

KIT PER L'IDENTIFICAZIONE DI LISTERIA MONOCYTOGENES A PARTIRE DA CULTURA

(bioMérieux cod. 39500 / Hologic Cat. N. 102920)

IMPIEGO

Il TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES è un test che consente l'identificazione rapida della *Listeria monocytogenes* - mediante sonda a DNA - a partire dalla coltura o da un pre-arricchimento. Questo test impiega la tecnica di ibridazione degli acidi nucleici.

Un protocollo di ricerca è stato certificato dall'AFNOR Certification - documento N° BIO 12/4-02/95 (vedere paragrafo C CONTROLLO MICROBIOLOGICO).

INTRODUZIONE

Listeria monocytogenes è un microrganismo di origine tellurica, ampiamente diffuso in natura. È possibile riscontrarne la presenza nell'acqua, nei prodotti agricoli e negli animali. Riconosciuto come patogeno per l'uomo da oltre 50 anni, *Listeria monocytogenes*, è stato riconosciuto essere l'agente eziologico della listeriosi, causando nell'uomo meningite, encefalite, setticemia, endocardite, aborto, ascessi e lesioni locali purulente (2,4). Durante gli ultimi dieci anni, numerose epidemie di listeriosi sono state correlate al consumo di alimenti contaminati. Le donne in gravidanza, i neonati, i pazienti affetti da immuno-deficienza e gli anziani sono i soggetti maggiormente esposti al rischio di contrarre una listeriosi (5).

L'identificazione della *L. monocytogenes* si basa sui metodi fisiologici e biochimici: morfologia, colorazione di Gram, catalasi, mobilità, beta-emolisi su agar-sangue e fermentazione degli zuccheri (8).

Il TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES consente la rilevazione di *Listeria monocytogenes* in 35 minuti dopo aver preparato il campione.

PRINCIPIO OPERATIVO

I test di ibridazione degli acidi nucleici sfruttano la capacità dei filamenti di DNA di accoppiarsi in maniera specifica per formare composti stabili a doppia catena (6). Il test AccuProbe impiega una sonda genetica a singola catena di DNA - associata ad un marker chemiluminescente - complementare all'rRNA ribosomiale (rRNA) dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'rRNA dell'organismo bersaglio, la sonda si combina con le sue sequenze omologhe formando un complesso DNA-RNA stabile. Il Reagente di Selezione permette di differenziare le sonde ibridate da quelle non ibridate. Il luminometro Hologic permette di misurare il segnale luminoso emesso dagli ibridi DNA-RNA. Il risultato sarà positivo se il luminometro indicherà un valore superiore o uguale al valore soglia; negativo se mostrerà un valore inferiore.

REAGENTI

Nota: per informazioni sulle indicazioni di pericolo e i consigli di prudenza che possono essere associati ai reagenti, consultare la libreria delle schede di sicurezza (Safety Data Sheet Library) all'indirizzo www.hologic.com/sds.

I reagenti impiegati nel TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES sono forniti in tre diversi kit:

KIT ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES

(bioMérieux cod. 39500 / Hologic Cat. N. 102920)

Reagente Sonda (P) (4 x 5 provette)

Listeria monocytogenes.

KIT DI REAGENTI PER IDENTIFICAZIONE DI COLTURE ACCUPROBE

(bioMérieux cod. 39305 / Hologic Cat. N. 102800)

Reagente 1 (Reagente di Lisi) (1) 1 x 10 ml

Soluzione tamponata contenente 0,04% di sodio azide.

Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) (2) 1 x 10 ml

Soluzione tamponata.

Reagente 3 (Reagente di Selezione) (3) 1 x 60 ml

Soluzione tamponata

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE HOLOGIC

(bioMérieux cod. 39300 / Hologic Cat. N. 201791)

Reagente di Rivelazione I (RI) 1 x 240 ml

0,1% di acqua ossigenata in acido nitrico 0,001 N.

Reagente di rivelazione II (RII) 1 x 240 ml

Iodossido di sodio 1 N.

