

TEST DE IDENTIFICACION DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN CULTIVO

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

UTILIZACIÓN

El TEST ACCUPROBE de identificación de *Listeria monocytogenes* es un test rápido con sondas ADN que utiliza la técnica de hibridación de ácidos nucleicos para la identificación de *Listeria monocytogenes* aislada en cultivo.

Se ha propuesto igualmente un protocolo de detección, que ha sido certificado por AFNOR Certification con la referencia N° BIO 12/4-02/95 (ver párrafo CONTROL MICROBIOLOGICO párrafo C).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

Listeria monocytogenes es un microorganismo fundamentalmente presente en el suelo que se encuentra disperso en todo el entorno. Ha sido detectado en fuentes tales como agua, productos agrícolas y animales. Reconocido como un patógeno humano desde hace más de 50 años, *Listeria monocytogenes* ha sido identificada como el agente etiológico de la listeriosis, causando meningitis, encefalitis, septicemia, endocarditis, aborto, abscesos y lesiones purulentas locales en el hombre (2,4). Varios brotes importantes de listeriosis en la última década han sido relacionados con el consumo de alimentos contaminados. Las mujeres embarazadas, los recién nacidos, los pacientes inmunodeficientes y los adultos ancianos corren el mayor riesgo de contraer listeriosis (5).

Los actuales métodos de identificación se basan en métodos tradicionales fisiológicos y bioquímicos. Estos incluyen los métodos morfológicos con tinción de Gram, método de la catalasa, de motilidad, de beta-hemólisis en agar sangre y de fermentación de azúcares (8).

El Test AccuProbe *Listeria monocytogenes* es un método rápido y objetivo que permite la detección de secuencias de RNA ribosomal específico en 35 minutos después de preparar la muestra.

PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

La hibridación de ácidos nucleicos se basa en la capacidad de las cadenas complementarias de ácidos nucleicos para alinearse y asociarse específicamente formando complejos bicatenarios estables (6). El método AccuProbe utiliza una sonda ADN monocatenaria con un marcador quimioluminiscente complementario del ARN ribosómico del organismo diana. Después de la liberación del ARN ribosómico por el organismo diana, la sonda ADN marcada se combina con el ARN ribosómico del organismo diana para formar un híbrido estable ADN:ARN. El Reactivo de Selección permite diferenciar las sondas no hibridadas de las hibridadas. La señal luminosa emitida por los híbridos ADN:ARN es medida con un luminómetro Hologic. Un resultado es positivo cuando la lectura en el luminómetro es igual o superior a un valor límite. Valores por debajo de este valor límite son considerados resultados negativos.

REACTIVOS

Nota: Para obtener información sobre cualquier aviso de riesgo o precaución que pueda estar asociado a los reactivos, consulte la Biblioteca de hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet Library) en www.hologic.com/sds.

Los reactivos utilizados para el test AccuProbe *Listeria monocytogenes* son suministrados en tres kits diferentes de reactivos:

KIT ACCUPROBE PARA LISTERIA MONOCYTOGENES
(bioMérieux ref. 39500 / Hologic Cat. No. 102920)

Reactivo Sonda (P) (4 x 5 tubos)
Listeria monocytogenes.

KIT DE REACTIVOS ACCUPROBE PARA IDENTIFICACIÓN EN CULTIVO
(bioMérieux ref. 39305 / Hologic Cat. No. 102800)

Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) (1) 1 x 10 ml
Solución tamponada que contiene 0,04% de azida sódica.

Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) (2) 1 x 10 ml
Solución tamponada.

Reactivo 3 (Reactivo de Selección) (3) 1 x 60 ml
Solución tamponada.

KIT DE REACTIVOS DE DETECCIÓN Hologic
(bioMérieux ref. 39300 / Hologic Cat. No. 201791)

Reactivo de Detección I (RI) 1 x 240 ml
Peróxido de hidrógeno al 0,1% en ácido nítrico 0,001 N.

Reactivo de Detección II (RII) 1 x 240 ml
Hidróxido de sodio 1 N.

