

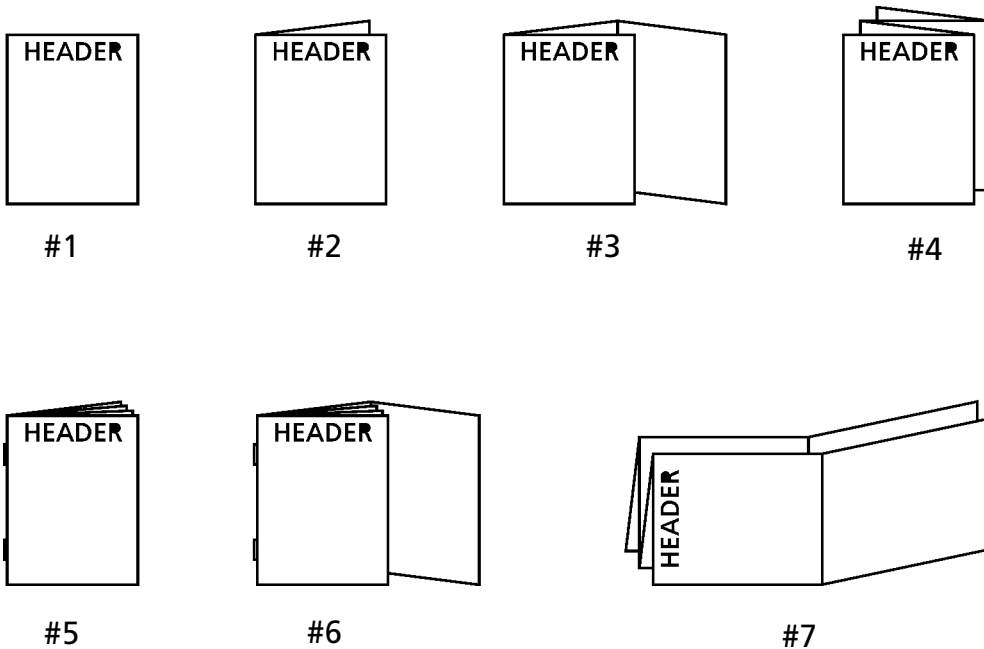
## Revisions

SO 0191-5

Rev from	Rev to	ECO #
0603	0105	3277-05

**Notes:**

1. BD Cat. Number 223001, 223011, 223021, 223031, 223041, 223051, 223061
2. Blank (Sheet) Size : Length: 9"      Width: 36"  
 Number of Pages: 18      Number of Sheets: 1  
 Page Size: Length 9"      Width 4"      Final Folded Size: 2.25" x 4"
3. Style (see illustrations below): #4



4. See Specification Control Number S1471 for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides  Yes     No  
 No. of Colors: 1      PMS #2755 Blue
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	<b>Becton, Dickinson and Company</b> 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number:		Category and Description Package Insert Listeria Antigens and Antisera	Sheet: 1 of 19	A
S1471			Scale: 1:1	

# BD Difco™ Listeria Antisera and Antigens

 S1471  
2005/01

**English:** pages 1 - 4      **Italiano:** pagine 11 - 13  
**Français :** pages 4 - 7      **Español:** páginas 14 - 17  
**Deutsch:** Seiten 7 - 10

See symbol glossary at end of insert. / Viz popis symbolů na konci příbalového letáku. / Se symbolglossaret i slutningen af indlægssedlen. / Zie lijst met symbolen aan het einde van de bijsluiter. / Vaadake sümbolite seletust infolehe lõpus. / Katso pakkauselosteen lopussa olevaa kuvamerkkien sanastoa. / Voir le glossaire des symboles à la fin de la notice. / Siehe Symbol-Erklärungen am Ende der Packungsbeilage. / Δείτε το γλωσσάριο των συμβόλων στο τέλος του ένθετου. / A jelmagyarázat a használati utasítás végén található. / Vedere il glossario dei simboli alla fine del foglio illustrativo. / Zr. informacino lapelio pabaigoje pateikiama simbolių glosarijų. / Se i symbolforklaringen på slutten av produktvedlegget. / Zobacz objaśnienie symboli na końcu ulotki. / Consulte o glossário de símbolos no fim do folheto informativo. / Pozri slovník symbolov na konci letáka. / Consulte el glosario de símbolos al final del prospecto. / Se symbolförteckningen vid slutet av bipacksedeln.