PRECAUZIONI D'USO

- A. Il test è riservato esclusivamente ad un uso diagnostico in vitro o alla microbiologia industriale.
- B. Durante l'esecuzione di questo test adottare le normali precauzioni (3).
- C. Da usarsi esclusivamente per l'identificazione di *L. monocytogenes* a partire da una coltura.
- D. Impiegare unicamente il materiale compreso nel kit o materiale monouso.
- E. Determinati reagenti impiegati in questo test contengono sodio azide, una sostanza che può reagire con il piombo o il rame delle condutture e formare composti metallici esplosivi. Durante l'eliminazione di questi reagenti, ricordarsi di utilizzare sempre acqua in abbondanza per evitare la formazione di tali composti nelle tubature.
- F. Evitare qualsiasi contatto della cute, degli occhi e delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II. In caso di contatto, sciacquare accuratamente con acqua le parti interessate. Se si verificassero versamenti di reagenti, diluirli con acqua prima di asciugare la superficie.
- G. Per assicurare prestazioni ottimali, si raccomanda prima di effettuare il test di osservare le provette per verificare che in esse non sia presente del materiale disperso. Se così fosse battere leggermente la provetta sul banco di lavoro per far precipitare il materiale sul fondo della stessa.
- H. Rispettare le buone pratiche di laboratorio (ad es. la norma ISO 7218) (12)

CONSERVAZIONE

Le provette di Reagente Sonda devono essere conservate nelle loro confezioni di alluminio a temperature comprese fra 2° e 8°C. Prima dell'apertura rimangono stabili fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, la confezione deve essere richiusa ermeticamente e le provette devono essere usate nell'arco di due mesi, entro e non oltre la data di scadenza.

Gli altri reagenti del TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES possono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

NON CONGELARE I REAGENTI

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES è stato progettato e sviluppato per l'identificazione di *L. monocytogenes* isolata a partire da una coltura. La ricerca di *L. monocytogenes* negli alimenti si effettua dopo una fase di pre-arricchimento.

DIAGNOSI IN VITRO

- A. **Identificazione a partire da coltura solida.** Il test può essere condotto su un adeguato terreno solido, come un terreno di coltura agar-sangue di pecora al 5%, brain heart infusion o un agar-cioccolato. Possono essere impiegati anche mezzi selettivi come l'agar McBride e l'agar LPM (Remel). Il campione può essere testato sin da quando sono visibili le colonie entro le 72 ore successive.
1. Il campione può essere prelevato mediante un'ansa in plastica monouso da 1 µl, un'ansa metallica, un ago in plastica monouso o una bacchetta per applicazione. Data la bassa quantità di liquido in cui i batteri verranno rimessi in sospensione si consiglia di non usare tamponi.
 2. È possibile testare più colonie piccole (3 o 4) oppure il contenuto di un'ansa da 1 µl, ovvero una sola colonia il cui diametro sia almeno di 1 mm.
 3. Non effettuare prelievi dal mezzo di coltura con i batteri.
 4. A questo punto l'operatore può decidere di inoculare un'altra piastra di Petri per confermare la purezza del campione isolato.
- B. **Identificazione su brodo di coltura.** Il test può essere condotto su adeguati brodi di coltura, come il brodo tripticase-soia, il brodo cuore-cervello o il brodo di arricchimento per *Listeria* LEB (*Listeria* Enrichment Broth) la cui torbidità deve essere superiore o uguale ad 1 unità McFarland. Prelevare con la pipetta un campione da 50 µl della sospensione del brodo perfettamente omogeneizzato e dispensarlo nella provetta di Reagente Sonda attenendosi alle istruzioni del paragrafo ISTRUZIONI PER L'USO/PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

CONTROLLO MICROBIOLOGICO

Il protocollo descritto nel paragrafo C di questo capitolo è certificato dall'AFNOR Certification.

