

1.04148.

GLISA

Singlepath® L 'mono

GLISA-Schnelltest (Gold Labeled Immunosorbent Assay) zum qualitativen Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln und Umweltproben

25 Tests

Einleitung

Listerien sind grampositive, nichtsporenbildende, stäbchenförmige Bakterien. Unter den 6 bekannten Spezies der Gattung *Listeria* ist *Listeria monocytogenes* als Mensch- und tierpathogener Keim besonders hervorzuheben. *L. ivanovii* ist nur tierpathogen. *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri* gelten als harmlose Umweltkeime.

Die von *L. monocytogenes* ausgelöste Listeriose kann sich in Form einer Sepsis, Meningitis oder sogar einer Enzephalitis, aber auch in Form einer Gastroenteritis äußern. Da *L. monocytogenes* die Plazentaschranke überwinden kann, stellt die Listerieninfektion bei Schwangeren eine besondere Gefahr für den Fötus dar. Hauptrisikogruppen für den Erwerb einer Listeriose sind neben Schwangeren außerdem Neugeborene, ältere und immunsupprimierte Personen.

Bedingt durch die ubiquitäre Verbreitung der>Listerien, durch ihre Fähigkeit bei Kühlschranktemperaturen (+2 °C bis + 8 °C) sich zu vermehren, sowie durch ihre generell hohe Umweltresistenz sind Lebensmittel eine der Hauptinfektionsquellen.

Aus diesem Grund ist die Untersuchung von *L. monocytogenes* in Lebensmittel- und Umweltproben unbedingt notwendig. Die starke Zunahme von *Listeria* verursachten Lebensmittelinfektionen erfordert verlässliche und schnelle Nachweismethoden. Neben den traditionellen Kulturmethoden finden immunologische Techniken aufgrund der besseren Spezifität und Sensitivität immer häufiger Anhang beim Anwender. Singlepath® L 'mono arbeitet als immunologischer Sreeningtest und extrem schneller Bestätigungstest zum spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* nach dem Immunflow Prinzip und ist so konzipiert, daß keine zeitraubenden und arbeitsintensiven Schritte zur Durchführung und Auswertung des Tests erforderlich sind.

Prinzip

1.04148. Singlepath® L 'mono ist ein immunchromatographischer Schnelltest mit Gold-gelabelten Antikörpern. Die Testeinheit enthält eine runde Öffnung zur Aufnahme der Probe und ein rechteckiges Feld für den Test (T) und die Kontrolle (C).

- Die Probe wird über die runde Öffnung auf das Chromatographiepapier aufgetragen.
- Der Probeninhalt wird durch das Papierpolster zur Reaktionszone gesaugt, auf der kolloidale, gold-markierte gegen *Listeria monocytogenes* gerichtete Antikörper aufgetragen sind.
- Vorhandenes *Listeria monocytogenes* -Antigen bildet einen Antigen-Antikörper-Komplex. Dieser wandert aus der Öffnung zur Testzone (T).
- In der Testzone (T) ist ein zweiter Anti-*Listeria monocytogenes* Antigen-Antikörper linienförmig aufgetragen. Dieser bindet den Antigen-Antikörper-Komplex. Aufgrund der Goldmarkierung entsteht eine rotgefärbte gerade Linie.
- Der Rest der Probe wandert zu einer zweiten Bindungszone in der Kontrollzone (C) und bildet dort eine zweite rotgefärbte Linie (Positivkontrolle). Unabhängig vom Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* - Antigen bildet sich diese Linie immer in der Kontrollzone (C) und zeigt das korrekte Funktionieren des Tests an.

Lagerung/Verwendbarkeit

1.04148. Singlepath® L 'mono ist bei +2 °C bis +8 °C bis zum auf dem Karton angebrachten Verfalldatum verwendbar.

Materialien zur Testdurchführung

Packungsinhalt

25 Testeinheiten (einzeln in Alufolie verpackt)

Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Anreicherungsmedien, z.B. 1.09628. *Listeria*-Anreicherungsbouillon gepuffert (Basis) nach FDA/BAM 1995 (bLEB), 1.11781. *Listeria*-Selektiv-Anreicherungs-Supplement nach FDA/BAM 1995, 1.10398. FRASER *Listeria*-Selektiv-Anreicherungsbouillon (Basis), 1.10399. FRASER *Listeria* Selektivsupplement, 10823. L-PALCAM-*Listeria*-Selektiv-Anreicherungsbouillon (Basis), 1.12122. PALCAM-*Listeria*-Selektivsupplement nach van Netten et al., 1.10824. UVM-*Listeria*-Selektiv-Anreicherungsbouillon modifiziert, 1.04039. UVM-II Supplement, 1.10493. Hirn-Herz Bouillon (BHI)
- Stomacher/Stomacher-Beutel
- Brutschrank +28–37 °C
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Autoklav
- Einwegpipetten oder Pipette mit Einwegspitzen.
- Einmal-Impfösen

Probenmaterial/Probenanreicherung

Screening Methode

- 25 g feste Probe/ oder 25 ml flüssige Probe mit 225 ml ½ konzentrierter Fraser Bouillon oder bLEB oder L-PALCAM Bouillon oder UVM-I Bouillon mischen und gegebenenfalls mit einem Stomacher homogenisieren.
- 21–24 h bei +28–30 °C oder bei +35–37 °C inkubieren.
- 0,1 ml entnehmen und in 10 ml gepufferte bLEB oder Fraser Bouillon oder L-PALCAM Bouillon oder UVM-II Bouillon überführen.
- 21–44 h bei +28–30 °C oder bei +35–37 °C inkubieren.
- Auf Raumtemperatur (+15–25 °C) abkühlen lassen.

