Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen, die auf geeigneten festen Medien (5% Schafblutagar, PALCAM, Oxford, McBride Agar) angezüchtet wurden. Die Kulturen können getestet werden, sobald Wachstum sichtbar ist. Sie sollten nicht älter als 72 h sein.
1. Nehmen Sie Teile des Zellrasens mit einer 1 µl Einweg-Plastiköse, einer Metallöse, einer gestopften Pasteurpipette oder einer Einweg-Plastiknadel ab. Verwenden Sie wegen des geringen Flüssigkeitsvolumens, in dem die Zellen anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
 2. Sie können entweder mehrere kleine Kolonien (3 oder 4) oder eine Einzelkolonie mit einem Durchmesser von mindestens 1 mm (1 Kolonie enthält 10^{11} - 10^{12} Bakterien) oder an der Beimpfungsstelle gewachsene Kulturen abimpfen (1 µl Öse).
 3. Achten Sie darauf, dass beim Abnehmen der Zellen kein Nährboden mit abgenommen wird.
 4. Je nach Wachstum sollten entweder alle vorhandenen Kolonien oder an der Beimpfungsstelle gewachsene Kolonien abgeimpft werden.
 5. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit des Stammes zu überprüfen.
- B. **Flüssige Kulturmedien.** Der Test kann direkt mit einer geeigneten Flüssigkultur durchgeführt werden. Studien, die mit einer Auswahl an Medien durchgeführt wurden (1, 7) haben gezeigt, dass für die direkte Testung nur bestimmte Bouillons verwendet werden können. Nicht-selektive Bouillons wie Hirn-Herz-Bouillon, Trypcase-Soja, Listeria Anreicherungsbouillon, Todd-Hewitt-Bouillon liefern gute Ergebnisse, während einige selektivere Bouillons (L. PALCAMY, UVM, Fraser) falsch negative Ergebnisse und eine geringere Testsensitivität zur Folge haben. Die Inkubation

sollte bis auf 48 h bei 30°C verlängert werden. **Bei der Verwendung von Fraser, UVM oder L. PALCAMY Bouillons muss eine Subkultur auf einem festen Medium angelegt werden.**

Pipettieren Sie 50 µl der gut gemischten Bouillonkultur in das Sonden-Reagenzröhrchen, wie unter Punkt C des Abschnitts TESTDURCHFÜHRUNG beschrieben.

C. VERFAHREN, DAS VON DER AFNOR CERTIFICATION ZERTIFIZIERT WURDE; NR. BIO 12/4-02/95 FÜR ALLE LEBENSMITTEL UND UMWELTPROBEN AUS DER PRODUKTION

- Tag 0 1. Mischen Sie X g Probe mit 9X ml 1/2-Fraser-Bouillon und inkubieren Sie für 18 bis 24 h bei 30° ± 1°C.
- Anmerkung: Im Rahmen der NF VALIDATION wurden keine Testproben über 25 g getestet.
- Tag 0 + 24h 2. Legen Sie nach der Inkubation der Anreicherungsbouillon eine Subkultur auf einem Selektivmedium (Oxford Agar für Milchprodukte oder PALCAM Agar für alle Lebensmittel und Umweltpuben aus der Produktion) an. Streichen Sie die Probe mit einem Wattetupfer in breiten Strichen aus und inkubieren Sie für 18 bis 24 h bei 37° ± 1°C (Agar 1).
3. Die Inkubation der 1/2-Fraser Bouillon wird 18 bis 24 h bei 30° ± 1°C verlängert.
- Tag 0 + 48h 4. Nach 18 bis 24 h Inkubation von Agar 1 bei 37° ± 1°C wird *Listeria monocytogenes* anhand charakteristischer Kolonien auf dem Selektivagar nachgewiesen. Gehen Sie gemäß der unter Punkt A dieses Kapitels beschriebenen Methode für feste Kulturmedien vor und verfahren Sie wie im Abschnitt TESTDURCHFÜHRUNG beschrieben. Bei Abwesenheit charakteristischer Kolonien oder bei einem negativen AccuProbe Ergebnis:
- verlängern Sie die Inkubation des Selektivagars Nr. 1 für weitere 18 - 24 h bei 37° ± 1°C.
 - beimpfen Sie einen neuen Selektivagar (Agar 2) mit der für 48 h inkubierten 1/2 Fraser-Bouillon. Inkubieren Sie den Agar für 24 h bei 37° ± 1°C.
- Tag 0 + 72h 5. Nach 48- (Agar 1) oder 24-stündiger Inkubation (Agar 2) erfolgt der Nachweis von *Listeria monocytogenes* wie unter Punkt A dieses Kapitels und im Abschnitt TESTDURCHFÜHRUNG beschrieben. Bei Abwesenheit charakteristischer Kolonien, jedoch Anwesenheit nicht charakteristischer Kolonien, führen Sie den Test durch, indem Sie die Probe von der Beimpfungsstelle entnehmen.

