

LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST

(bioMérieux ref. 39500 / Hologic kat. č. 102920)

POUŽITÍ

ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST je rychlý test s testovací DNA sondou k identifikaci *Listeria monocytogenes* izolované z kultury technikou hybridizace nukleové kyseliny.

Doporučuje se také detekční metoda, která je certifikována společností AFNOR Certification pod referenčním číslem BIO 12/4-02/95 (viz oddíl MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA, odst. C).

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ TESTU

Listeria monocytogenes je primárně půdní mikroorganismus, který je rozptýlený v prostředí. Nachází se ve vodě, zemědělských produktech a také se vyskytuje u živočichů. Jako lidský patogen je *Listeria monocytogenes* známá více než 50 let, je identifikována jako etiologické agens listeriózy a u lidí způsobuje meningitidu, encefalitidu, septikémii, endokarditidu, potraty, abscesy a místní purulentní léze (2,4). Několik významných epidemií listeriózy v minulém desetiletí souviselo s konzumací kontaminované potravy. Mezi skupiny nejvíce ohrožené listeriózou patří těhotné ženy, novorozenci, imunokomprimovaní a staří pacienti (5).

Současné metody identifikace *Listeria monocytogenes* spočívají v tradičních fyziologických a biochemických metodách. Ty zahrnují morfologii podle Gramova barvení, katalázovou reakci, hodnocení motility, betahemolytickou aktivitu na plotnách s krevním agarem a fermentaci cukrů (8). ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST nabízí rychlou a objektivní metodu identifikace *Listeria monocytogenes* založenou na detekci specifických sekvencí ribosomální RNA během 35 minut od přípravy vzorku.

PRINCIPY TESTU

Testy založené na hybridizaci nukleové kyseliny spočívají ve schopnosti komplementárních řetězců nukleové kyseliny vytvářet specifickou vazbu za vzniku stabilních dvouřetězcových komplexů (6). Systém AccuProbe využívá jednořetězcovou DNA sondu s chemiluminiscenční značkou, která je komplementární k ribozomální RNA cílového organismu. Po uvolnění ribozomální RNA z organismu se značené DNA sondy spojí s ribozomální RNA cílového organismu za vzniku stabilního hybridu DNA:RNA. Selektivní činidlo (Selection Reagent) umožňuje diferenciaci nehybridizované a hybridizované sondy. Značené hybridy DNA:RNA se měří v luminometru Leader. Pozitivním výsledkem je odečet z luminometru rovný nebo vyšší než mezní hodnota. Hodnota nižší než tato mezní hodnota je negativním výsledkem.

ČINIDLA

Poznámka: Informace o H-větvách a P-větvách, které mohou být spojeny s reagensy, naleznete v knihovně bezpečnostních listů (Safety Data Sheet Library) na adrese www.hologic.com/sds.

Činidla ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST jsou poskytnuta ve třech oddělených kitech činidel:

ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES KIT
(bioMérieux ref. 39500 / Hologic kat. č. 102920)

Probe Reagent (P) (4 x 5 zkumavek)
Listeria monocytogenes.

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT
(bioMérieux ref. 39305 / Hologic kat. č. 102800)

Reagent 1 (lytické činidlo) (1) 1 x 10 ml
Pufrovaný roztok obsahující 0,04 % azidu sodného.

Reagent 2 (hybridizační pufr) (2) 1 x 10 ml
Pufrovaný roztok.

Reagent 3 (selekční činidlo) (3) 1 x 60 ml
Pufrovaný roztok.

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT
(bioMérieux ref. 39300 / Hologic kat. č. 201791)

Detection Reagent I (RI) 1 x 240 ml
0,1% peroxid vodíku v 0,001N kyselině dusičné.

Detection Reagent II (RII) 1 x 240 ml
1N hydroxid sodný.

VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

- A. Pro diagnostické použití *in vitro* nebo pro průmyslovou mikrobiologii.
- B. Při provádění tohoto stanovení dodržujte obvyklá bezpečnostní opatření (3).
- C. Používejte pouze k určení *Listeria monocytogenes* izolované z kultur.
- D. Používejte pouze dodané nebo specifikované laboratorní vybavení na jedno použití.
- E. Činidla tohoto kitu obsahují azid sodný, který může reagovat s olověným nebo měděným potrubím za vytvoření potenciálně explozivních azidů kovů. Při likvidaci tohoto činidla jej vždy naředte velkým množstvím vody, aby se zabránilo hromadění azidu v potrubí.
- F. Zamezte kontaktu Detection Reagent I a Detection Reagent II s kůží, očima a sliznicemi. Pokud došlo ke styku těchto činidel s kůží, opláchněte ji vodou. Pokud dojde k rozlití těchto činidel, naředte je před vytřením vodou.
- G. Pro dosažení optimálních výsledků se doporučuje před testováním zkontrolovat zkumavky na přítomnost uvolněného materiálu. Pokud je ve zkumavce uvolněný materiál, zkumavkou lehce poklepte, aby se uvolněný materiál usadil na dně zkumavky.
- H. Vyhovuje požadavkům Správné laboratorní praxe (např. standard ISO 7218) (12).

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ PŘÍPRAVKU

Zkumavky se sondou je třeba uchovávat ve fóliových pouzdrech při teplotě 2 až 8 °C. Zkumavky se sondou jsou v uzavřených pouzdrech stabilní do vyznačeného data expirace. Po otevření se pouzdra musí uzavírat, přičemž zkumavky se musí použít do 2 měsíců a před datem expirace. Ostatní činidla ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST lze uchovávat při teplotě od 2 do 25 °C, přičemž jsou stabilní do vyznačeného data expirace.

ČINIDLA NEMRAZTE.

PŘÍPRAVA VZORKU

ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST je určen k identifikaci *Listeria monocytogenes* izolované z kultury. Detekce *Listeria monocytogenes* z potravin se provádí po předchozím pomnožení.

DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ IN VITRO

A. **Metoda kultivace na tuhých půdách.**

Lze testovat kolonie izolované z vhodných tuhých médií, jako je 5% ovčí krev, mozkosrdcová infuze nebo čokoládový agar. Kromě toho lze testovat kolonie izolované ze selektivních médií jako je McBride agar nebo LPM agar. Kolonie lze testovat, jakmile je růst pozorovatelný, nicméně nesmějí být starší než 72 hodin.

1. Kolonie lze nabrat jednorázovou plastovou kličkou, drátěnou kličkou, jednorázovou plastovou jehlou nebo aplikační tyčinkou o objemu 1 µl. Tampony by se neměly používat kvůli malému objemu tekutiny, ve které se buňky následně resuspendují.
2. Jestliže se má testovat jediná kolonie, musí mít průměr alespoň 1 mm. Lze testovat kličku buněk o objemu 1 µl nebo několik (3 až 4) menších kolonií.
3. Zamezte tomu, aby se s buňkami nabralo tuhé médium.
4. Pracovník může zároveň inokulovat další kultivační plotnu k potvrzení čistoty izolátu.

B. **Metoda kultivace v bujónu.** Touto sondou ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST lze testovat růst v bujónech, jako je trypticase soy bujón, mozkosrdcová infuze nebo bujón k pomnožení listerií se základem rovným nebo větším než 1 McFarland na nefelometrickém standardu.

Z dobře promíchané suspenze bujónu napipetujte 50µl vzorku do zkumavek se sondou podle níže uvedeného popisu.

MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA

Postup uvedený v odstavci C této části je certifikován společností AFNOR Certification

A. **Metoda kultivace na tuhých půdách pro identifikaci nebo detekci.**

Lze testovat kolonie izolované z vhodných tuhých médií (5% ovčí krev, agary PALCAM, Oxford nebo McBride). Kolonie lze testovat, jakmile je růst pozorovatelný, nicméně nesmějí být starší než 72 hodin.