CONSEJOS DE UTILIZACIÓN

- A. Sólo para diagnóstico in vitro o utilización en microbiología industrial.
- B. Tomar las precauciones de seguridad habituales cuando se realiza este test (3).
- C. Utilizar sólo para la identificación de *Listeria monocytogenes* aislada en cultivo.
- D. Utilizar sólo el material suministrado o el material de laboratorio desechable especificado.
- E. Algunos reactivos utilizados en este test contienen azida sódica, que puede reaccionar con el plomo o cobre de los conductos formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Al desechar estos reactivos, diluir siempre el material con un volumen importante de agua para evitar la formación de azidas en los conductos.
- F. Evitar el contacto de los Reactivos de Detección I y II con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Lavar con agua si estos reactivos entran en contacto con la piel. Si se producen vertidos de estos reactivos, diluir con agua antes de secar.
- G. Para asegurar un funcionamiento óptimo de la técnica, recomendamos revisar los tubos para prevenir que los reactivos queden en suspensión. Si se dá el caso, asentar el contenido del tubo con golpes suaves sobre la superficie de la mesa para sedimentar los reactivos en el fondo del tubo.
- H. Deben seguirse las Buenas Prácticas de Laboratorio (p. ej. la norma ISO 7218) (12)

CONSERVACIÓN

Los Tubos de Reactivo Sonda se deben conservar en sus bolsas herméticas entre 2° y 8°C. Son estables en las bolsas cerradas hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abiertas, las bolsas deben mantenerse cerradas y selladas y los tubos deben utilizarse en los dos meses siguientes, y antes de la fecha de caducidad.

Otros reactivos utilizados en el TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES se pueden conservar entre 2° y 25°C y se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada.

NO CONGELAR LOS REACTIVOS

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El TEST ACCUPROBE *Listeria monocytogenes* ha sido diseñado para determinar la identidad de *Listeria monocytogenes* aislada en cultivo. La detección de *L.monocytogenes* en los alimentos se realiza después de una etapa de pre-enriquecimiento.

UTILIZACIÓN PARA DIAGNOSTICO CLÍNICO IN VITRO

A. **Método en medio de cultivo sólido.** Puede estudiarse el crecimiento aislado en un medio sólido apropiado, tal como agar con 5% de sangre de oveja, infusión de cerebro-corazón o bien agar chocolate. Además, también se acepta el crecimiento en medios selectivos tales como agar McBride y LPM (Remel). Las colonias pueden ser analizadas apenas sea visible el crecimiento, pero antes de que tengan 72 horas.

1. Las colonias pueden ser extraídas con un asa de plástico desechable de 1 µL, un asa metálica, una aguja de plástico desechable o un bastoncillo aplicador. No deben utilizarse torundas dado el escaso volumen de líquido en el cual serán a continuación suspendidas las células.
2. Si se estudia una sola colonia, debe tener por lo menos 1 mm de diámetro. Se puede analizar un asa con 1 µl de células, o bien varias (3 ó 4) colonias más pequeñas.
3. Evitar arrastrar medio sólido junto con las células.
4. En esta etapa, el analista puede decidir sembrar otra placa de cultivo para confirmar la pureza de la cepa.

B. **Método en caldo de cultivo.** Con el TEST ACCUPROBE *Listeria monocytogenes* puede analizarse el crecimiento en caldos de cultivo tales como el de tripcasa-soja, cerebro-corazón o el Caldo de Enriquecimiento para *Listeria*, con turbidez equivalente o superior al patron McFarland I del nefelómetro. Pipetear la muestra de 50 µl de una suspensión en caldo de cultivo bien homogenizada y transferir a los tubos de reactivo sonda, como se describe a continuación.

CONTROL MICROBIOLÓGICO

El procedimiento presentado en el párrafo C de esta sección ha sido certificado por AFNOR Certification.

A. **Método de identificación o detección en medio sólido.** Pueden analizarse colonias aisladas de un medio sólido adecuado (agar con 5% de sangre ovina, PALCAM, Oxford, McBride). Las muestras pueden analizarse apenas las colonias sean visibles, pero antes de que tengan 72 horas.