Bestätigung positiver Ergebnisse: Gemäß dem NF VALIDATION Protokoll muss jedes AccuProbe-positive Ergebnis bestätigt werden. Die Bestätigung erfolgt anhand eines der 3 folgenden Verfahren:

- Mit klassischen Tests, die in den CEN, ISO oder AFNOR Standards beschrieben sind (einschließlich des Reinigungsschrittes).
- Mit einem chromogenen Medium vom Typ „*Listeria* nach Ottaviani und Agosti“, die in der ISO Norm 11290-1 beschrieben sind, oder einem chromogenen Medium, das in einem AFNOR-validierten Verfahren verwendet wird. Nehmen Sie mit einer 1 µl-Öse Material an der Beimpfungsstelle des PALCAM-Agars mit positiven AccuProbe-Ergebnis ab und isolieren Sie auf dem chromogenen Medium. Inkubieren Sie die Platten gemäß den Angaben des Herstellers zur Inkubationszeit und Temperatur. Die Anwesenheit charakteristischer Kolonien bestätigt das positive AccuProbe-Testergebnis. Folgende chromogenen Medien wurden im Rahmen der AFNOR Validierung im Jahr 2003 und 2007 getestet: *Compass L Mono Agar (2003)*, *Chromagar™ Listeria (2003)*, *ALOA™ (2003)* und *Rapid' L Mono (2003 und 2007)* und *OAA (2007)*.

- Mit jeder anderen von der AFNOR Certification zertifizierten Methode, die nach einem anderen Prinzip arbeitet, wie der AccuProbe-Test. Das validierte Verfahren der zweiten Methode muss genau eingehalten werden.

Bei abweichenden Ergebnissen (alternative Methode positiv - nicht bestätigt durch die in den CEN oder ISO Standards beschriebenen Methoden oder nach Isolierung auf chromogenem Medium oder durch ein anderes NF VALIDATION zertifiziertes Verfahren) müssen vom Labor die geeigneten Schritte zur Validierung des erwarteten Testergebnisses durchgeführt werden.

Bei der Verwendung eines chromogenen Mediums empfehlen wir die Verlängerung der Inkubation um weitere 24 h oder eine weitere Isolierung auf einem anderen chromogenen Medium (nach Anzucht auf Palcam oder Oxford Agar).

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Der AccuProbe *Listeria monocytogenes* KULTURBESTÄTIGUNGSTEST
bioMérieux Best.Nr. 39500 / Hologic Kat.Nr. 102920

20 Tests

Sondenreagenz (P) 4 x 5 Röhrchen

ERFORDERLICHE MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

Sterile 1 µl Plastikösen, Metallösen, gestopfte Pasteurpipetten oder Plastiknadeln zum Abimpfen der Kolonien

Kontroll-Kulturstämme

Brutschrank oder Wasserbad (37° ± 1°C)

Wasserbad oder Heizblock* (60° ± 1°C)

Mikropipetten (50 µl, 300 µl)

Repetierpipetten (50 µl, 300 µl)

Vortex

* Die Heizblöcke müssen für 12 x 75 mm Röhrchen geeignet sein. Es wird daher empfohlen, die Heizblocksysteme von Hologic zu verwenden.

ZUSÄTZLICH VERFÜGBARE MATERIALIEN

Hologic Leader 50i Luminometer
 (bioMérieux Best.Nr. 39400 / Hologic Kat.Nr. 103100i)

Hologic Heizblock (60° ± 1°C)
 (bioMérieux Best.Nr. 39406)

ACCUPROBE REAGENZIENKIT KULTURBESTÄTIGUNG
 (bioMérieux Best.Nr. 39305 / Hologic Kat.Nr. 102800)

HOLOGIC DETEKTIONSREAGENZIEN-KIT
 (bioMérieux Best.Nr. 39300 / Hologic Kat.Nr. 201791)

TESTDURCHFÜHRUNG

A. VORBEREITUNG DER GERÄTE UND MATERIALIEN

1. Stellen Sie den Brutschrank oder das Wasserbad auf 37° ± 1°C ein.
2. Stellen Sie das Wasserbad oder den Heizblock auf 60° ± 1°C ein.
3. Bereiten Sie das Hologic Leader Luminometer für die Messung vor. Vergewissern Sie sich, dass für die Durchführung des Tests ausreichend Detektionsreagenz I und II vorhanden ist.

