

Listeria Monocytogenes

Per uso diagnostico *in Vitro***Test immunocromatografico rapido per la determinazione qualitativa di *Listeria Monocytogenes* in campioni fecali ed alimentari**

I. INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO

Listeria monocytogenes è un piccolo bacillo gram positivo che può crescere in condizioni di aerobiosi e di anaerobiosi. Si ritrova spesso nell'ambiente, nel suolo, nell'acqua, nella vegetazione in decomposizione, così come potrebbe far parte della flora fecale di alcuni mammiferi includendo l'uomo. I primi sintomi dell'infezione sono aspecifici, come nausea, vomito, crampi addominali, diarrea e febbre. Ci sono poche caratteristiche cliniche tipiche della listeriosi. Tuttavia, i medici devono considerare una varietà di potenziali cause per un'infezione, tra cui infezioni virali (influenza) e altre infezioni batteriche che potrebbero causare sepsi o meningiti. I sintomi si possono sviluppare in un tempo variabile da 2 a 70 giorni dopo aver assunto cibo infetto. Ad eccezione della trasmissione verticale madre-feto, la maggior parte delle listeriosi cominciano con l'ingestione dell'organismo da cibo infetto.

La maggior parte degli adulti sani e dei bambini che consumano cibo contaminato sviluppano sintomi moderati di infezione. Gli immunodepressi presentano un rischio maggiore se dovessero contrarre la listeriosi.

Il kit *Listeria Monocytogenes* fornisce una determinazione rapida della *Listeria monocytogenes* da campioni alimentari arricchiti e direttamente da campioni fecali.

Listeria monocytogenes è un test rapido per la determinazione diretta di *Listeria monocytogenes* in campioni fecali ed alimentari dopo arricchimento (carne, cibo etc..).

II. PRINCIPIO DEL TEST

Listeria monocytogenes è un metodo sandwich immunocromatografico per la determinazione qualitativa di *Listeria monocytogenes* nelle feci e in campioni alimentari. Impiega anticorpi coniugati con latex colorato, specifici per gli antigeni *Listeria monocytogenes*. e anticorpi su fase solida.

Durante il test, il campione reagisce con le particelle di lattice coattate con l'anticorpo anti-*Listeria monocytogenes* che si trovano nell'area test. La miscela si muove lungo la membrana per azione capillare. In caso di positività gli anticorpi specifici presenti sulla membrana cattureranno il complesso colorato. Il campione continua la migrazione lungo la membrana filtrante fino alla zona di controllo, dove è coattato un anticorpo generico capace di legare l'anticorpo marcato con latex, dando luogo ad una banda verde che dimostra il corretto funzionamento dei reattivi. La presenza della banda verde serve per 1) verificare che è stato aggiunto sufficiente volume, 2) il flusso era appropriato e 3) come controllo interno per i reagenti.

III. REAGENTI E MATERIALI

Ogni kit contiene:

1. N.10 card *Listeria monocytogenes*.
2. N.1 Flacone con 8 mL di Tampone d'estrazione.
3. N.1 Istruzioni per l'uso.

Reagenti e materiale necessario ma non fornito:

Disponitivi per la raccolta dei campioni; Guanti monouso; Cronometro; Provette/fiale da saggio; Pipette di plastica.

Listeria Fraser broth half concentration (Mascia Brunelli-Biolife cat. 5115943), Bigmixer1 (Mascia Brunelli-Biolife cat. 7221230), Medium Aloa (Mascia Brunelli-Biolife cat. 541605), Brain Heart Infusion Broth (Mascia Brunelli-Biolife cat. 551230), Tryptic Soy Broth (Mascia Brunelli-Biolife cat. 552165), *Listeria* Fraser Broth (Mascia Brunelli-Biolife cat. 551594), Incubatore +30°C e +37°C. Acqua purificata.

IV. PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro* e per solo uso professionale.
- Non usare oltre la data di scadenza indicata sulla confezione.
- Le card devono restare sigillate fino al momento dell'uso.
- Non utilizzare le card se la confezione è danneggiata.
- Seguire le buone regole di laboratorio, indossando occhiali protettivi, usando guanti monouso, non mangiare, bere o fumare durante l'esecuzione del test.
- Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente infettivi e maneggiati come infettivi.
- Eliminare i guanti, i tamponi, le provette e le card utilizzate rispettando le regole di laboratorio, in appositi contenitori.
- Il test deve essere eseguito entro 2 ore dall'apertura delle buste.