Pokyny vám poskytnú miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar.

## INTENDED USE

**Difco™** Listeria O Antisera Types 1, 4 and Poly are used for identifying *Listeria monocytogenes* in the slide and tube agglutination tests.

**Difco** Listeria O Antigens Types 1 and 4 (Slide and Tube) are used as positive controls in the slide and tube agglutination tests, respectively.

## SUMMARY AND EXPLANATION

First described in 1926 by Murray, Webb and Swann,<sup>1</sup> *Listeria monocytogenes* is a widespread problem in public health and the food industries. This organism can cause human illness and death, particularly in immunocompromised individuals and pregnant women.<sup>2</sup> The first reported foodborne outbreak of listeriosis was in 1985<sup>3</sup> and, since then, microbiological and epidemiological evidence from both sporadic and epidemic cases of listeriosis has shown that the principal route of transmission is via the consumption of foodstuffs contaminated with *L. monocytogenes*.<sup>4</sup>

The organism has been isolated from commercial dairy and other food processing plants and is ubiquitous in nature, being present in a wide-range of unprocessed foods and in soil, sewage, silage and river water.<sup>5</sup>

*Listeria* spp. grow over a pH range of 4.4-9.6 and survive in food products with pH levels outside these parameters.<sup>6</sup> *Listeria* spp. are microaerophilic, gram-positive, asporogenous, non-encapsulated, non-branching, regular, short, motile rods. Motility is most pronounced at 20°C.

Strains of *Listeria* spp. are divided into serotypes based on cellular (O) and flagellar (H) antigens.<sup>7</sup> Thirteen serotypes of *L. monocytogenes* are known. Most human disease is caused by serotypes 1/2a, 1/2b and 4b.<sup>8</sup>

## PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Identification of *L. monocytogenes* includes both biochemical and serological confirmation.

Serological confirmation requires that the microorganism (antigen) react with its corresponding antibody. This *in vitro* reaction produces macroscopic clumping called agglutination. The desired homologous reaction is rapid, does not dissociate (high avidity) and binds strongly (high affinity).

Because a microorganism (antigen) may agglutinate with an antibody produced in response to another species, heterologous reactions are possible. These are characterized as weak in strength or slow in formation. Such unexpected and perhaps unpredictable reactions may lead to some confusion in serological identification. A positive homologous agglutination reaction should support the morphological and biochemical identification of the microorganism.

Agglutination of the somatic antigen in the slide test appears as a firm granular clumping. Homologous reactions occur rapidly and are strong (3+). Heterologous reactions form slowly and are weak.

The agglutination of the somatic antigen in the tube test appears as a loose flocculation that can easily be resuspended. Homologous reactions using Listeria O Antisera should exceed a titer of 2+ at 1:320.

## REAGENTS

**Difco** Listeria O Antisera Types 1, 4 and Poly are lyophilized, polyclonal rabbit antisera containing approximately 0.04% Thimerosal as a preservative. Listeria O Antisera Types 1 and 4 are specific for the respective serotypes of *L. monocytogenes* while Listeria O Antiserum Poly contains agglutinins for *L. monocytogenes* serotypes 1 and 4.

**Difco** Listeria O Antigens Types 1 and 4 (Tube) and (Slide) are suspensions of appropriate *L. monocytogenes* serotypes containing 0.3% formaldehyde as a preservative. When used according to the suggested procedure, the reagents will yield the following:

Reagent	Vial	Number of tests
Listeria O Antiserum	1 mL	10 tube tests or 400 slide tests
Listeria O Antigen (Slide)	5 mL	100 slide tests
Listeria O Antigen (Tube)	25 mL	5 tube tests

#### Warnings and Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use.

The Packaging of This Product Contains Dry Natural Rubber.

Observe aseptic techniques and established precautions against microbiological hazards throughout all procedures. After use, specimens, containers, slides, tubes and other contaminated material must be sterilized by autoclaving. Directions for use should be followed carefully.

**Storage:** Store lyophilized and rehydrated **Difco** Listeria O Antisera at 2-8°C.

Store **Difco** Listeria O Antigen (Slide) and (Tube) at 2-8°C.

Prolonged exposure of reagents to temperatures other than those specified is detrimental to the products.