1. Las colonias pueden ser extraídas utilizando un asa de plástico desechable de 1 µl, un asa metálica, una pipeta Pasteur sellada o una aguja de plástico desechable. No deben utilizarse torundas dado el escaso volumen de líquido en el cual las células serán suspendidas a continuación.
2. Es posible analizar varias colonias pequeñas (3 ó 4) o una sola colonia de por lo menos 1 mm de diámetro (1 colonia contiene 10^{11} - 10^{12} bacterias), o bien extraer las colonias de la zona de crecimiento (asa de 1 µl).
3. Evitar arrastrar medio de cultivo sólido junto con las células.
4. Según el crecimiento, recolectar todas las colonias presentes o sólo aquellas de la zona de crecimiento.

5. En esta etapa, el analista puede decidir inocular otra placa de cultivo para confirmar la pureza de la cepa.

B. Método en caldo de cultivo. El test puede ser realizado directamente en un caldo de cultivo adecuado. Según los estudios realizados en una selección de medios (1, 7), sólo algunos caldos de cultivo pueden ser utilizados directamente. Caldos no selectivos, tales como el caldo de cerebro-corazón, de tripcasa-soja, el caldo de enriquecimiento para Listeria y el caldo Todd-Hewitt, permiten buenos resultados, mientras que algunos caldos más selectivos (L. PALCAMY, UVM, Fraser) reducen la sensibilidad del test conduciendo a falsos negativos. La incubación debe extenderse durante 48 horas a 30°C. **Si se utilizan caldos de cultivo de Fraser, UVM o L. PALCAMY, deben hacerse subcultivos en un medio sólido.**

Pipetear 50 µl de un caldo de cultivo bien homogenizado en el tubo de Reactivo Sonda, tal como se describe en el párrafo C de la sección PROCEDIMIENTO DEL TEST.

C. PROTOCOLO CERTIFICADO AFNOR CERTIFICATION N° BIO 12/4-02/95 (valido hasta el 07/02/2011) PARA TODOS LOS PRODUCTOS ALIMENTARIOS DE CONSUMO HUMANO Y MUESTRAS DE AMBIENTES DE PRODUCCIÓN.

D0 1. Homogeneizar X g de muestra en 9X ml de caldo Fraser semi después incubar durante 18-24 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

NB: En el contexto de la marca NF VALIDATION, no se analizaron muestras de ensayo de más de 25 g.

D0 + 24h 2. Después de incubar en el caldo de enriquecimiento, sembrar en un agar selectivo (Oxford para productos lácteos o PALCAM para todos los productos alimentarios de consumo humano y muestras de ambientes de producción) Sembrar la muestra en estría, utilizando un escobillon. Incubar 18-24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (medio selectivo N° 1).

3. La incubación del caldo Fraser semi se prolonga 18-24 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

D0 + 48h 4. Después de 18-24 horas de incubación a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ del medio N° 1, la detección de Listeria monocytogenes se hace a partir de colonias características desarrolladas en el medio selectivo, según el protocolo descrito en la parte A de este capítulo y el indicado en el capítulo «TECNICA». En ausencia de colonias características o una resultados negativo obtenido con AccuProbe :

o sobre la placa prolongar la incubación del medio N°1 durante 18-24H suplementarias a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

o inocular una nueva placa de agar selectivo (placa N°2) empleando el Caldo Fraser Semi incubado durante 48 h. Incubar el agar 24 horas a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$.

D0 + 72h 5. Después de 48 horas de incubación del medio N° 1 ó 24 horas de incubación del medio N° 2, proceder a la detección de Listeria monocytogenes según el protocolo descrito en la parte A de este capítulo y el indicado en el capítulo «TECNICA». En el caso de obtener ausencia de colonias características pero con presencia de colonias no características, realizar el test sembrando desde el paso de inoculación.