- A. **Identificazione o ricerca a partire da coltura in terreno solido.** Il test può essere condotto su colonie isolate in un mezzo solido adeguato (agar-sangue di pecora al 5%, agar PALCAM, Oxford o McBride). La coltura deve avere meno di 72 ore e può essere testata non appena sono visibili le colonie.
1. Il campione può essere prelevato mediante un'ansa in plastica monouso da 1 µl, un'ansa metallica, un ago in plastica monouso, una pipetta Pasteur chiusa o una bacchetta per applicazione. Data la bassa quantità di liquido in cui i batteri saranno rimessi in sospensione, si consiglia di non usare tamponi.
 2. È possibile testare più colonie piccole (3 o 4) oppure una sola colonia il cui diametro sia almeno di 1 mm (1 colonia contiene da 10^{11} a 10^{12} batteri), ovvero prelevare dal punto di inoculo (ansa da 1 µl).
 3. Non effettuare prelievi dal mezzo di coltura con i batteri.
 4. In base alla ricchezza della coltura, prelevare o l'insieme delle colonie presenti o quelle presenti nella zona di inoculo.
 5. L'operatore può decidere di inoculare un'altra piastra di Petri per confermare la purezza del campione isolato.
- B. **Identificazione a partire da brodo di coltura.** Il test può essere condotto direttamente a partire da un brodo di coltura adeguato. In base a studi realizzati su vari terreni (1, 7) solo determinati brodi possono essere impiegati direttamente. Brodi non selettivi come il brain heart infusion, il brodo tripticase-soia, *Listeria* Enrichment Broth o Todd-Hewitt forniscono buoni risultati, mentre altri, più

selettivi, (L. PALCAMY, UVM, Fraser) riducono la sensibilità del test e possono provocare risultati falsi negativi. L'incubazione deve continuare per 48 ore a una temperatura di 30°C. **L'impiego di brodi Fraser, UVM, PALCAMY richiede la realizzazione di una subcoltura in terreno solido.**

Prelevare con la pipetta 50 µl del brodo di coltura perfettamente omogeneizzato e dispensarli nella provetta di Reagente Sonda attenendosi a quanto indicato nel paragrafo C del capitolo ISTRUZIONI PER L'USO.

C. Protocollo certificato dall'AFNOR Certification n° bio 12/4-02/95 (valido fino al 7 febbraio 2011) per tutti i prodotti per l'alimentazione umana e per i campioni degli ambienti di produzione.

T0 1. Omogeneizzare X g di campione in 9X ml di brodo Mezzo Fraser e successivamente mettere in incubazione per 18-24 ore a 30° ± 1°C.

NB: secondo la normative NF VALIDATION non debbono essere testate quantità di campione superiori a 25 g

T0 + 24 ore 2. Dopo incubazione del brodo di arricchimento inoculare, tramite un tampone avvalendosi del metodo a stria larga, su agar Palcam (tutti i prodotti per l'alimentazione umana e per i campioni degli ambienti di produzione) o Oxford (prodotti lattiero caseari), e metterlo in incubazione per 18-24 ore a una temperatura di 37° ± 1°C (piastra N° 1).

3. L'incubazione del brodo Mezzo Fraser viene prolungata di 18-24 ore ad una temperatura di 30° ± 1°C.

T0 + 48 ore 4. Dopo 18-24 ore d'incubazione a 37° ± 1°C della piastra N° 1, la ricerca di *Listeria monocytogenes* viene effettuata a partire dalle colonie caratteristiche sviluppate su agar selettivo in base al protocollo descritto nella sezione A di questo capitolo, vedendo altresì il capitolo «ISTRUZIONI PER L'USO». In assenza di crescita di colonie caratteristiche sulla piastra o in caso di un risultato AccuProbe negativo:

- prolungare l' incubazione dell'agar N° 1 per altre 18-24 ore a 37° ± 1°C,
- seminare un altro agar selettivo (agar N° 2) partendo dal brodo mezzo-Fraser, incubato per 48 ore. Incubare l'agar per 24 ore a 37° ± 1°C.