**Product Deterioration:** The expiration date applies to the product in its intact container when stored as directed. Do not use if the product is caked, discolored or shows other signs of deterioration. Examine antigen vials for agglutination before use. Suspensions with agglutination are not usable and should be discarded. Discard any antiserum that is cloudy or has a precipitate after rehydration or storage.

#### SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

**Clinical specimens:** *Listeria* can be recovered on selective differential media such as McBride Listeria Agar, Oxford Agar, Modified Oxford Agar, LPM Agar or PALCAM Medium. For specific recommendations on isolation of *Listeria* from clinical specimens, consult appropriate references.<sup>8-10</sup> Determine that a pure culture of the microorganism has been obtained and that biochemical test reactions are consistent with the identification of the organism as *L. monocytogenes*. After these criteria are met, serological identification can be performed.

**Food or dairy samples:** *Listeria* can be recovered when samples are processed to recover injured microorganisms and prevent overgrowth of competing microorganisms. Consult appropriate references for recommended procedures for the isolation of *Listeria* from foods.<sup>6,11,12</sup> Having followed an established protocol, isolate a pure culture of the microorganism and confirm that biochemical test reactions are consistent with the identification of the organism as *L. monocytogenes*. After these criteria are met, serological identification can be performed.

#### PROCEDURE

**Materials Provided:** **Difco** Listeria O Antiserum Type 1, **Difco** Listeria O Antiserum Type 4, **Difco** Listeria O Antiserum Poly, **Difco** Listeria O Antigen Type 1 (Slide), **Difco** Listeria O Antigen Type 1 (Tube), **Difco** Listeria O Antigen Type 4 (Slide), **Difco** Listeria O Antigen Type 4 (Tube).

#### Materials Required But Not Provided:

**Slide Test:** **Difco** FA Buffer (Dried), agglutination slides, applicator sticks, water bath (80-100°C), droppers.

**Tube Test:** **Difco** FA Buffer (Dried), McFarland turbidity standard no. 3, culture tubes 12 x 75 mm and rack, serological pipettes, 1 mL, water bath 50°C, refrigerator (2-8°C), formaldehyde.

**Reagent Preparation:** Equilibrate all materials to room temperature before performing the tests. Ensure that all glassware and pipettes are clean and free of residues such as detergents.

**Listeria O Antisera:** To rehydrate, add 1 mL sterile purified water to each vial. Rotate gently to dissolve contents completely.

**Listeria O Antigens** (Slide) and (Tube) are ready to use.

#### Test Procedure

##### Slide Test

1. Rehydrate **Difco** FA Buffer as per label directions.
2. Suspend a loopful of the test isolate growth from a solid noninhibitory agar medium in approximately 5 mL of **Difco** FA Buffer.
3. Heat the organism suspension at 80-100°C (in a water bath) for 1 h.
4. Centrifuge the suspension at 2,000-5,000 RCF for 15-20 min and remove the bulk of the supernatant fluid.
5. Resuspend the organism in the remaining portion of supernatant fluid.
6. Prepare a 1:20 dilution of the desired **Difco** Listeria Antiserum in 0.85% NaCl solution.
7. On an agglutination slide, dispense 1 drop of the desired diluted **Difco** Listeria Antiserum onto each of two separate areas. Dispense 1 drop of **Difco** FA Buffer onto a third area of the same slide. The first drop of antiserum will be used for the test isolate and the second for the positive control. The drop of **Difco** FA Buffer will be used for the negative control.
8. Dispense 1 drop of organism suspension from step 5 to the first drop of antiserum.
9. **Positive control:** Dispense 1 drop of homologous **Difco** Listeria O Antigen (Slide) to the second drop of antiserum.

10. **Negative control:** Dispense 1 drop of organism suspension from step 5 to the drop of **Difco** FA Buffer on the agglutination slide.
11. Rotate the slide for 1-2 min and read for agglutination.