1. Kolonie lze nabrat jednorázovou plastovou kličkou, drátěnou kličkou, jednorázovou plastovou jehlou nebo aplikační tyčinkou o objemu 1 µl. Tampony by se neměly používat kvůli malému objemu tekutiny, ve které se buňky následně resuspendují.
2. Lze testovat několik (3 až 4) menších kolonií nebo jedinou kolonii, která musí mít průměr alespoň 1 mm (1 kolonie obsahuje 10^{11} až 10^{12} bakterií), nebo přeneste kolonii v místě inokulace (kličkou buněk o objemu 1 µl).
3. Zamezte tomu, aby se s buňkami nabralo tuhé médium.
4. Podle velikosti kolonií přeneste buď všechny přítomné kolonie nebo kolonie v inokulované zóně.
5. Pracovník může zároveň inokulovat další kultivační plotnu k potvrzení čistoty izolátu.

B. **Metoda kultivace v bujónu.** Tento test lze provést přímo ve vhodném kultivačním bujónu. Podle studií provedených na souboru médií (1, 7) lze použít přímo jen některé bujóny. Dobrých výsledků se dosahuje s neselektivními médii jako jsou mozkosrdcová infuze, trypticase soy bujón, bujón

k pomnožení listerií nebo Todd Hewittův bujón, zatímco některé selektivnější bujóny (L. PALCAMY, UVM, Fraser) snižují citlivost testu, což vede k falešně negativním výsledkům. Inkubaci je třeba prodloužit na dobu 48 hodin při teplotě 30° C. **Při použití bujónů Fraser, UVM nebo L. PALCAMY je nutná subkultivace na tuhém médiu.**

Z dobře promíchané suspenze bujónu napipetujte 50µl vzorku do zkumavek se sondou podle popisu uvedeného v odstavci C části POSTUP TESTU.

C. POSTUP CERTIFIKOVANÝ SPOLEČNOSTÍ AFNOR CERTIFICATION No BIO 12/4-02/95 (platnost do 7. února 2011) PRO VŠECHNY POTRAVINOVÉ PRODUKTY URČENÉ K LIDSKÉ SPOTŘEBĚ A VZORKY VÝROBNÍHO PROSTŘEDÍ.

- DO 1. Promíchejte X g vzorku v 9X ml bujónu Half Fraser a inkubujte při teplotě 30°C ± 1°C po dobu 18 až 24 hodin.
Pozn.: V rámci postupů pro udělení známky NF Validation nebyly testovány vzorky s hmotností větší než 25 g.
- DO + 24 hodin 2. Po inkubaci pomnožovacího bujónu subkultivujte na selektivním agaru (agar Oxford pro mléčné výrobky nebo agar PALCAM pro všechny vzorky potravin určených k lidské spotřebě a vzorky výrobního prostředí). Vzorek naočkejte v širokých pruzích pomocí tampónu. Inkubujte při teplotě 37 ± 1°C po dobu 18 až 24 hodin (selektivní plotna č. 1).
3. Inkubace v bujónu Half Fraser se provádí při teplotě 30 ± 1°C po dobu 18 až 24 hodin.
- DO + 48 hodin 4. Po inkubaci selektivní plotny č. 1 při teplotě 37 ± 1 oC po dobu 18 až 24 hodin se detekce *Listeria monocytogenes* provádí na typických koloniích ze selektivního agaru podle metody kultivace na tuhých půdách popsané v odstavci A této části a podle postupů popsaných v části POSTUP TESTU. V případě nepřítomnosti typických kolonií na plotně nebo v případě negativního výsledku testu AccuProbe

- pokračujte v inkubaci selektivní plotny č. 1 při teplotě 37 ± 1°C po dobu dalších 18 až 24 hodin.

inokulujte nový selektivní agar (plotna č. 2) a použijte přitom bujón Half Fraser inkubovaný po dobu 48 hodin. Inkubujte agar při teplotě 37 ± 1°C po dobu 24 hodin.
- DO + 72 hodin 5. Po inkubaci selektivní plotny č. 1 po dobu 48 hodin nebo po inkubaci selektivní plotny č. 2 po dobu 24 hodin se *Listeria monocytogenes* detekuje podle protokolu popsaného v části Mikrobiologická kontrola, odstavec A. V případě nepřítomnosti typických kolonií, ale při současné přítomnosti atypických kolonií proveďte test odebráním vzorku z místa inokulace.