T0 + 72 ore 5. Dopo 48 ore d'incubazione (piastra N° 1) o 24 ore d'incubazione (piastra N° 2) procedere alla ricerca di *Listeria monocytogenes* in base al protocollo descritto nella sezione A di questo capitolo e vedere altresì il capitolo «ISTRUZIONI PER L'USO». In assenza di colonie caratteristiche ma in presenza di colonie non caratteristiche, eseguire il test prelevando il campione dal punto di inoculo.

Conferma dei risultati positivi: nell'ambito del protocollo certificato da NF VALIDATION, tutti i risultati positivi ottenuti con il test AccuProbe devono essere confermati. La conferma dovrà essere effettuata mediante una delle seguenti tre opzioni :

- Adoperando i test classici descritti nelle procedure standardizzate dal CEN, dall'ISO o dall'AFNOR (incluse le tappe di purificazione).
- Utilizzando un terreno cromogeno come l'agar « *Listeria* secondo Ottaviani e Agosti » descritto nello standard ISO 11290-1 oppure utilizzando un terreno cromogeno indicato in un protocollo validato dall' AFNOR. Con l'aiuto di un'ansa da 1 µl, prelevare del materiale dall'area di inoculo della piastra PALCAM, da cui si è ottenuto un risultato AccuProbe positivo e procedere all'isolamento sul terreno cromogeno. Incubare le piastre seguendo le modalità d'uso indicate nelle schede tecniche dei prodotti. L'isolamento di colonie caratteristiche conferma il risultato positivo del test AccuProbe. I seguenti terreni cromogeni sono stati testati nell'ambito delle validazioni AFNOR del 2003 e 2007: Compass L. Mono Agar (2003), Chromagar *Listeria* (2003), ALOA (2003), Rapid' L. Mono (2003 e 2007) e OAA (2007).

- Utilizzando qualsiasi altro metodo certificato dall'AFNOR Certification, che si basa su principi differenti da quelli della metodica AccuProbe, il protocollo validato della seconda metodica dovrà essere rispettato nella sua totalità.

In caso di risultati discordanti (positivi con il metodo alternativo, non confermati con i test descritti nelle procedure standardizzate dal CEN o dall'ISO, o dopo isolamento su terreno cromogeno o con un altro metodo certificato da NF VALIDATION), il laboratorio dovrà impiegare i mezzi necessari per assicurarsi della validità dei risultati ottenuti. In caso si utilizzi un terreno cromogeno, si consiglia di prolungare di 24 ore l'incubazione o procedere ad un ulteriore isolamento su un terreno cromogeno differente a partire dal terreno Palcam o dal terreno Oxford.

MATERIALE COMPRESO NEL KIT

TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES

bioMérieux cod. 39500 / Hologic Cat. N. 102920

20 Test

Reagente Sonda (P)

4 x 5 provette

MATERIALE RICHIESTO NON COMPRESO NEL KIT

Anse da 1 µl in plastica sterili, anse metalliche, aghi in plastica, pipette Pasteur chiuse o bacchette per applicazione allo scopo di prelevare le colonie.

Ceppi di controllo

Incubatore o bagnomaria (37° ± 1°C)

Bagnomaria o incubatore* (60° ± 1°C)

Micropipette(50 µl, 300 µl)

Micropipette a volume fisso (50 µl, 300 µl)

Vortex

*Gli alloggiamenti all'interno dell'incubatore devono essere perfettamente dimensionati per provette da 12 x 75 mm. Si raccomanda l'impiego di un incubatore Hologic.

ULTERIORE MATERIALE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE HOLOGIC

Luminometro Hologic Leader 50i

(bioMérieux cod. 39400 / Hologic Cat. N. 103100i)

Incubatore Hologic (60° ± 1°C)

(bioMérieux cod. 39406)

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURE ACCUPROBE

(bioMérieux cod. 39305 / Hologic Cat. N. 102800)

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE HOLOGIC

(bioMérieux cod. 39300 / Hologic Cat. N. 201791)

ISTRUZIONI PER L'USO

A. PREPARAZIONE DEL MATERIALE

1. Impostare un incubatore o un sistema a bagnomaria a 37° ± 1°C.
2. Impostare un incubatore o un sistema a bagnomaria a 60° ± 1°C.
3. Preparare il luminometro Hologic. Assicurarsi che la quantità di Reagenti di Rivelazione I e II sia sufficiente per effettuare i test.