#### Tube Test

1. Suspend a loopful of the test organism from a solid agar medium in formalinized **Difco** FA Buffer (0.3 mL formaldehyde per 300 mL **Difco** FA Buffer). Adjust to a density approximating that of a McFarland turbidity standard no. 3.
2. Prepare a row of 9 culture tubes (12 x 75 mm) for each organism suspension to be tested, including one row for the positive control.
3. Dispense 0.9 mL formalinized **Difco** FA Buffer to the first tube in each row and 0.5 mL to the remaining tubes.
4. Using a 1 mL serological pipette, add 0.1 mL of the desired **Difco** Listeria Antiserum to tube 1 in each row and mix thoroughly. Transfer 0.5 mL from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. In a like manner, continue transferring 0.5 mL through tube 8, discarding 0.5 mL from tube 8 after mixing. Tube 9 is a negative control tube. Upon addition of the test organism suspension, final dilutions will be 1:20 through 1:2560 for tubes 1 through 8, respectively.
5. Add 0.5 mL of the test organism suspension to each of 9 tubes.
6. Add 0.5 mL of an appropriate **Difco** Listeria O Antigen to each of 9 tubes containing antiserum in the positive control row.
7. Shake the rack to mix. Incubate in a 50°C water bath for 2 h. Refrigerate overnight. Read for agglutination the following morning.

**User Quality Control:** At the time of use, test both positive and negative antigen controls to check performance of the antiserum, techniques and methodology. If results of the positive control or negative control are not as described, the test is invalid and results cannot be reported.

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent NCCLS guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

#### RESULTS

##### Slide Test

1. Read and record results as follows:
 

4+	100% agglutination; background is clear to slightly hazy.
3+	75% agglutination; background is slightly cloudy.
2+	50% agglutination; background is moderately cloudy.
1+	25% agglutination; background is cloudy.
-	No agglutination
2. For the test isolate, a 3+ or greater agglutination within 1-2 min is a positive result.
3. A partial (less than 3+) or a delayed agglutination reaction should be considered negative.

##### Tube Test

1. Read and record results as follows:
 

4+	100% agglutination; background is clear to slightly hazy.
3+	75% agglutination; background is slightly cloudy.
2+	50% agglutination; background is moderately cloudy.
1+	25% agglutination; background is cloudy.
-	No agglutination
2. For the test isolate, a positive result is indicated by a 2+ or greater agglutination at 1:320.

#### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Serological techniques employing **Difco** Listeria O Antisera serve as corroborative evidence for the identification of *L. monocytogenes*. Final identification cannot be made without consideration of morphological, serological and biochemical characterization.
2. Excessive heat from external sources (hot bacteriological loop, burner flame, light source, etc.) may prevent making a smooth suspension of the microorganism or cause evaporation or precipitation of the test mixture. False positive reactions may occur.
3. Rough culture isolates occur and will agglutinate spontaneously, causing agglutination of the negative control (autoagglutination). If autoagglutination occurs, the culture is rough and cannot be tested. Subculture to a noninhibitory medium, incubate and test the organism again.
4. Agglutination reactions of 3+ or greater in the slide test are interpreted as positive reactions. Cross-reactions resulting in a 1+ or 2+ agglutination are likely since there are somatic antigens shared among different organisms such as staphylococci, enterococci and *Bacillus* species.<sup>10</sup>
5. Prolonged exposure of reagents to temperatures other than those specified is detrimental to the products.
6. Exposure of Listeria O Antigens to temperatures below 2°C can result in autoagglutination. Antigens must be smooth uniform suspensions. Examine antigen vials for agglutination before use. Suspensions with agglutination are not usable and should be discarded.
7. It is important in this test to use the recommended time and temperature of incubation. Also, care should be taken to make certain that the water bath is in a location free of mechanical vibration.
8. Discard any **Difco** Listeria O Antiserum that is cloudy or has a precipitate after rehydration or storage.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

1. The positive control, using the appropriate *Listeria* O Antigen, should show 3+ or greater agglutination in the slide test.
2. The positive control, using the appropriate *Listeria* O Antigen, should show 2+ or greater agglutination at 1:320 in the tube test.
3. The negative control should show no agglutination.

Sensitivity of **Difco** *Listeria* O Antisera Types 1, 4 and Poly is determined by demonstrating appropriate reactivity in both the slide and tube tests, as defined in the "Results" section using the respective homologous **Difco** *Listeria* O Antigen. Specificity is determined by demonstrating non-reactivity against non-related (heterologous) **Difco** *Listeria* O Antigens.