Potvrzení pozitivních výsledků: Podle certifikovaného protokolu s udělenou značkou NF Validation se musí potvrdit všechny pozitivní výsledky získané metodou AccuProbe. K potvrzení je třeba použít jednu z následujících tří možností:

- Podle klasických referenčních metod popsaných v CEN, ISO nebo AFNOR, které zahrnují krok purifikace na nutričním agaru.
- Pomocí chromogenního média, jako je *Listeria* podle agaru Ottaviani a Agosti, dle uvedení v normě ISO 11290-1 nebo pomocí chromogenního média, které je obsaženo v metodě validované AFNOR. Pomocí kličky o objemu 1 µl odeberte vzorek z místa inokulace na selektivní plotně, kde se metodou AccuProbe vyskytl pozitivní výsledek a izolujte na chromogenní médium. Inkubujte plotnu při teplotě a po dobu určenou výrobcem. Přítomnost charakteristických izolovaných kolonií

potvrzuje výsledek získaný metodou AccuProbe. Při validaci AFNOR v roce 2003 a 2007 byla použita tato chromogenní média: Compass L. mono Agar (2003), Chromagar Listeria (2003), ALOA (2003), Rapid L. Mono (2003 a 2007) a OAA (2007).

- Podle jakékoli metody certifikované společností AFNOR, která je založena na jiném principu než metoda AccuProbe. Je nutno postupovat podle protokolu popsaného v dané validované metodě.

V případě rozporných výsledků - pozitivních metodou AccuProbe, které nejsou potvrzeny klasickými referenčními metodami popsanými v CEN nebo ISO nebo po izolaci na chromogenním médiu nebo porovnáním s jinou certifikovanou metodou se značkou NF VALIDATION je laboratoř odpovědná za prokázání správnosti výsledků.

Pokud se použije chromogenní médium, doporučuje se pokračovat v inkubaci po dobu dalších 24 hodin nebo inokulovat jiné chromogenní médium, než bylo použito na pozitivní selektivní plotně (Palcam nebo Oxford).

POSKYTNUTÉ MATERIÁLY

ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST

(bioMérieux ref. 39500 / Hologic kat. č. 102920)

20 testů

Probe Reagent (P) 4 x 5 zkumavek

POTŘEBNÉ ALE NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

Sterilní plastové inokulační klíčky, drátěné klíčky, plastové jehly nebo aplikační tyčinky o objemu 1 µl k výběru kolonií.

Kontrolní kultivační kmeny

Inkubátor nebo vodní lázeň (37° ± 1° C)

Vodní lázeň nebo zahřívací blok (60 ± 1° C)

Mikropipety (50 µl, 300 µl)

Repipetory (50 µl, 300 µl)

Vortexové mísidlo

*Zahřívací bloky v horkovzdušné lázni by měly mít jamky se správnými rozměry pro zkumavky 12 x 75 mm. Doporučuje se použití horkovzdušné lázně Hologic.

MATERIÁLY DOSTUPNÉ U DISTRIBUTORA FIRMY HOLOGIC

Hologic Leader 50i Luminometer

(bioMérieux ref. 39400 / Hologic kat. č. 103100i)

Hologic Heating Block (60 ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39406)

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

(bioMérieux ref. 39305 / Hologic kat. č. 102800)

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT

(bioMérieux ref. 39300 / Hologic kat. č. 201791)

POSTUP TESTU

A. PŘÍPRAVA VYBAVENÍ

1. Inkubátor nebo vodní lázeň nastavte na teplotu 37° ± 1° C.
2. Zahřívací blok nebo vodní lázeň nastavte na teplotu 60 ± 1° C.
3. Připravte luminometr Hologic k provozu. Přesvědčte se, že máte dostatečný objem činidel Detection Reagent I a Detection Reagent II k dokončení testu.

B. KONTROLY

V každé laboratoři se musí v souladu s místními předpisy rutinně testovat kontrolní pozitivní a negativní kmeny. Jako pozitivní kontrolu lze použít kulturu *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152), zatímco jako negativní kontrolu lze použít kulturu *L.grayi* (ATCC 19120).