Bestätigungsmethode

- Entnehme 1–3 verdächtige Kolonien vom Isolierungsnährboden (Palcam, Oxford, Chromocult *Listeria*, Chromoplate *Listeria* Agar, etc).
- Suspendiere in 250 µl Hirn-Herz oder CASO oder L-PALCAM oder FRASER oder bLEB Bouillon und mische.
- 1 h bei +37 °C inkubieren.
- Auf Raumtemperatur (+15–25 °C) abkühlen lassen.

Testdurchführung

Vorbereitung der Proben

Die Probenanreicherung und die Tests müssen vor Einsatz eine Temperatur von +15°–25 °C haben.

Durchführung

- Entferne die Alufolie von der benötigten Anzahl von Singlepath® L 'mono. Lege die Tests auf eine ebene Fläche und beschrifte sie zur Probenidentifikation. Allgemeiner Hinweis: Innerhalb 2 Stunden die Tests aufarbeiten!
- Entnehme mit der Pipette (Einwegpipette oder Mikropipette) eine Probe aus dem angereicherten Material (Screening oder Bestätigungsmethode).
- Bringe 5 Tropfen (ca. 150 µl) oder bei Verwendung einer Mikropipette pipettiere 150 µl der Probe in die runde Öffnung der Testvorrichtung.
- Werte nach spätestens 30 Minuten aus.

Auswertung

Der Test ist als funktionsfähig anzusehen, wenn innerhalb von 30 Minuten in der Kontrollzone (C) eine eindeutig rotgefärbte Linie erscheint.

Eine Probe wird als **POSITIV** bewertet, wenn in der Testzone (T) und in der Kontrollzone (C) innerhalb von 30 Minuten eindeutig rotgefärbte Linien erscheinen.

Eine Probe wird als **NEGATIV** bewertet, wenn innerhalb von 30 Minuten in der Testzone (T) keine Linie erscheint und in der Kontrollzone (C) eine eindeutig rotgefärbte Linie angezeigt wird.

Zur Absicherung kann eine positive Probe durch eine akzeptierte Kulturmethode bestätigt werden.

Testspezifische Daten

Nachweisgrenze

Als generelle untere Nachweisgrenze kann je nach Serotyp ein Bereich von ca. 5×10^6 Keimen/ml angenommen werden. Negative Ergebnisse können vorkommen, falls die extrahierte Antigen-Konzentration unter der Testempfindlichkeit bleibt.

Störeinflüsse

Nach den vorliegenden Ergebnissen waren keine Interferenzen von Singlepath® L 'mono mit den zu untersuchenden Lebensmitteln feststellbar. Der Test wurde so adaptiert, dass er mit den bei Material genannten *Listeria* Anreicherungs-nährböden von MERCK einwandfrei funktioniert. Interferenzen mit anderen Selektiv-anreicherungs-nährböden oder Nährböden anderer Hersteller können nicht ausgeschlossen werden.

Singlepath® L 'mono zeigt keinen Nachweis von *Listeria monocytogenes* bei niedrigeren Konzentrationen in rohen Rindfleischproben/Rinderhack oder anderen Lebensmitteln mit hoher Begleitflora.

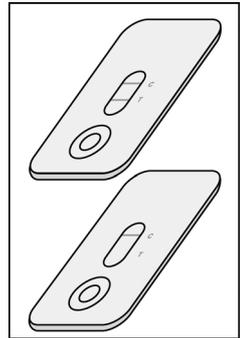
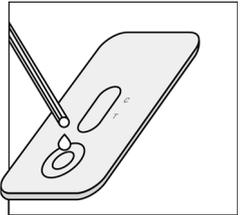
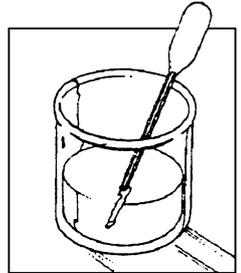
Fehlersuche

Problem

Positivkontrolle in der Kontrollzone (C) wird innerhalb von 30 Minuten nicht angezeigt.

Maßnahmen

Test mit einer neuen Testeinheit wiederholen.



Merck KGaA
64271 Darmstadt, Germany
Tel. + 49 (0)61 51 72-2440
www.merck.de

Version 2006-12