B. KONTROLLEN

In jedem Labor sollten gemäß den örtlichen Bestimmungen routinemäßig positive und negative Kontrollstämme mitgeführt werden. Als Positivkontrolle kann *L. monocytogenes* (ATCC 35152) dienen, während *L. grayi* (ATCC 19120) als Negativkontrolle verwendet werden kann.

C. VORBEREITUNG DER PROBEN FÜR DIE HYBRIDISIERUNG

1. Die Folienbeutel am oberen Ende aufschneiden. Entnehmen Sie die für die Kulturoisolate und/oder Kontrollen erforderliche Anzahl an Sonden-Reagenzröhrchen. Den Beutel an der geöffneten Seite mehrfach umschlagen und mit Klebeband oder einer Klammer wieder dicht verschließen. Den Trockenbeutel nicht herausnehmen.
2. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Sondenröhrchen für die Kulturoisolate und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
3. Pipettieren Sie 50 µl von Reagenz 1 (Lysereagenz) in alle Sonden-Reagenzröhrchen. Wenn Bouillonkulturen getestet werden sollen, geben Sie kein Reagenz 1 in die Sonden-Reagenzröhrchen.
4. Überführen Sie die Probe vom festen Medium oder 50 µl einer gut gemischten Bouillonkultur in die beschrifteten Sonden-Reagenzröhrchen, wie im Abschnitt PROBENVORBEREITUNG beschrieben. Bei Proben von festen Kulturmedien wirbeln Sie die Öse oder Nadel in Reagenz 1 (Lysereagenz), und mischen Sie gründlich.
5. Verschließen Sie die Sonden-Reagenzröhrchen und inkubieren Sie sie für 5 min bei $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad oder 10 min in einem Brutschrank.

D. HYBRIDISIERUNG

1. Nehmen Sie die Sonden-Reagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Brutschrank. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 50 µl Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) in alle Sonden-Reagenzröhrchen.
2. Verschließen Sie die Sonden-Reagenzröhrchen und inkubieren Sie für 15 min bei $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad oder Heizblock.

E. SELEKTION

1. Nehmen Sie die Sondenröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 300 µl Reagenz 3 (Selektionsreagenz) in jedes Röhrchen. Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie diese, um den Inhalt vollständig durchzumischen.
2. Inkubieren Sie die Sondenröhrchen für mindestens 5 min bei $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad oder Heizblock.
3. Nehmen Sie die Sondenröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen und werfen Sie die Stopfen. Die Röhrchen sollten innerhalb 1 Stunde nachdem sie aus dem Wasserbad oder Heizblock genommen wurden, gemessen werden.

F. DETEKTION

1. Wählen Sie gemäß den Empfehlungen in der Arbeitsanweisung des Gerätes auf dem Luminometer das geeignete Programm.
2. Zur Säuberung der Röhrchenwand sowie zur Vermeidung von elektrostatischen Einflüssen während der Messung durch das Röhrchenmaterial selbst, sollte jedes Röhrchen vor der Messung mit einem feuchten Tuch bzw. Papier abgewischt werden. Stellen Sie die Röhrchen in das Luminometer und folgen Sie den Anweisungen im Handbuch.
3. Nehmen Sie die Röhrchen nach der Messung aus dem Luminometer.

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

- A. REAGENZIEN: Das Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) kann präzipitieren. Zur Auflösung des Niederschlags das Reagenz auf $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$ erhitzen und mischen.
- B. TEMPERATUR: Die Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängige Reaktionen. Es muss

deshalb unbedingt darauf geachtet werden, dass Brutschrank, Heizblock und Wasserbad im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.