B. CONTROLLI

In ogni laboratorio occorre testare sistematicamente dei ceppi come controllo positivo e negativo, secondo le normative in vigore. È possibile usare una coltura di *L. monocytogenes* (American Type Culture Collection, ATCC 35152) come controllo positivo ed una coltura di *Listeria grayi* (ATCC 19120) come controllo negativo.

C. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER IBRIDAZIONE

1. Tagliare orizzontalmente la parte superiore delle confezioni di alluminio. Prelevare il numero sufficiente di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Richiudere ermeticamente la confezione ripiegando più volte l'estremità e fermandola con nastro adesivo o con una clip. **Non asportare il saccetto del disidratante.**
2. Predisporre un numero sufficiente di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e le colture di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
3. Dispensare 50 µl del Reagente 1 (Reagente di Lisi) in ogni provetta di Reagente Sonda. **Se il test viene condotto su ceppi isolati a partire da brodo-coltura, non aggiungere Reagente 1 nelle provette di Reagente Sonda.**
4. Trasportare il campione proveniente dal terreno di coltura solido o 50 µl della brodo-coltura correttamente omogeneizzato nelle provette di Reagente Sonda, attenendosi alle istruzioni fornite nel paragrafo «PREPARAZIONE DEL CAMPIONE». Se il test viene eseguito su una coltura solida, roteare l'ansa o l'ago nel Reagente 1 e miscelare accuratamente.
5. Richiudere le provette di Reagente Sonda e metterle in incubazione a una temperatura di 37° ± 1°C, per una durata di 5 minuti in un bagnomaria o per 10 minuti in un incubatore.

D. IBRIDAZIONE

1. Prelevare le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 50 µl di Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) in ogni provetta di Reagente Sonda.
2. Richiudere le provette di Reagente Sonda e metterle in incubazione per 15 minuti a 60° ± 1°C nel bagnomaria o nell'incubatore

E. SELEZIONE

1. Prelevare le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 300 µl di Reagente 3 (Reagente di Selezione) in ogni provetta. Richiudere le provette e agitarle con un vortex per rendere omogenea la miscela.
2. Mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione almeno per 5 minuti a 60° ± 1°C a bagnomaria o in incubatore.
3. Prelevare le provette dal bagnomaria o dall'incubatore e mantenerle a temperatura ambiente almeno per 5 minuti. Rimuovere e gettare i tappi. **Avvalendosi di un luminometro leggere i risultati del test nell'ora successiva.**

F. LETTURA

1. Selezionare il protocollo giusto sul luminometro.
2. Per eliminare completamente i residui dalla superficie delle provette, asciugarle utilizzando un foglio assorbente inumidito. Inserire successivamente le provette nel luminometro e seguire attentamente le istruzioni.
3. Una volta conclusa l'analisi, estrarre le provette dal luminometro.

OSSERVAZIONI

- A. REAGENTI: il Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) può precipitare. Riscaldarlo a 35° - 60°C e agitarlo con un Vortex per sciogliere il precipitato.
- B. TEMPERATURA: l'ibridazione e la selezione sono reazioni temperatura-dipendenti. Di conseguenza, è indispensabile mantenere il bagnomaria o l'incubatore alla temperatura raccomandata.

C. DURATA DELLE OPERAZIONI:

1. Occorre iniziare la reazione di ibridazione nell'ora successiva all'introduzione del campione e del Reagente 1 nelle provette di Reagente Sonda.
2. Le reazioni di ibridazione e di selezione dipendono dal tempo. L'ibridazione deve durare minimo 15 minuti e massimo 20 minuti. Durante la SELEZIONE, mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione per 5 minuti, senza superare però il limite dei 6 minuti.