C. PŘÍPRAVA VZORKU

1. Otevřete fóliové pouzdro tak, že rovnoměrně rozstříhnete jeho vrchní stranu. Vyjměte zkumavky se sondou (Probe Reagent Tubes) v počtu postačujícím k testování kultivačních izolátů a/nebo kontrol. Pouzdro uzavřete tak, že několikrát přeložíte otevřený konec a zajistíte jej lepicí páskou nebo svorkou. **Sáček s desikantem nechejte uvnitř pouzdra.**
2. Zkumavky se sondou (Probe Reagent Tubes) v počtu postačujícím k testování kultivačních izolátů a/nebo kontrol označte. Sejměte a uložte uzávěry zkumavek.
3. Do všech zkumavek se sondou napipetujte 50 µl Reagent 1 (lytické činidlo). **Jestliže se mají testovat bujónové kultury, Reagent 1 do zkumavky se sondou nepřidávejte.**
4. Vzorky z tuhých médií nebo 50 µl dobře promísené bujónové kultury přeneste do označených zkumavek se sondou podle popisu v oddílu PŘÍPRAVA VZORKU. Kličkou, jehlou nebo tyčinkou otáčejte v Reagent 1 (lytické činidlo), aby se buňky, pokud se testují z tuhých médií, uvolnily.
5. Zkumavky se sondou (Probe Reagent Tubes) uzavřete a inkubujte při teplotě $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ po dobu 5 minut ve vodní lázni nebo po dobu 10 minut v inkubátoru.

D. HYBRIDIZACE

1. Zkumavky se sondou vyjměte z vodní lázně nebo inkubátoru. Sejměte a uložte uzávěry zkumavek. Do všech zkumavek se sondou napipetujte 50 µl Reagent 2 (hybridizační pufr).
2. Zkumavky se sondou (Probe Reagent Tubes) uzavřete a 15 minut inkubujte při teplotě $60 \pm 1^{\circ} \text{C}$ ve vodní lázni nebo v zahřívacím bloku.

E. SELEKCE

1. Zkumavky se sondou vyjměte z vodní lázně nebo zahřívacího bloku. Sejměte a uložte uzávěry zkumavek. Do každé zkumavky napipetujte 300 µl Reagent 3 (selekční činidlo). Zkumavky uzavřete a VORTEXUJTE, aby se jejich obsah zcela promísil.
2. Zkumavky se sondou 5 minut inkubujte při teplotě $60 \pm 1^{\circ} \text{C}$ ve vodní lázni nebo v zahřívacím bloku.
3. Zkumavky se sondou vyjměte z vodní lázně nebo zahřívacího bloku a nechte je alespoň 5 minut stát při teplotě místnosti. Sejměte a zlikvidujte uzávěry zkumavek. **Do jedné hodiny po vyjmutí zkumavek z vodní lázně nebo zahřívacího bloku v luminometru odečtěte výsledky.**

F. DETEKCE

1. V menu softwaru luminometru zvolte příhodný protokol podle pokynů v příbalovém letáku přístroje.
2. Navlhčenou buničinou nebo papírovým ručníkem každou zkumavku otřete, aby se zajistilo, že na vnější straně zkumavky nezůstane žádné reziduum a zkumavku vložte do luminometru podle pokynů přístroje.
3. Po dokončení analýzy zkumavku (zkumavky) z luminometru vyjměte.

POZNÁMKY K POSTUPU

- A. ČINIDLA: Reagent 2 (hybridizační pufr) se může vysrážet. Zahřátím a promísením roztoku při teplotě 35 až 60°C se sraženina rozpustí.
- B. TEPLOTA: hybridizační a selekční reakce jsou závislé na teplotě. Je tudíž nezbytné, aby vodní lázeň nebo zahřívací blok byly udržovány v daném teplotním rozmezí.
- C. ČAS:
 1. Hybridizační reakci je nutno zahájit do 1 hodiny od přidání buněk a Reagentu 1 do zkumavek se sondou.