Confirmación de los resultados positivos: en el marco del protocolo certificado NF VALIDATION, todo resultado positivo obtenido por el método AccuProbe debe ser confirmado. La confirmación se realizará gracias a una de las tres opciones siguientes:

- por medio de las pruebas clásicas descritas en los métodos normalizados por el CEN, ISO o AFNOR, que incluye un paso de purificación en un agar nutritivo.
- por el uso de un medio cromogénico para Listeria como Ottaviani y Agosti descrito en la Norma

ISO 11290-1 o usando un medio cromogenico incluido en el método validado por AFNOR. Con la ayuda de un asa de 1µl, tomar en el punto de inoculación sobre la placa de agar selectivo que haya dado un resultado AccuProbe positivo y proceder a un aislamiento sobre un medio cromogénico. Incubar las placas en las condiciones de tiempo y temperatura indicadas en las fichas técnicas del fabricante. La presencia de colonias características aisladas confirma el resultado positivo del test AccuProbe. Los medios cromogénicos siguientes han sido testados durante el proceso de validación AFNOR de 2003 y 2007 : Compass L. Mono Agar (2003), Chromagar™ Listeria (2003), ALOA™ (2003) y Rapid' L. Mono (2003 y 2007) y OAA (2007).

- Usando otro método certificado por AFNOR Certification, basado en un principio diferente al método AccuProbe. El protocolo completo descrito para el método de validación debe ser aplicado.

En caso de resultados discordantes (positivo por AccuProbe, no confirmado por los tests descritos en los métodos normalizados por el CEN o ISO, o después de aislar sobre el medio cromogénico o por otro método certificado NF VALIDATION, el laboratorio es responsable de demostrar la validad del resultado descrito.

En el caso de utilizar un medio cromogénico, aconsejamos prolongar la incubación 24 H suplementarias o proceder a un segundo aislamiento eventualmente sobre un medio cromogénico diferente a partir del medio selectivo positivo (Palcam o OXFORD).

MATERIALES SUMINISTRADOS

**TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICACION DE Listeria monocytogenes EN CULTIVO
(bioMérieux ref. 39500 / Hologic Cat. No. 102920)**

20 Tests

Reactivo Sonda (P)

4 x 5 tubos

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Asas de plástico estériles de inoculación de 1 µl, asas metálicas, pipetas Pasteur selladas o agujas de plástico para recolección de colonias

Cepas de cultivo de control

Incubadora o baño maría (37° ± 1°C)

Baño maría o bloque calefactor * (60° ± 1°C)

Micropipetas (50 µl, 300 µl)

Pipetas de repetición (50 µl, 300 µl)

Mezclador Vortex

*El bloque calefactor del baño seco debe contar con pocillos de tamaño correcto para que se ajusten los tubos de 12 x 75 mm. Se recomienda el uso del bloque calefactor Hologic.

DISPONIBLE EN SU DISTRIBUIDOR HOLOGIC:

Luminómetro Hologic Leader 50i

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

Bloque Calefactor Hologic (60° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39406)

KIT DE REACTIVOS DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS ACCUPROBE

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

KIT DE REACTIVOS DE DETECCION HOLOGIC

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

PROCEDIMIENTO

A. PREPARACIÓN DEL EQUIPO

1. Ajustar la incubadora o el baño maría a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
2. Ajustar el baño maría o el bloque calefactor a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Preparar el luminómetro Hologic para su funcionamiento. Verificar que hay un volumen suficiente de Reactivos de Detección I y II para completar los tests.

B. CONTROLES

En cada laboratorio deben analizarse rutinariamente cepas de control positivo y negativo, según las regulaciones locales. Puede utilizarse un cultivo de *L. monocytogenes* (ATCC 35152) como control positivo, mientras que un cultivo de *L. grayi* (ATCC 19120) puede utilizarse como control negativo.

C. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA HIBRIDACIÓN

1. Abrir la bolsa cortando en forma simétrica la parte superior. Sacar un número suficiente de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras de cultivo y/o los controles. Volver a cerrar la bolsa plegando el extremo abierto varias veces y sellándolo con una cinta adhesiva o una pinza. **Dejar el desecante dentro de la bolsa.**
2. Colocar etiquetas en un número suficiente de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras de cultivo y/o los controles. Retirar y conservar los tapones.
3. Pipetear 50 μl de Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) en todos los tubos de Reactivo Sonda. **Si se quieren analizar muestras de caldos de cultivo, no añadir Reactivo 1 a los tubos de Reactivo Sonda.**
4. Transferir la colonia desde el medio de cultivo sólido, o 50 μl de un caldo de cultivo bien homogenizado, a los tubos de Reactivo Sonda etiquetados, como se describe en la sección PREPARACION DE LA MUESTRA. Si se analiza una colonia de un medio sólido, agitar el asa o la aguja en el Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) y homogeneizar bien.
5. Volver a tapar los tubos de Reactivo Sonda e incubar a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos en un baño maría, o 10 minutos en una incubadora.

D. HIBRIDACIÓN

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o incubadora. Retirar y conservar los tapones. Pipetear 50 μl de Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) en todos los tubos de Reactivo Sonda.
2. Volver a tapar los tubos de Reactivo Sonda e incubar durante 15 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un baño maría o bloque calefactor.

E. SELECCIÓN DE HIBRIDOS

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o bloque calefactor. Retirar y conservar los tapones. Pipetear 300 μl de Reactivo 3 (Reactivo de Selección) en cada tubo. Volver a tapar los tubos y mezclarlos al Vortex hasta su perfecta homogeneización.
2. Incubar los tubos de Reactivo Sonda durante por lo menos 5 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un baño maría o bloque calefactor.
3. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o bloque calefactor y dejarlos a temperatura ambiente durante por lo menos 5 minutos. Retirar y desechar los tapones. **Leer los resultados en el luminómetro en la hora después de sacarlos del baño maría o bloque calefactor.**

F. DETECCIÓN

1. Seleccionar el protocolo apropiado en el luminómetro, conforme a las recomendaciones del folleto incluido en el embalaje del aparato.
2. Utilizando una tela hœmeda o una toalla de papel, limpiar cada tubo hasta verificar que no quedan residuos en la parte externa del tubo. Insertar el tubo en el luminómetro y seguir las instrucciones.
3. Una vez terminado el análisis, retirar el o los tubos del luminómetro.

NOTAS SOBRE LA TÉCNICA

- A. REACTIVOS: El Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) puede precipitar. Al calentar y mezclar la solución a 35° - 60°C, se disolverá el precipitado.
- B. TEMPERATURA: Las reacciones de Hibridación y Selección son termodependientes. Por lo tanto, es imperativo que la incubadora, baño mar'a o bloque calefactor se mantenga dentro del rango de temperatura especificado.
- C. TIEMPO:
 1. La Reacción de Hibridación debe ser iniciada en la hora que sigue a la adición de las células y el Reactivo 1 a los tubos de Reactivo Sonda.
 2. Las reacciones de Hibridación y Selección son termodependientes. Hibridar durante por lo menos 15 minutos, pero no más de 20 minutos. Incubar los tubos de Reactivo Sonda en la Etapa de Selección durante por lo menos 5 minutos, pero no más de 6 minutos.
- D. BAÑO MARÍA: El nivel de agua en el baño maría debe mantenerse suficiente para garantizar que todo el volumen de líquido de reacción de los tubos de Reactivo Sonda se encuentre sumergido.
- E. VORTEX: Es crítico para alcanzar una mezcla homogénea en la Etapa de Selección y específicamente después de añadir el Reactivo 3.
- F. DETECCIÓN DE FALLOS