D. BAGNOMARIA: il livello d'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che la totalità del liquido di reazione delle provette di Reagente Sonda sia completamente sommerso.

E. USO DEL VORTEX: è fondamentale disporre di una miscela omogenea durante la fase di Selezione, in particolare dopo l'aggiunta del Reagente 3.

F. SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI

1. Alti valori di controllo negativo (*Listeria grayi* ATCC 19120), superiori a 20.000 RLU (Relative Light Units) sul luminometro Leader o a 600 PLU (Photometric Light Units) sul luminometro AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere riscontrati quando l'omogeneizzazione è stata insufficiente dopo l'inoculazione del Reagente 3 (Reagente di Selezione), o quando siamo in presenza di vari tipi di colonie. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla ad incubare. Verificare l'aspetto delle colonie.
2. Bassi valori di controllo positivo (*Listeria monocytogenes* ATCC 35152), inferiori a 50.000 RLU sul luminometro Leader o a 1.500 PLU sul luminometro AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere rilevati quando il numero di germi è insufficiente, o quando il test viene effettuato su colture miste o troppo vecchie. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla ad incubare. Verificare l'aspetto delle colonie.

RISULTATI DEL TEST

A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES vengono interpretati in base ad un valore soglia. I campioni che originano un segnale luminoso di valore superiore o uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia sono considerati negativi. Quando il risultato si posiziona intorno al cut-off, il test deve essere ripetuto. Se la seconda analisi fa nuovamente emergere risultati equivoci, occorre trapiantare il ceppo per verificarne la purezza.

	AccuLDR (precedentemente PAL)	Leader
Valore soglia	1.500 PLU	50.000 RLU
cut-off	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROLLO DI QUALITÀ ED ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi (ad es. *Listeria grayi*, ATCC 19120) e positivi (ad es. *Listeria monocytogenes*, ATCC 35152) devono soddisfare i seguenti valori:

	AccuLDR (precedentemente PAL)	Leader
Controllo negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Controllo positivo	>1.500 PLU	> 50.000 RLU

Se i controlli si trovano al di fuori di questa gamma, i risultati del test non devono essere presi in considerazione.

LIMITI DEL TEST

Questo metodo è stato testato su colonie fresche cresciute su terreni di coltura solidi e liquidi elencati nel paragrafo PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Le performance di questo test eseguito direttamente su campioni clinici (ad esempio LCR o sangue) non sono state valutate.

I risultati ottenuti con il TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES devono essere interpretati in funzione di altri dati di laboratorio e correlati con i dati clinici.

VALORI ATTESI

Il TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES è stato confrontato con le metodiche tradizionali di coltura di identificazione biochimica su 175 ceppi di *L. monocytogenes* e altri 102 ceppi appartenenti a 21 generi diversi. Una seconda valutazione ha riguardato 296 ceppi isolati a partire da cibo potenzialmente contaminato. I campioni sono stati dichiarati positivi (> 50.000 RLU) o negativi (< 40.000 RLU). I risultati osservati andavano da 520 a 27.990 RLU per le colture negative e da 77.088 a 1.283.789 RLU per le colture positive. Il raffronto di questi risultati con le metodiche tradizionali di identificazione è di seguito indicato:

ACCUPROBE / IDENTIFICAZIONE DI COLTURA

AccuProbe Coltura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità Specificità	Tasso di Concordanza
Centro 1	175	0	0	102	100% / 100%	100%
Centro 2	81	1	0	110	100% / 99,5%	99,7%
Totale	256	1	0	212	100% / 99,7%	99,8%

Il solo ceppo AccuProbe -positivo / Coltura-negativo del centro 2 è stato nuovamente analizzato con il metodo ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES e ha evidenziato un risultato negativo.

PERFORMANCE DEL TEST

A. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test del TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES è stata calcolata analizzando tre diverse concentrazioni di RNA ribosomiale di *L. monocytogenes*. Ogni campione è stato testato per 10 volte in una medesima serie.