**AVAILABILITY**

Cat. No.	Description
223001	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> <i>Listeria</i> O Antiserum Type 1, 1 mL
223011	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> <i>Listeria</i> O Antiserum Type 4, 1 mL
223021	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> <i>Listeria</i> O Antiserum Poly, 1 mL
223031	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> <i>Listeria</i> O Antigen Type 1 (Slide), 5 mL
223051	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> <i>Listeria</i> O Antigen Type 1 (Tube), 25 mL
223041	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> <i>Listeria</i> O Antigen Type 4 (Slide), 5 mL
223061	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> <i>Listeria</i> O Antigen Type 4 (Tube), 25 mL
223143	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> FA Buffer, Dried, 6 x 10 g
223142	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> FA Buffer, Dried, 100 g
223141	<b>Difco</b> <sup>TM</sup> FA Buffer, Dried, 10 kg

**REFERENCES**

1. Murray, E.G.D., R.A. Webb and M.B.R. Swann. 1926. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Path. Bact.* 29:407-439.
2. Monk, J.D., R.S. Clavero, L.R. Beuchat, M.P. Doyle and R.E. Brackett. 1994. Irradiation inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in low and high fat, frozen and refrigerated ground beef. *J. Food Prot.* 57:969-974.
3. Wehr, H.M. 1987. *Listeria monocytogenes* – a current dilemma special report. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70:769-772.
4. Bremer, P.J., and C.M. Osborne. 1995. Thermal death times of *Listeria monocytogenes* in green shell mussels (*Perna canaliculus*) prepared for hot smoking. *J. Food Prot.* 58:604-608.
5. Patel, J.R., C.A. Hwang, L.R. Beuchat, M.P. Doyle and R.E. Brackett. 1995. Comparison of oxygen scavengers for their ability to enhance resuscitation of heat injured *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 58:244-250.
6. Ryser, E.T., and C.W. Donnelly. 1992. *Listeria*, p. 343-356. In F.P. Downes and K. Ito (ed.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
7. Seeliger, H.P.R., and K. Hohne. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species, p. 31-49. In T. Bergen and J.R. Norris (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 13. Academic Press, London, England.
8. Bille, J., J. Rocourt and B. Swaminathan. 2003. *Listeria* and *Erysipelothrix*, p. 461-471. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Tenover, M.A. Tenover and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Pezzlo, M. 1994. Aerobic bacteriology, p. 1.0.1.-1.20.47. In H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Forbes, B.A., D.F. Sahn, A.S. Weissfeld and E.A. Trevino. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Mo.
11. Association of Official Analytical Chemists. 2001. *FDA Bacteriological analytical manual online*. <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-mm.html>>.
12. Flowers, R. S., W. Andrews, C. W. Donnelly, and E. Koenig. 1993. Pathogens in milk and milk products. In Marshall, R. T., (ed.), *Standard methods for the examination of dairy products*, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

## **BD Difco *Listeria* Antisera and Antigens**

Français

**APPLICATION**

Les **Difco** *Listeria* O Antisera (sérum anti-*Listeria* O **Difco**) de types 1, 4 et polyvalents s'utilisent pour l'identification des *Listeria monocytogenes* dans les tests d'agglutination sur lame et les essais en tube.

Les **Difco** *Listeria* O Antigens de types 1 et 4 (lame et tube) s'utilisent comme témoins positifs respectivement dans des tests d'agglutination sur lame et des essais en tube.

**RESUME ET EXPLICATION**

Les *Listeria monocytogenes*, décrites pour la première fois en 1926 par Murray, Webb et Swann,<sup>1</sup> constituent, à l'échelle mondiale, un danger pour la santé publique et l'industrie alimentaire. Ce microorganisme peut provoquer des maladies chez l'homme et entraîner la mort, en particulier chez les individus immunocompromis et les femmes enceintes.<sup>2</sup> La première contamination alimentaire par la listériose répertoriée a eu lieu en 1985<sup>3</sup> et, depuis, des preuves microbiologiques et épidémiologiques provenant de cas de listériose à la fois sporadiques et épidémiques, ont montré que la principale voie de transmission passe par la consommation d'aliments contaminés par les *L. monocytogenes*.<sup>4</sup>

Le microorganisme a été isolé dans des usines de produits laitiers et de transformation des produits alimentaires ; il est très répandu dans la nature et se rencontre dans une grande variété d'aliments non transformés ainsi que dans la terre, les eaux usées, le fourrage ensilé et les eaux fluviales<sup>5</sup>.

Les espèces de *Listeria* se développent dans un pH de 4,4 à 9,6 et peuvent survivre dans des produits alimentaires ayant un pH situé en dehors de ces paramètres<sup>6</sup>. Les espèces de *Listeria* sont microaérophiles, gram positif, asporogènes, non encapsulées, non ramifiées, régulières, courtes et sont des bacilles motiles. La motilité est plus prononcée à 20 °C.