2. Hybridizační a selekční reakce jsou závislé na čase. Hybridizujte alespoň 15, ale ne více než 20 minut. Zkumavky se sondou inkubujte během selekčního kroku alespoň 5, ale ne více než 6 minut.
- D. VODNÍ LÁZEŇ: hladina vody ve vodní lázni se musí udržovat taková, aby se zajistilo, že celý reakční objem ve zkumavkách se sondou bude ponořen.
- E. VORTEXOVÁNÍ: je nezbytně nutné mít během selekčního kroku homogenní směs, zejména po přidání Reagent 3.
- F. ŘEŠENÍ PROBLÉMU:
1. Zvýšené hodnoty negativních kontrol (*L.grayi* ATCC 19120), vyšší než 20 000 RLU (Relative Light Units) v luminometru Leader nebo 600 PLU (Photometric Light Units) v luminometru AccuLDR (dříve PAL) mohou být zapříčiněny nedostatečným promísením po přidání Reagent 3 (selekční činidlo) nebo testováním smíšených kultur. Protože ke kontaminaci kultur může dojít, část kultury se může inokulovat na příhodné agarové médium a inkubovat s cílem zkontrolovat případný výskyt vícerých typů kolonií.
 2. Nízké hodnoty pozitivních kontrol (*Listeria monocytogenes* ATCC 35152), nižší než 50 000 RLU v luminometru Leader nebo 1 500 PLU v luminometru AccuLDR (dříve PAL) mohou být zapříčiněny nedostatečnými počty nebo testováním smíšených kultur. Protože k výskytu kontaminovaných kultur může dojít, část kultury se může nanést na příhodné agarové médium a inkubovat s cílem zkontrolovat případný výskyt vícerých typů kolonií.

VÝSLEDKY

A. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky získané pomocí ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST jsou založeny na následujících mezních hodnotách. Vzorokly vytvářející signály rovné nebo vyšší než tyto mezní hodnoty se považují za pozitivní. Signály nižší než tyto mezní hodnoty se považují za negativní. Výsledky v „rozmezích pro opakování“ se musejí opakovat.

	<i>AccuLDR</i> (dříve PAL)	<i>Leader</i>
Mezní hodnota	1 500 PLU	50 000 RLU
Rozmezí pro opakování	1 200 až 1. 499 PLU	40 000 až 49. 999 RLU

B. KONTROLA KVALITY A PŘIJATELNOST VÝSLEDKŮ

Negativní kontrola (např. *L.grayi* ATCC 19120) a pozitivní kontrola (např. *Listeria monocytogenes* ATCC 35152) musí spadat do následujících hodnot:

	<i>AccuLDR</i> (dříve PAL)	<i>Leader</i>
Negativní kontrola	< 600 PLU	< 20 000 RLU
Pozitivní kontrola	>1 500 PLU	> 50 000 RLU

Pokud jsou hodnoty kontrol mimo toto rozmezí, výsledky nelze brát v úvahu.

OMEZENÍ

Tato metoda byla testována pomocí čerstvých kultur na tuhých půdách a pomocí bujónových kultur uvedených v oddíle PŘÍPRAVA VZORKU. Účinnost tohoto testu nebyla prokázána na přímých klinických vzorcích (např. vzorcích z mozkomíšního moku nebo krve).

Výsledky získané pomocí ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST se musí interpretovat v souvislosti s dalšími laboratorními a klinickými daty, které jsou klinikovi k dispozici.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Stanovení ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST bylo porovnáno na 2 klinických pracovištích s využitím 175 izolátů *Listeria monocytogenes* a 102 dalších izolátů představujících 21 rodů se standardními kultivačními a biochemicko identifikačními metodami. Druhé hodnocení bylo provedeno s využitím 296 kmenů izolovaných z materiálů z potravin, u kterých bylo podezření na kontaminaci. Izoláty se určily buď jako pozitivní (> 50 000 RLU) nebo negativní (< 40 000 RLU). Rozmezí pozorování u negativních kultur bylo 520 až 27 990 RLU a 77 088 až 1 283 789 RLU u pozitivních kultur. Porovnání těchto výsledků se standardními kultivačními metodami je uvedeno dále.

ACCUPROBE / KULTIVAČNÍ IDENTIFIKACE

AccuProbe	Poz	Poz	Neg	Neg	Citlivost/ specificita
Kultivace % Shody	Poz	Neg	Poz	Neg	
Pracoviště 1 100%	175	0	0	102	100% / 100 %
Pracoviště 2 99.7%	81	1	0	110	100% / 99,5 %
Celkem 99.8%	256	1	0	212	100% / 99,7 %

Jeden izolát pozitivní pomocí AccuProbe a kultivačně negativní z pracoviště 2 byl retestován pomocí ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST a přitom byl negativní.