C. REAKTIONSDAUER

1. Die Hybridisierungsreaktion sollte innerhalb 1 h nach Zugabe der Zellen und Reagenz 1 in die Sonden-Reaktionsröhrchen gestartet werden.
2. Die Hybridisierung und Selektion sind zeitabhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht unter 15 min liegen, jedoch 20 min nicht überschreiten. Die Sondenröhrchen während des Selektionsschrittes mindestens 5 min, jedoch nicht länger als 6 min inkubieren.

D. WASSERBAD: Achten Sie auf einen gleichbleibend hohen Wasserstand des Wasserbades, so dass sich die gesamte Reaktionslösung der Sonden-Reaktionsröhrchen im Wasser befindet.

E. VORTEXEN: Während des Arbeitsschrittes SELEKTION muss sehr darauf geachtet werden, dass die Reaktionsmischung absolut homogen ist, insbesondere nach Zugabe von Reagenz 3.

F. FEHLERMÖGLICHKEITEN

1. Bei Messungen mit dem Leader können hohe negative Kontrollwerte (*L. grayi* ATCC 19120) über 20.000 RLU (Relative Light Units) durch unzureichendes Mischen nach der Zugabe von Reagenz 3 (Selektionsreagenz) entstehen. Entsprechendes gilt bei Messungen mit dem AccuLDR (vormals PAL), wenn dort erhöhte negative Kontrollwerte über 600 PLU (Photometric Light Units) gemessen werden. Ein ähnlicher Effekt kann beim Testen von Mischkulturen auftreten. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Kulturmedium überimpfen und inkubieren.
2. Schwach positive Kontrollwerte (*L. monocytogenes* ATCC 35152) unter 50.000 RLU auf dem Leader oder 1500 PLU auf dem AccuLDR (vormals PAL) erhält man bei zu geringen Zellzahlen oder durch Testen von Mischkulturen oder zu alter Kulturen. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Kulturmedium überimpfen und inkubieren.

ERGEBNISSE

A. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden auf der Basis folgender Grenzwerte (cut-off) interpretiert. Ergebnisse, deren Lichtsignale diesen Grenzwerten entsprechen oder darüber liegen, werden als positiv bewertet. Lichtsignale unterhalb dieser Grenzwerte werden als negativ bewertet. Liegt das Ergebnis im Graubereich, sollte der Test wiederholt werden. Ergibt der 2. Test erneut ein zweifelhaftes Ergebnis, sollte der Stamm subkultiviert werden, um die Reinheit des Stammes zu überprüfen.

	AccuLDR (vormals PAL)	Leader
Grenzwert	1.500 PLU	50.000 RLU
Graubereich	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. QUALITÄTSKONTROLLE UND VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE

Die negativen Kontrollen (z.B. *L. grayi*, ATCC 19120) und die positiven Kontrollen (z.B. *L. monocytogenes*, ATCC 35152) müssen folgenden Sollwerten entsprechen:

	AccuLDR (vormals PAL)	Leader
Negative Kontrolle	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Positive Kontrolle	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

Liegen die Werte der Kontrollen nicht innerhalb der Sollbereiche können die Ergebnisse nicht protokolliert werden.

LIMITIERUNGEN

Diese Methode wurde mit frischen Kulturen getestet, die auf den im Abschnitt PROBENVORBEREITUNG genannten festen Medien und Flüssigkulturen angezüchtet wurden. Die Performance dieses Tests bei direkter Testung von klinischen Proben (z.B. Liquor oder Blut) wurde nicht evaluiert.

Die Ergebnisse des ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES müssen in Zusammenhang mit anderen Testergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.

NORMALWERTE

Der ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurde mit klassischen biochemischen Identifizierungsmethoden verglichen. Hierfür wurden 175 Kulturisolate von *L. monocytogenes* Spezies und 102 zusätzliche Isolate bestehend aus 21 Gattungen in 2 Labors getestet. Eine zweite Evaluierung wurde mit 296 Stämmen durchgeführt, die aus Lebensmitteln isoliert wurden, bei denen der Verdacht auf eine Kontamination vorlag. Die Stämme wurden entweder als positiv (> 50.000 RLU) oder als negativ (< 40.000 RLU) bewertet. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 520 bis 27.990 RLU ermittelt, die Ergebnisse der positiven Kulturen lagen zwischen 77.088 und 1.283.789 RLU. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den klassischen Identifizierungsmethoden ist im Folgenden angegeben.