Les souches d'espèces de *Listeria* sont divisées en sérotypes en fonction des antigènes cellulaires (O) et flagellaires (H).<sup>7</sup> Treize sérotypes de *L. monocytogenes* sont connus. Chez l'homme, la plupart des maladies sont causées par les sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b.<sup>8</sup>

#### PRINCIPES DE LA METHODE

L'identification des *L. monocytogenes* comprend à la fois la confirmation biochimique et sérologique.

La confirmation sérologique nécessite que le microorganisme (antigène) réagisse à l'anticorps correspondant. Cette réaction *in vitro* entraîne une formation d'agrégats macroscopiques appelée agglutination. La réaction homologue souhaitée est rapide, ne dissocie pas (avidité élevée) et lie fermement (affinité élevée).

Des réactions hétérologues sont possibles car un microorganisme (antigène) peut agglutiner un anticorps produit en réponse à d'autres espèces bactériennes. Elles se caractérisent par une concentration faible et de formation lente. Ces réactions inattendues et, peut-être, imprévues peuvent conduire à une certaine confusion d'identification sérologique. Une réaction d'agglutination homologue positive doit concorder avec l'identification du microorganisme sur la base de ses caractéristiques biochimiques et morphologiques.

L'agglutination de l'antigène somatique dans la lame de test apparaît comme un agrégat granuleux ferme. Les réactions homologues se produisent rapidement et sont élevées (3+). Les réactions hétérologues se forment lentement et sont faibles.

L'agglutination d'antigènes somatiques dans l'essai en tube apparaît comme une floculation lâche qui peut être facilement remise en suspension. Les réactions homologues utilisant des sérums anti-*Listeria* O doivent être supérieures à un titre de 2+ à 1/320.

#### REACTIFS

Les **Difco** *Listeria* O Antisera de types 1, 4 et polyvalents sont des antisérums de lapin polyclonaux lyophilisés, contenant environ 0,04 % de thimérosal comme conservateur. Les sérums anti-*Listeria* O de types 1 et 4 sont spécifiques aux sérotypes respectifs de *L. monocytogenes* alors que le sérum anti-*Listeria* O polyvalent contient des agglutinines des sérotypes 1 et 4 de *L. monocytogenes*.

Les **Difco** *Listeria* O Antigens de types 1 et 4 (tube) et (lame) sont des suspensions des sérotypes appropriés de *L. monocytogenes* contenant 0,3 % de formaldéhyde comme conservateur. Lorsque les réactifs sont utilisés conformément à la procédure suggérée, leur rendement est le suivant :

Réactif	Flacon	Nombre de tests
Sérum anti- <i>Listeria</i> O	1 mL	10 essais en tube ou 400 tests sur lame
Antigène de <i>Listeria</i> O (lame)	5 mL	100 tests sur lame
Antigène de <i>Listeria</i> O (tube)	25 mL	5 essais en tube

#### Avertissements et précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

L'emballage de ce produit contient du caoutchouc naturel sec.

Toujours utiliser des techniques aseptiques et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les échantillons, les récipients, les lames, les tubes et les autres matériels contaminés. Respecter scrupuleusement le mode d'emploi.

**Conservation** : Conserver les **Difco** *Listeria* O Antisera lyophilisés et reconstitués entre 2 et 8 °C.

Conserver le **Difco** *Listeria* O Antigen (lame) et (tube) entre 2 et 8 °C.

L'exposition prolongée des réactifs à des températures autres que les températures spécifiées a un effet adverse sur ceux-ci.

**Détérioration du produit** : La date de péremption s'applique au produit contenu dans son emballage intact et conservé conformément aux instructions. Ne pas utiliser si le produit présente un aspect agglutiné, décoloré ou d'autres signes de détérioration. Examiner les flacons d'antigènes pour observer si une agglutination s'est produite avant de les utiliser. Éliminer systématiquement ceux qui présentent une agglutination. Jeter tout antisérum trouble ou présentant un précipité après réhydratation ou conservation.

#### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

**Echantillons cliniques** : La *Listeria* peut être isolée sur divers milieux différentiels comme une gélose de *Listeria* McBride, une gélose d'Oxford, une gélose modifiée d'Oxford, une gélose LPM ou un milieu PALCAM. Pour obtenir des recommandations spécifiques concernant l'isolation de la *Listeria* dans des échantillons cliniques, consulter les références appropriées.<sup>8-10</sup> Établir qu'une culture pure de microorganismes a été obtenue et que les résultats des tests biochimiques concordent avec l'identification du microorganisme comme des espèces de *L. monocytogenes*. Si ces conditions sont remplies, l'identification sérologique peut être effectuée.

**Echantillons alimentaires ou de produits laitiers** : La *Listeria* peut être isolée lorsque des échantillons sont traités pour isoler des microorganismes lésés et empêcher une croissance excessive des microorganismes concurrents. Consulter les références appropriées pour obtenir les procédures recommandées pour l'isolation de la *Listeria* dans l'alimentation.<sup>6,11,12</sup> Après avoir suivi un protocole établi, isoler une culture pure du microorganisme et confirmer que les réactions au test biochimique concordent avec l'identification du microorganisme comme étant des *L. monocytogenes*. Si ces conditions sont remplies, l'identification sérologique peut être effectuée.

#### METHODE

**Matériaux fournis** : **Difco** *Listeria* O Antiserum Type 1, **Difco** *Listeria* O Antiserum Type 4, **Difco** *Listeria* O Antiserum Poly, **Difco** *Listeria* O Antigen Type 1 (lame), **Difco** *Listeria* O Antigen Type 1 (Tube), **Difco** *Listeria* O Antigen Type 4 (lame), **Difco** *Listeria* O Antigen Type 4 (Tube).

**Matériaux requis mais non fournis :**

**Test sur lame :** Difco FA Buffer ([tampon FA Difco] séché), lames à agglutination, écouvillons, bain-marie (entre 80 et 100 °C), compte-gouttes.

**Tube à essai :** Difco FA Buffer (séché), norme de turbidité McFarland n° 3, tubes à culture 12 x 75 mm et portoir, pipettes sérologiques, 1 mL, bain-marie à 50 °C, réfrigérateur (entre 2 et 8 °C), formaldéhyde.

**Préparation du réactif :** Laisser tous les matériels s'équilibrer à température ambiante avant d'effectuer les tests. S'assurer que la verrerie et les pipettes utilisées sont propres et exemptes de résidus, comme des traces de détergent par exemple.

**Sérums anti-listeria O :** Pour reconstituer, ajouter 1 mL d'eau purifiée stérile à chaque flacon. Retourner doucement plusieurs fois pour dissoudre parfaitement le contenu.

**Les antigènes de listeria O** (lame) et (tube) sont prêts à l'emploi.

**Mode opératoire du test****Test sur lame**

1. Reconstituer les **Difco** FA Buffer conformément aux instructions de l'étiquette.
2. Mettre en suspension une pleine anse d'isolat à tester prélevé sur une gélose non inhibitrice dans environ 5 mL de **Difco** FA Buffer.
3. Chauffer la suspension du microorganisme entre 80 et 100 °C pendant une heure (dans un bain-marie).
4. Centrifuger la suspension entre 2000 et 5000 RCF pendant 15 à 20 min et retirer la majeure partie du liquide surnageant.
5. Remettre le microorganisme en suspension dans la partie restante du liquide surnageant.
6. Préparer une dilution à 1/20 dans une solution de NaCl à 0,85 % du **Difco** Listeria Antiserum souhaité.
7. Sur une lame à agglutination, distribuer une goutte du **Difco** Listeria Antiserum souhaité dilué dans chacune des deux zones séparées. Distribuer une goutte du **Difco** FA Buffer dans une troisième zone de la même lame. La première goutte d'antisérum sera utilisée pour l'isolat à tester et la deuxième pour le témoin positif. La goutte de **Difco** FA Buffer sera utilisée pour le témoin négatif.
8. Distribuer une goutte de la suspension du microorganisme prélevée à l'étape 5 à la première goutte de l'antisérum.
9. **Contrôle positif :** Distribuer une goutte de **Difco** Listeria O Antigen (lame) homologue à la seconde goutte d'antisérum.
10. **Contrôle négatif :** Distribuer une goutte de la suspension du microorganisme prélevée à l'étape 5 à la goutte du **Difco** FA Buffer sur la lame à agglutination.
11. Agiter pendant une à deux minutes par un mouvement de rotation de la lame, puis observer s'il se produit une réaction d'agglutination.