CHARAKTERISTIKY STANOVENÍ

A. PŘESNOST UVNITŘ BĚHU

Přesnost uvnitř běhu přípravku ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST byla vypočítána stanovením tří koncentrací ribozomální RNA izolované z *Listeria monocytogenes* pomocí 10 replikátů v jediném stanovení.

Vzorek	A	B	C
Počet replikátů	10	10	10
Střední hodnota odpovědi (RLU)	132 370	72 720	41074
Standardní odchylka	9 981	3 126	3 837
Koeficient variability	7,5 %	4,3 %	9,3 %

B. PŘESNOST MEZI BĚHY

Přesnost mezi běhy byla vypočítána stanovením stejných tří koncentrací ribozomální RNA *Listeria monocytogenes* pomocí jediného stanovení ve 12 po sobě jdoucích bězích.

Vzorek	A	B	C
Počet replikátů	12	12	12
Střední hodnota odpovědi	146 469	77 240	41 074
Standardní odchylka	19 793	8 634	4 343
Koeficient variability	13,5 %	11,2 %	10,8 %

C. SPECIFICITA

Pomocí ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES CULTURE IDENTIFICATION TEST bylo vyhodnoceno 97 kmenů ATCC. Tyto izoláty představovaly celkem 87 druhů z 53 rodů. Bylo testováno 15 izolátů 7 druhů *Listeria* (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*). Pouze *L. monocytogenes* navodily v testu pozitivní výsledky.

D. VÝTĚŽNOST

Listeria monocytogenes byla hodnocena v pěti kaskádovitých ředěních (v koncentraci 0 až 30 miliónů buněk na test) v přítomnosti 30 miliónů buněk těchto druhů *L. grayi*, *L. ivanovii*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Brochothryx thermophacta*. Nebyla pozorována žádná interference ani zkřížená reakce.

E. SPECIFICKÉ CHARAKTERISTIKY STANOVENÍ

V rámci posuzování pro udělení značky NF VALIDATION byly během předběžné studie získány tyto výsledky:

- Inkluzivita/exkluzivita: všech 50 testovaných kmenů *Listeria monocytogenes* bylo detekováno. Ve studii 18 kmenů *Listeria* (nepatřících k *monocytogenes*) a 12 kmenů nepatřících k rodu *Listeria* nebyla pozorována žádná zkřížená reakce.
- Relativní detekční úroveň: metoda AccuProbe a referenční metoda ISO 11290-1 mají týž 50% detekční limit: 0,3 až 5,2 CFU/25g.
- Srovnávací studie: 346 vzorků bylo testováno současně pomocí metody AccuProbe (agar Palcam) a metody EN ISO 11290-1. Byly získány tyto výsledky:
 - Falešně negativní výsledky u metody AccuProbe: 3
 - Dodatečné pozitivní výsledky u metody AccuProbe: 8
 - Shodné výsledky: 335

Metoda AccuProbe Listeria monocytogenes byla certifikována společností AFNOR Certification jakožto alternativní metoda pro analýzu výrobků určených k lidské výživě a rovněž pro analýzu vzorků z výrobního prostředí. Toto schválení bylo uděleno po porovnání s referenční metodou popsanou v normě EN ISO 11290-1A1 a podle protokolu popsaného v normě EN ISO 16140.