Campione	A	B	C
Numero di test	10	10	10
Risposta media (RLU)	132.370	72.720	41.074
Deviazione standard	9.981	3.126	3.837
Coefficiente di variazione	7,5%	4,3%	9,3%

B. PRECISIONE INTER-TEST

La precisione inter-test è stata calcolata analizzando con la modalità della determinazione unica le stesse tre concentrazioni di RNA ribosomiale di *L. monocytogenes* in 12 serie differenti.

Campione	A	B	C
Numero di test	12	12	12
Risposta media (RLU)	146.469	77.240	41.074
Deviazione standard	19.793	8.634	4.343
Coefficiente di variazione	13,5%	11,2%	10,8%

C. SPECIFICITÀ

È stato studiato un totale di 97 ceppi tramite il TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES. Questi ceppi rappresentavano un totale di 87 specie provenienti da 53 generi diversi. È stato testato un panel di 15 ceppi di 7 specie di *Listeria* (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*,

L. sceligeri, L. welshimeri). Unicamente i ceppi di L. monocytogenes hanno mostrato risultati positivi con il TEST ACCUPROBE LISTERIA MONOCYTOGENES.

D. TEST DI SOVRACCARICO

5 serie di diluizioni di L. monocytogenes (da 0 a 30 milioni di microrganismi) sono stati analizzati in presenza di 30 milioni di microrganismi di specie diverse dalla L. monocytogenes (L. grayi, L. ivanovii, Erysipelothrix rhusiopathiae, Brochothryx thermophacta). Non è stata rilevata alcuna interferenza né reazione crociata.

E. PRESTAZIONI SPECIFICHE

Nel quadro della marcatura di NF VALIDATION, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- Inclusività/esclusività: 50 specie di L. Monocytogenes saggiate sono state correttamente identificate. Lo studio di 18 ceppi di Listeria non monocytogenes e di 12 ceppi non appartenenti al genere Listeria non sono stati riconosciuti e non hanno fornito cross-reattività.
- Livello di rilevazione relativa: il limite di rilevazione del 50 % è identico per il metodo AccuProbe e il metodo di riferimento EN ISO 11290-1 ed è compreso tra 0,3 e 5,2 UFC/25 g.
- Studio comparativo: i seguenti risultati sono stati ottenuti saggiando simultaneamente 346 campioni con il metodo AccuProbe (agar Palcam) ed il metodo EN ISO 11290-1
- Falsi Negativi con AccuProbe: 3
- Positivi solo con AccuProbe: 8
- Risultati concordanti: 335

Il metodo AccuProbe Listeria monocytogenes è stato certificato dall'AFNOR Certification come metodo alternativo d'analisi per tutti i prodotti per l'alimentazione umana e per i campioni degli ambienti di produzione. L'approvazione è stata ottenuta per comparazione con il metodo di riferimento descritto nella norma internazionale EN ISO 11290-1/A1 e secondo il protocollo descritto nella norma EN ISO 16140.