V. STOCCAGGIO E STABILITÀ

Conservare il dispositivo sigillato refrigerato o a temperatura ambiente (2-30°C/36-86°F). Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Il dispositivo deve restare sigillato fino al momento dell'uso. Non congelare.

VI. RACCOLTA DEI CAMPIONI FECALI

Raccogliere una sufficiente quantità di feci (1-2 g o mL per campioni liquidi). I campioni di feci devono essere raccolti in contenitori puliti ed asciutti (nessun conservante o terreno di trasporto). I campioni possono essere conservati in frigorifero (2-4°C/36-40°F) per 1-2 giorni prima di essere testati. Per periodi di stoccaggio più lunghi i campioni vanno congelati a -20°C. In questo caso, il campione andrà completamente scongelato e portato a temperatura ambiente prima di poter essere processato.

VII. PROCEDURA PER CAMPIONI FECALI

Procedimento del campione

Utilizzare tamponi swab o bacchette, pipette, provette o fiale diverse per ogni campione. Dispensare esattamente 0.7 mL (o 14 gocce) di tampone di estrazione in un flacone o una provetta. Introdurre il tampone swab o il bastoncino due volte nel campione di feci, in modo da raccoglierne un piccolo quantitativo, pari a un chicco di riso (150 mg) e stemperarlo nella provetta contenente il tampone. Agitare la provetta per omogenare la soluzione. Per feci liquide, aspirare il campione con una pipetta gocciolatore e aggiungerne 150 µL nella provetta da saggio contenente 1.0ml di tampone di estrazione. Agitare delicatamente, quindi agitare su vortex per 15 secondi.

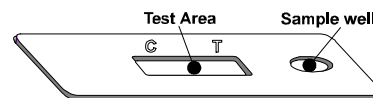
Procedimento del test

Portare i reattivi e il campione a temperatura ambiente prima di effettuare il test.

1. Estrarre la card dalla busta ed usare il prima possibile.
2. Usare materiale pulito per ciascun campione.
3. Prelevare parte del liquido surnatante con una pipetta e dispensarne 4 gocce (100 µL) nella finestra circolare della card. Far partire il cronometro.
4. Attendere 10 minuti quindi osservare la comparsa delle bande colorate nelle finestre contrassegnate con "T" e "C".

VIII. RACCOLTA DEI CAMPIONI ALIMENTARI

I campioni alimentari andrebbero raccolti in contenitori puliti e il dosaggio dovrebbe essere fatto subito dopo la raccolta. I campioni possono essere conservati in frigorifero (2-4°C/36-40°F) per 1-2 giorni prima di essere testati. Per periodi di stoccaggio più lunghi (al



massimo 12 mesi), i campioni vanno congelati a -20°C. In questo caso, il campione andrà completamente scongelato e portato a temperatura ambiente prima di poter essere processato, assicurandosi che la sola quantità occorrente venga scongelata perché congelamenti e scongelamenti ripetuti sono sconsigliati. I campioni omogeneizzati devono essere processati subito.

Arricchimento del Campione:

- Miscelare 25 g di campione solido o 25 mL di campione liquido con 225 mL di Listeria FRASER broth half concentration e omogeneare per circa 2 minuti in Bagmixer 1 se necessario.
- Incubare per 21-24 h a 28-30°C.
- Strisciare aliquote da 0,1 mL di Listeria FRASER broth half concentration su piastre di terreno Aloa.
- Incubare per 24 ± 2 h a 37°C. Reincubare le piastre negative per ulteriori 24 ± 2 h a 37°C.

Conferma culturale

- Raccogliere 1-3 colonie dal terreno Aloa.
- Risospendere in 0,25 mL di Brain heart infusion Broth o Tryptic Soy Broth o Listeria Fraser Broth e miscelare.
- Incubare per 1 h a 37°C.
- Lasciare a temperatura ambiente.

IX. PROCEDURA PER CAMPIONI ALIMENTARI

Portare i reattivi e il campione a temperatura ambiente prima di effettuare il test.