1. Valores elevados de control negativo (*L. grayi* ATCC 19120), superiores a 20.000 RLU (Relative Light Units) en el luminómetro Leader o 600 PLU (Photometric Light Units) en el luminómetro AccuLDR (antiguamente PAL) pueden deberse a una mezcla insuficiente después de añadir el Reactivo 3 (Reactivo de Selección) o a analizar cultivos mixtos. Dado que pueden producirse cultivos mixtos, se puede sembrar parte del cultivo en un agar apropiado para verificar la existencia de tipos de colonias distintas.
2. Valores bajos de control positivo (*L. monocytogenes* ATCC 35152), inferiores a 50.000 RLU en el luminómetro Leader o 1.500 PLU en el luminómetro AccuLDR, pueden ser causados por un número insuficiente de células o por analizar cultivos mixtos o envejecidos. Dado que pueden producirse cultivos mixtos, se puede sembrar parte del cultivo en un agar apropiado para verificar la existencia de tipos de colonias distintas.

RESULTADOS

A. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del TEST ACCUPROBE *Listeria monocytogenes* se basan en los siguientes valores límite. Las muestras que producen señales superiores o iguales a estos valores límite son consideradas positivas. Las señales inferiores a estos valores límite son consideradas negativas. Los resultados en el rango de incertidumbre deben ser analizados nuevamente. Si el segundo test vuelve a dar resultados inciertos, la cepa debe ser subcultivada para verificar su pureza.

	AccuLDR (antiguamente PAL)	Leader
Valor límite	1.500 PLU	50.000 RLU
Rango incertidumbre	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

Los controles negativos (p. ej., *L. grayi*, ATCC 19120) y los controles positivos (p. ej., *L. monocytogenes*, ATCC 35152) deben satisfacer los siguientes valores:

	AccuLDR (antiguamente PAL)	Leader
Control negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Control positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

Si los controles se encuentran fuera de los límites, los resultados del test no deben ser tomados en cuenta.

LÍMITES del TEST

Este método ha sido analizado utilizando colonias frescas en los medios de cultivo sólido y caldos de cultivo enumerados en la sección PREPARACION DE LA MUESTRA. El funcionamiento de esta técnica no ha sido evaluada cuando se realiza directamente a partir de muestras clínicas (líquido cefalorraquídeo o sangre, por ejemplo).

Los resultados del TEST ACCUPROBE *Listeria monocytogenes* se deben interpretar en función de otros análisis de laboratorio, y ser correlacionados con datos clínicos.

VALORES ESPERADOS

El TEST ACCUPROBE *Listeria monocytogenes* fue comparado con métodos de identificación bioquímica standard, utilizando 175 cepas de la especie *L. monocytogenes* y 102 cepas adicionales representantes de 21 géneros en 2 áreas clínicas. Una segunda evaluación fue realizada con 296 cepas aisladas en materias alimentarias que se sospechaban contaminadas. Las colonias fueron clasificadas como positivas (> 50.000 RLU) o como negativas (< 40.000 RLU). El rango de observaciones para los cultivos negativos fue de 520 a 27.990 RLU y para los cultivos positivos, de 77.088 a 1.283.789 RLU. Se presenta a continuación una comparación de estos resultados con métodos standard de cultivo:

ACCUPROBE / IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS						
AccuProbe	Pos	Pos	Neg	Neg	Sensibilidad	
Cultivo	Pos	Neg	Pos	Neg	Especificidad	
Área 1	175	0	0	102	100% / 100%	100%
Área 2	81	1	0	110	100% / 99,5%	99,7%
Total	256	1	0	212	100% / 99,7%	99,8%

Una colonia AccuProbe-positiva y cultivo-negativa del area 2 fue analizada nuevamente con el TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES y dio un resultado negativo.

FUNCIONAMIENTO

A. PRECISIÓN INTRÍNSECA DEL ENSAYO

La precisión interna del ensayo del TEST ACCUPROBE *Listeria monocytogenes* fue calculada ensayando tres concentraciones de ARN ribosómico aislado de *L. monocytogenes* utilizando 10 ejemplares en un solo ensayo.

Muestra	A	B	C
Número de ejemplares	10	10	10
Respuesta media (RLU)	132.370	72.720	41.074
Desviación estándar	9.981	3.126	3.837
Coeficiente de variación	7,5%	4,3%	9,3%

B. PRECISIÓN ENTRE ENSAYOS

La precisión entre ensayos fue calculada analizando las mismas tres concentraciones de ARN ribosómico de *L. monocytogenes* en una sola determinación en 12 ensayos consecutivos.