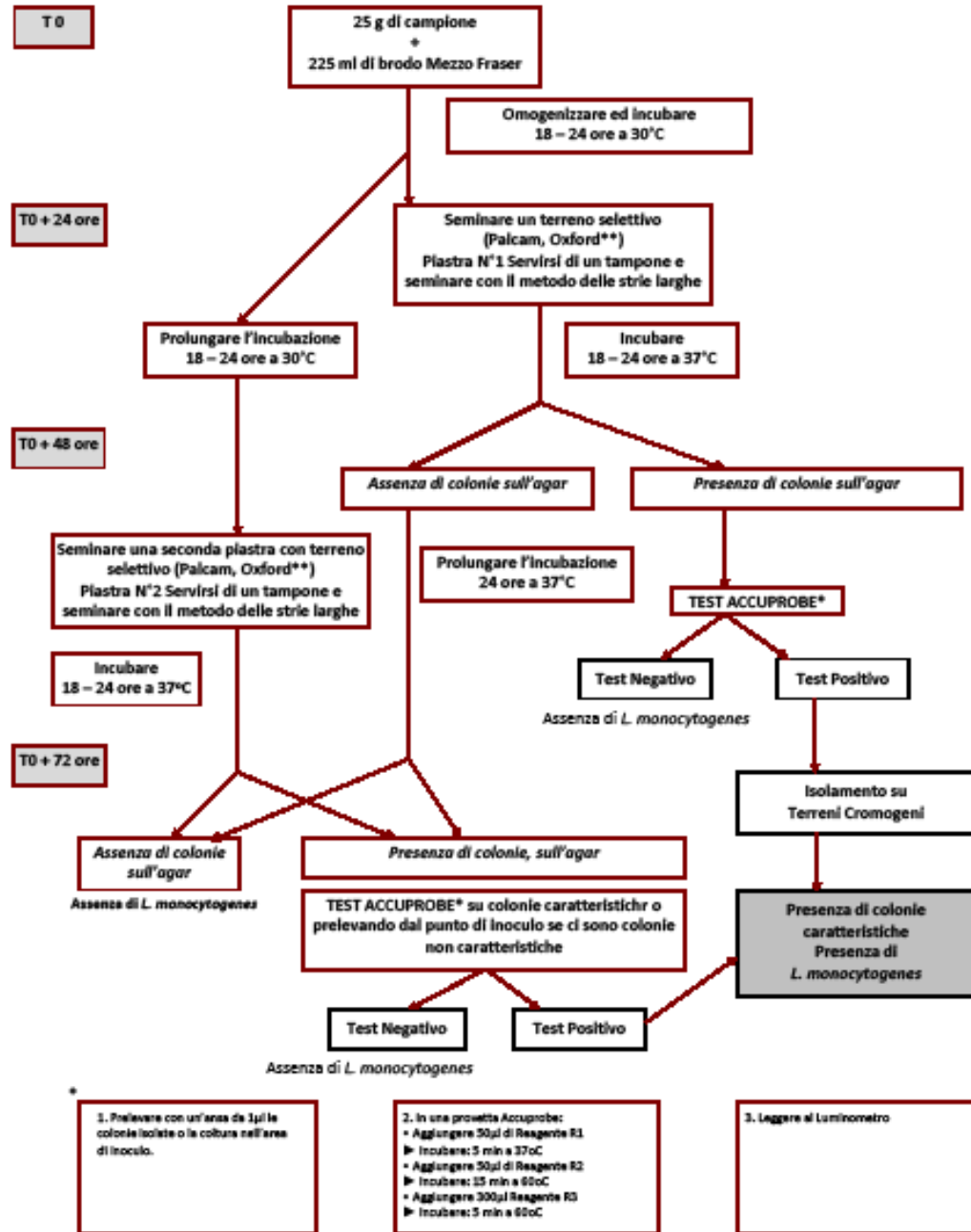
La certificazione BIO-12/4 – 02/95 può essere richiesta al nostro Reagents Customer Service o all'AFNOR Certification. La data del termine della validità per la certificazione NF VALIDATION è indicata sul certificato.



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

**ALLEGATO
 PROTOCOLLO DEL
 «METODO RAPIDO DI RICERCA DI LISTERIA MONOCYTOGENES»
 AFNOR® Certification N° BIO 12/4 - 02/95**

*AFNOR: Ente Normativo di Standardizzazione Francese



** Palcam: per tutti i prodotti alimentari ed i campioni ambientali, Oxford: per i prodotti lattiero caseari

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)



Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Hologic, AccuProbe, e Leader sono marchi commerciali e/o marchi commerciali registrati di Hologic, Inc. e/o delle aziende consociate negli Stati Uniti e/o in altri paesi.

Tutti gli altri marchi commerciali che possono apparire in questo foglietto illustrativo appartengono ai rispettivi proprietari.

ALOA è un marchio di Biolife Italiana S.r.l.

CHROMAGAR è un marchio di Alain Rambach.

103051F-01-IT Rev. 002 2017-06

©1990 – 2017 Hologic, Inc. Tutti i diritti riservati.