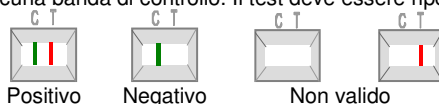
1. Trasferire 1.0-2.0 mL (approssimativamente 30-40 gocce) di campione arricchito o del campione di conferma in una provetta da saggio.
2. Rimuovere la card dalla busta sigillata appena prima dell'uso ed identificare.
3. Usare per ogni campione una card e una pipetta dedicata. Dispensare 4 gocce o 100 µL di campione arricchito o di campione di conferma nella finestra circolare della card. Far partire il cronometro.
4. Attendere 10 minuti e leggere il risultato (comparsa bande colorate).

X. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

NEGATIVO: quando appare una sola banda nella finestra "C" (banda di controllo di colore verde). Nella finestra "T" non compare alcuna banda.

POSITIVO: quando appaiono due bande, una nella finestra "C" (verde) ed una nella finestra "T" (rossa). Il campione contiene *Listeria monocytogenes*.

NON VALIDO: quando non appare alcuna banda di controllo. Il test deve essere ripetuto.



XI. CONTROLLO QUALITA' INTERNO

Viene inclusa la procedura di Controllo Qualità interno. Una linea verde compare nella zona del controllo C come controllo interno. Conferma che il volume del campione è sufficiente e la tecnica procedurale corretta.

XII. CARATTERISTICHE

Limite di rivelabilità

Il limite di rivelabilità del test è 6.25×10^4 batteri di *L.monocytogenes* /mL.

Sensibilità e specificità

I campioni sono stati testati in parallelo con Singlepath® L'mono (Merck). I risultati presentano un valore di sensibilità >99% e una specificità uguale al 96%.

L'uso di anticorpi monoclonali di topo nel test, assicura un alto grado di specificità per la determinazione del batterio in esame. Gli anticorpi utilizzati per lo sviluppo del test riconoscono gli epitopi della *Listeria* trovati in campioni fecali di pazienti, così come nelle preparazioni di colture batteriche in vitro. Questi dati sono preliminari, sono necessarie ulteriori valutazioni.

Cross-reattività

E' stata valutata la cross-reattività di *Listeria Monocytogenes* (Mascia Brunelli). Non si osserva cross-reazione con i comuni patogeni intestinali, altri organismi e patogeni occasionalmente presenti nelle feci: *H. pylori*, *Escherichia coli O157:H7*, *Astrovirus*, *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Salmonella*, *Campylobacter*. Non si osserva cross-reazione con i comuni patogeni alimentari, altri organismi e sostanze occasionalmente presenti nel cibo: *Escherichia coli O157*, *Campylobacter*, *Salmonella*.

XIII. LIMITI DEL TEST

- Il test deve essere fatto entro due ore dall'apertura della card
- Un eccesso di campione potrebbe dare un risultato errato (comparsa di banda marrone o assenza di banda di controllo). Diluire il campione e ripetere il test.
- Le feci di alcuni campioni fecali, possono diminuire l'intensità della banda di controllo.
- Evitare cicli di congelamento e scongelamento che potrebbero dare risultati errati.
- Un risultato negativo non è significativo in quanto è possibile avere campioni fecali contenenti concentrazioni troppo basse di *Listeria*. La determinazione della *Listeria* dovrebbe essere fatta in campioni arricchiti.
- Questo test fornisce una diagnosi presuntiva di *Listeriosi* o la presenza/assenza di *Listeria monocytogenes* in campioni alimentari. Una diagnosi definitiva deve essere confortata da altri parametri clinici e dal medico correlando i risultati ottenuti con altre osservazioni cliniche. Così come la presenza in campioni alimentari deve essere confermata da altri metodi validati.

XIV. BIBLIOGRAFIA

1. BOTTELDOORN N, et al. "Microbiological and molecular investigation of an increase of human listeriosis in Belgium, 2006-2007". Euro Surveill. 2010;15(6):pii=19482.
2. BORTOLUSSI, R. "Listeriosis: a primer". CMAJ, October, 2008 Vol 179(8), pp 795-797

	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Limiti di temperatura		Codice del lotto (EXXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto		Non sterile
	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)		Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

CONFEZIONE

Listeria monocytogenes
Flacone con 8 mL di tampone d'estrazione
Istruzioni per l'uso

Cod. VQ84050

10 Card
1 Flacone
1 pezzo

Codice ramo CND W0105011303