Muestra	A	B	C
Número de ejemplares	12	12	12
Respuesta media (RLU)	146.469	77.240	41.074
Desviación estándar	19.793	8.634	4.343
Coeficiente de variación	13,5%	11,2%	10,8%

C. ESPECIFICIDAD

Fue evaluado un total de 97 cepas ATCC utilizando el TEST ACCUPROBE PARA LA IDENTIFICACION DE *Listeria monocytogenes* EN CULTIVO. Estas muestras representaban en total 87 especies de 53 géneros. Fueron analizadas 15 cepas de 7 especies de *Listeria* (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*). Sólo las cepas de *L. monocytogenes* dieron resultados positivos.

D. TEST DE RECUPERACIÓN

Cinco diluciones en serie de *L. monocytogenes* (desde 0 a 30 millones de células por test) fueron analizadas en presencia de las siguientes especies seleccionadas y diferentes a la especie diana: *L. grayi*, *L. ivanovii*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Brochothryx thermophacta*. No se observaron interferencias ni reacciones cruzadas

E. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS:

Dentro del contexto de la marca NF VALIDATION, se obtuvieron los siguientes resultados durante el estudio preliminar:

- Inclusividad/Exclusividad:** las 50 cepas de *Listeria monocytogenes* testadas fueron detectadas. El estudio de 18 cepas de *Listeria* (no *monocytogenes*) y 12 no pertenecientes al género *Listeria* no mostraron ninguna reacción cruzada.
- Nivel relativo de detección:** el metodo AccuProbe y el metodo de referencia ISO 11290-1 tienen el mismo límite de detección del 50%: entre 0.3 y 5.2 UFC/25g.
- Estudio comparativo:** 346 muestras fueron analizadas simultáneamente usando el método AccuProbe (agar PALCAM) y el metodo EN ISO 11290-1. Se obtuvieron los siguientes resultados:
 - Falsos negativos con el metodo AccuProbe: 3
 - Resultados positivos adicionales con el metodo AccuProbe: 8
 - Resultados concordantes: 335

El método AccuProbe Listeria monocytogenes ha sido certificado por AFNOR Certification como un método alternativo de análisis de productos alimentarios de consumo humano y muestras de ambientes de producción. Esta validación fue obtenida por comparación con el método de referencia descrito en la Norma EN ISO 11290-1A1 y según la norma EN ISO 16140.