AccuProbe Kultur	ACCUPROBE / KULTUR				Sensitivität / Spezifität	prozentuale Korrelation
	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg		
Labor 1	175	0	0	102	100% / 100%	100%
Labor 2	81	1	0	110	100% / 99,5%	99,7%
Gesamt	256	1	0	212	100% / 99,7%	99,8%

Ein AccuProbe positiver, Kultur-negativer Stamm aus Labor 2 wurde erneut mit dem ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet und reagierte negativ.

PERFORMANCE

A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des AccuProbe *Listeria monocytogenes* KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS wurden drei Konzentrationen der ribosomalen RNA von *L. monocytogenes* 10 Mal in einer Testserie bestimmt.

Probe	A	B	C
Anzahl Tests	10	10	10
Mittelwert (RLU)	132.370	72.720	41.074
Standardabweichung	9.981	3.126	3.837
Variationskoeffizient	7,5%	4,3%	9,3%

B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden die gleichen drei Konzentrationen der rRNA von *L. monocytogenes* in Einzelbestimmungen in 12 aufeinanderfolgenden Testserien bestimmt.

Probe	A	B	C
Anzahl Tests	12	12	12
Mittelwert (RLU)	146.469	77.240	41.074
Standardabweichung	19.793	8.634	4.343
Variationskoeffizient	13,5%	11,2%	10,8%

C. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 97 ATCC Stämme mit dem ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Bei diesen Stämmen handelte es sich um insgesamt 87 Spezies von 53 Gattungen. 15 Stämme von 7 Listeria-Spezies wurden getestet (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*). Nur der *L. monocytogenes* Stamm reagierte positiv.

D. WIEDERFINDUNG

5 Serumverdünnungen von *L. monocytogenes* wurden (in einem Bereich von 0 bis 30 Millionen Zellen pro Test) in Gegenwart von 30 Millionen Zellen getestet, die zu folgenden Spezies gehörten: *L. grayi*, *L. ivanovii*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Brochothryx thermophacta*. Es wurden keine Interferenzen oder Kreuzreaktionen beobachtet.

E. BESONDERE LEISTUNGSSCHARAKTERISTIKA

Eine Studie, die im Vorfeld der NF VALIDATION durchgeführt wurde, ergab folgende Ergebnisse:

- **Inklusivität/Exklusivität:** alle 50 getesteten *Listeria monocytogenes* Stämme wurden nachgewiesen. Die Testung von 18 *Listeria* (non *monocytogenes*) Stämmen und 12 Stämmen, die nicht zur Gattung *Listeria* gehörten, ergab keinerlei Kreuzreaktionen.
- **Relative Nachweisgrenze:** Die AccuProbe Methode und die ISO Referenzmethode 11290-1 haben dieselbe 50% Nachweisgrenze: zwischen 0,3 und 5,2 KBE/25g.
- **Vergleichsstudie:** 346 Proben wurden gleichzeitig mit der AccuProbe Methode (Palcam Agar) und der EN ISO Methode 11290-1 getestet. Es wurden folgende Ergebnisse ermittelt:
 - Falsch negativ mit der AccuProbe Methode: 3
 - Zusätzlich positiv mit der AccuProbe Methode: 8
 - Übereinstimmende Ergebnisse: 335