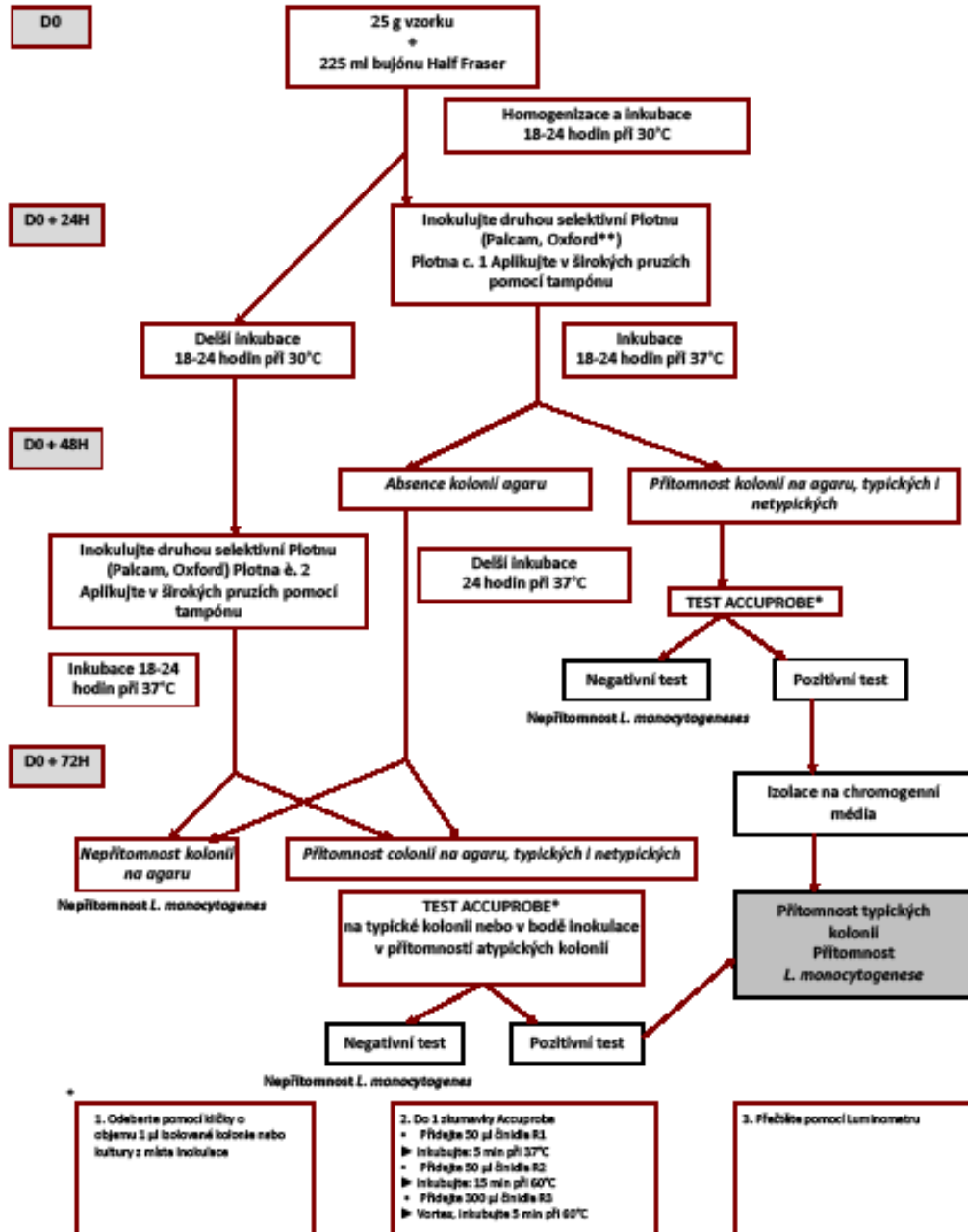
Certifikaci BIO 12/4-02/95 lze získat na oddělení technické podpory společnosti bioMérieux nebo u společnosti AFNOR Certification. Datum konce platnosti značky NF VALIDATION je uvedeno na certifikátu.



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

PŘÍLOHA
POSTUP PRO
« RYCHLOU METODU KE ZJIŠTĚNÍ LISTERIA MONOCYTOGENES »
AFNOR* Certifikace N° BIO 12/4 - 02/95

*AFNOR: Francouzský normalizační institut



LITERATURA

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)



Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Hologic, AccuProbe, a Leader jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Hologic, Inc. nebo jejích dceřiných společností ve Spojených státech amerických nebo v jiných zemích. Hologic

Všechny ostatní ochranné známky, které se mohou objevit v tomto příbalovém letáku, jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.

ALOA je ochranná známka společnosti Biolife Italiana S.r.l.

CHROMAGAR je ochranná známka Alaina Rambacha.

103051F-01-CS Rev. 002 2017-06
©1990 – 2017 Hologic, Inc. Všechna práva vyhrazena.