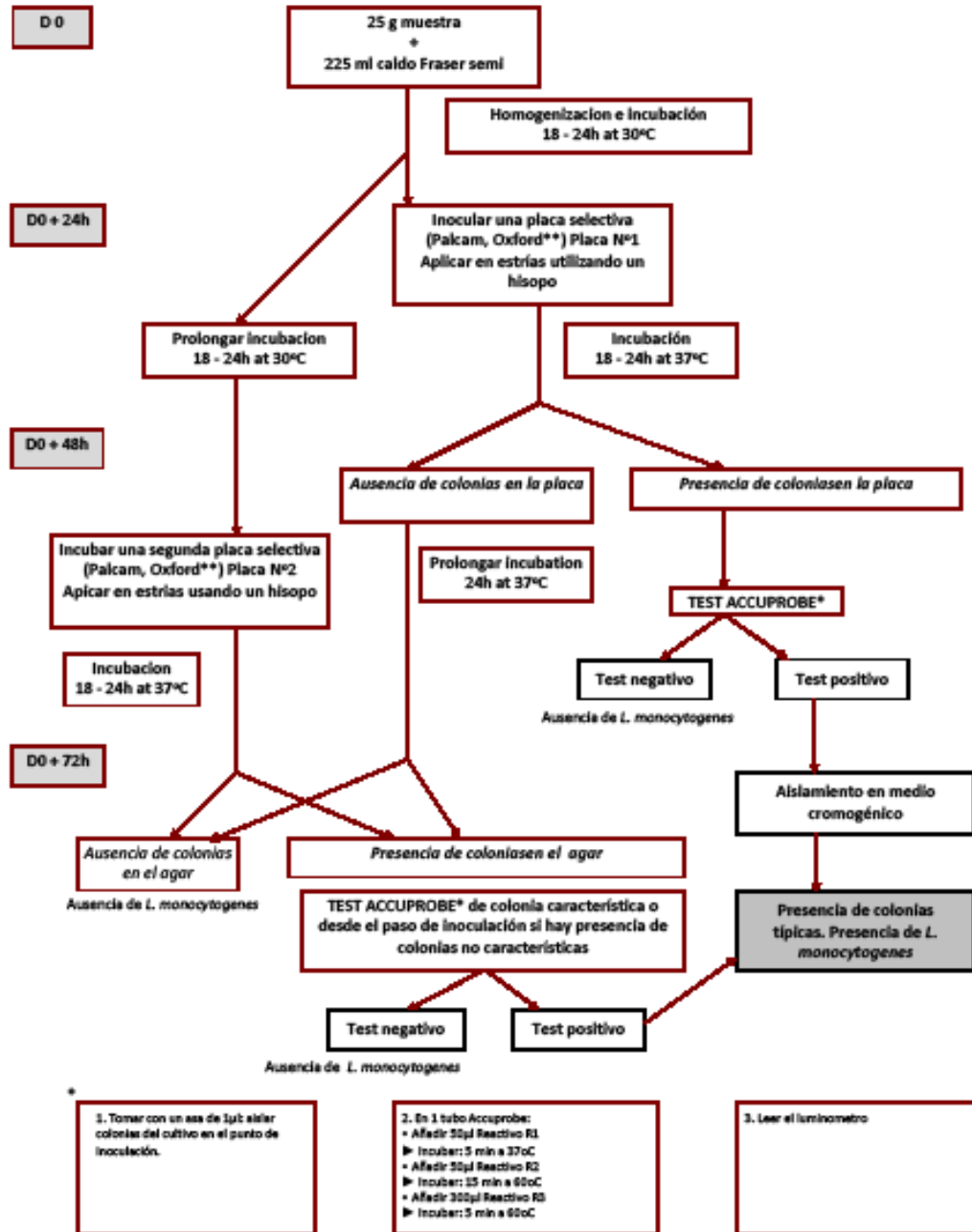
La validación BIO 12/4-02/95 puede solicitarse a nuestro Departamento de Asistencia Técnica o a AFNOR Certification. La fecha de caducidad de la certificación AFNOR VALIDATION está indicada en el certificado.



**BIO 12/4 - 02/95
METODOS ALTERNATIVOS DE ANALISIS PARA LA INDUSTRIA
AGROALIMENTARIA
Certificado por AFAQ AFNOR Certification
www.afnor.org**

APÉNDICE
PROCEDIMIENTO PARA EL
« MÉTODO RÁPIDO DE DETECCIÓN LISTERIA MONOCYTOGENES »
AFNOR* CERTIFICATION N° BIO 12/4-02/95

*AFNOR: Asociación Francesa de estandarización



** Palcam : para muestras de todos los productos alimentarios y de ambiente, Oxford : para productos lácteos.

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 - MŽthode horizontale pour la recherche et le dŽnombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1: mŽthode 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, y Leader son marcas comerciales y/o marcas comerciales registradas de Hologic, Inc. y/o de sus subsidiarias en los Estados Unidos y/o en otros paġses.

Todas las demġs marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a de sus respectivos propietarios.

ALOA es una marca comercial de Biolife Italiana S.r.l.

CHROMAGAR es una marca comercial de Alain Rambach.

Este producto puede estar cubierto por una o mġs de las patentes estadounidenses identificadas en www.hologic.com/patents.

103051F-01-ES Rev. 003 2018-03

©1990 – 2018 Hologic, Inc. Reservados todos los derechos.