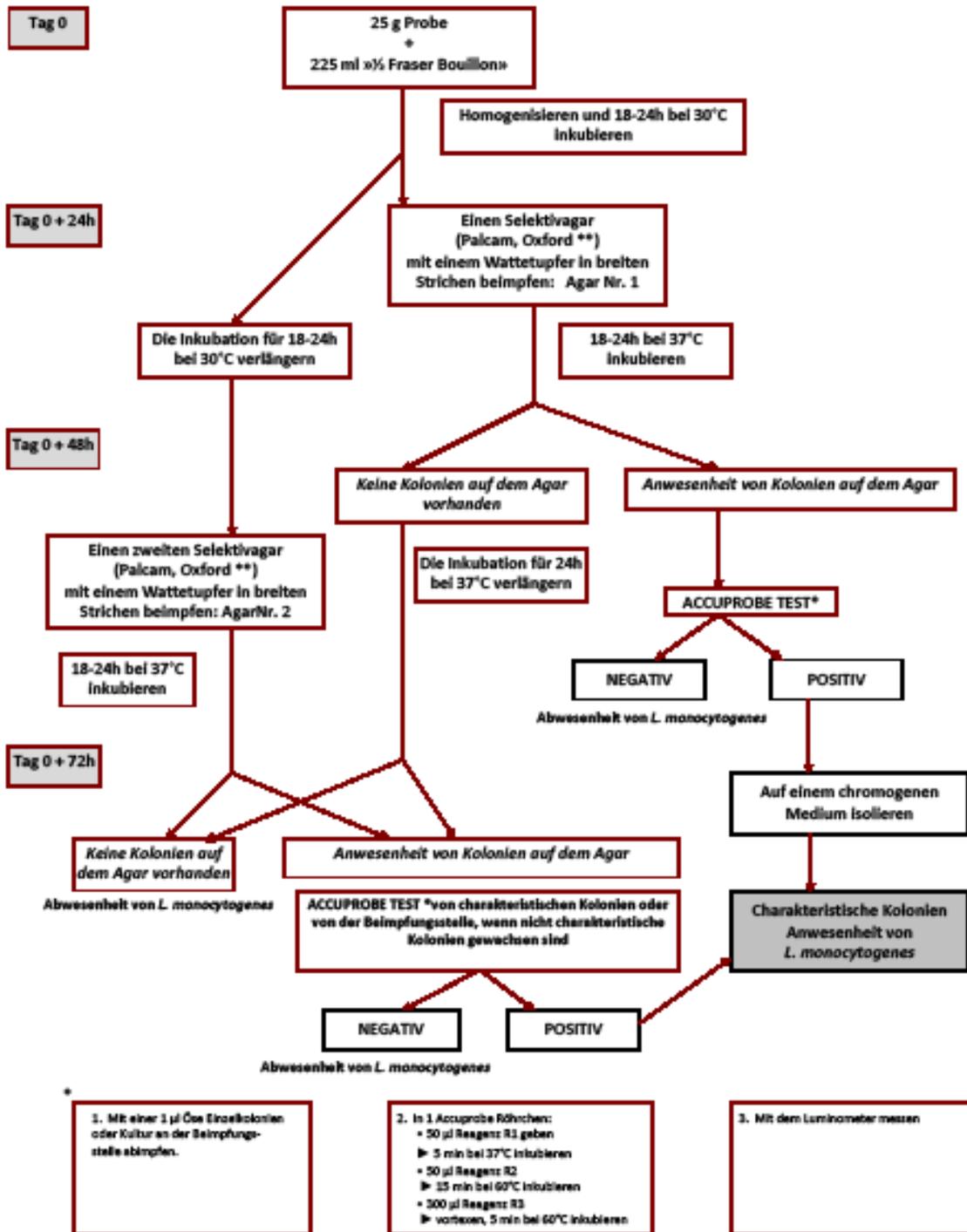
Die AccuProbe Listeria monocytogenes Methode wurde von der AFNOR Certification als alternative Untersuchungsmethode für Lebensmittel, die für den Verzehr durch Menschen bestimmt sind und für Umweltproben aus der Produktion validiert. Die Validierung erfolgte gemäß dem in der Norm EN ISO 16140 beschriebenen Protokoll und im Vergleich zur Referenzmethode, die in der EN ISO Norm 11290-1A1 beschrieben ist.

Das Zertifikat BIO 12/4-02/95 kann von unserem Wissenschaftlichen Kundendienst oder der AFNOR Certification angefordert werden. Das Ablaufdatum der Gültigkeit der NF VALIDATION ist auf dem Zertifikat angegeben.



BIO 12/4 – 02/95
ALTERNATIVE METHODEN FÜR DIE AGRARINDUSTRIE
zertifiziert von der AFAQ AFNOR Certification
www.afnor.org

ANHANG
VERFAHREN ZUM
« SCHNELLNACHWEIS VON LISTERIA MONOCYTOGENES »
AFNOR CERTIFICATION N° BIO 12/4-02/95



** Palcam: für alle Lebensmittel und Umweltproben, Oxford für Milchprodukte

LITERATUR

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, und Leader sind Marken und/oder eingetragene Marken von Hologic, Inc. und/oder seinen Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern.

Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erscheinen, gehören dem jeweiligen Eigentümer.

ALOA ist eine Handelsmarke von Biolife Italiana S.r.l.

CHROMAGAR ist eine Handelsmarke von Alain Rambach.

Dieses Produkt ist ggf. von mindestens einem US-Patent geschützt (siehe www.hologic.com/patents).

103051F-01-DE Rev. 003 2018-03
©1990 – 2018 Hologic, Inc. Alle Rechte vorbehalten.