**Essai en tube**

1. Mettre en suspension une pleine anse de microorganisme à tester prélevé sur une gélose solide dans un **Difco** FA Buffer formolé (0,3 mL de formaldéhyde pour 300 mL de Difco FA Buffer). Ajuster à une densité s'approchant de la norme de turbidité de McFarland n° 3.
2. Préparer une rangée de neuf tubes à culture (12 x 75 mm) pour chaque suspension de microorganisme à tester, y compris une rangée du témoin positif.
3. Distribuer 0,9 mL de **Difco** FA Buffer formolé dans le premier tube de chaque rangée et 0,5 mL dans les tubes restants.
4. A l'aide d'une pipette sérologique de 1 mL, ajouter 0,1 mL du **Difco** Listeria Antiserum souhaité au tube n° 1 de chaque rangée et bien mélanger. Transférer 0,5 mL du tube n° 1 au tube n° 2 et bien mélanger. Procéder ainsi pour transférer 0,5 mL jusqu'au tube n° 8, puis éliminer 0,5 mL du tube n° 8 après mélange. Le tube n° 9 est un tube témoin négatif. Lorsque les suspensions de microorganismes à tester ont été ajoutées, les dilutions finales s'échelonnent respectivement de 1/20 à 1/2560 pour les tubes n° 1 à 8.
5. Ajouter 0,5 mL de la suspension de microorganisme à tester à chacun des 9 tubes.
6. Ajouter 0,5 mL du **Difco** Listeria O Antigen approprié à chacun des neuf tubes contenant l'antisérum dans la rangée du témoin positif.
7. Mélanger en secouant le portoir. Incuber au bain-marie à 50 °C pendant 2 h. Réfrigérer toute la nuit. Le lendemain matin, observer s'il se produit une réaction d'agglutination.

**Contrôle de qualité par l'utilisateur:** Tester dans la même série des antigènes de contrôles positifs et négatifs pour contrôler les performances de l'antisérum, des techniques et de la méthodologie. Si les résultats du témoin positif ou du témoin négatif ne sont pas comme décrit, le test est non valide et les résultats ne peuvent pas être rapportés.

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives de la NCCLS et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

**RESULTATS****Test sur lame**

1. Lire et reporter les résultats comme suit :
 

4+	100 % d'agglutination ; fond clair à légèrement voilé.
3+	75 % d'agglutination ; fond légèrement trouble.
2+	50 % d'agglutination ; fond moyennement trouble.
1+	25 % d'agglutination ; fond trouble.
-	Absence d'agglutination.
2. S'agissant de l'isolat à tester, une agglutination de niveau 3+ ou supérieur obtenue en une à deux minutes constitue un résultat positif.
3. Une agglutination partielle (moins de 3+) ou retardée doit être considérée comme étant négative.



**Essai en tube**

1. Lire et reporter les résultats comme suit :

4+	100 % d'agglutination ; fond clair à légèrement voilé.
3+	75 % d'agglutination ; fond légèrement trouble.
2+	50 % d'agglutination ; fond moyennement trouble.
1+	25 % d'agglutination ; fond trouble.
-	Absence d'agglutination.

2. Pour l'isolat à tester, un résultat positif est indiqué par une agglutination de 2+ ou supérieure à 1/320.

**LIMITES DE LA PROCEDURE**

- Les techniques sérologiques employant des **Difco** Listeria O Antisera servent de tests d'identification de confirmation des *L. monocytogenes*. L'identification finale ne peut pas être effectuée sans prendre en considération la caractérisation morphologique, sérologique et biochimique.
- Une source de chaleur externe excessive (anse d'ensemencement brûlante, flamme du bec bunsen, source lumineuse, etc.) peut empêcher d'obtenir une suspension fluide du microorganisme ou entraîner l'évaporation ou la précipitation du mélange réactionnel. Des faux positifs risquent d'être obtenus.
- Des isolats de culture non purs sont parfois obtenus et provoquent une agglutination spontanée entraînant l'agglutination des témoins négatifs (autoagglutination). Si une autoagglutination se produit, la culture n'est pas pure et ne peut pas être testée. Répliquer sur milieu non-inhibiteur, incubé et retester le microorganisme.
- Les réactions d'agglutination de 3+ ou supérieures sont interprétées comme des réactions positives. Les réactions croisées résultant d'une agglutination de 1+ ou 2+ sont plus probables étant donné que des antigènes somatiques sont partagés entre différents organismes comme les staphylocoques, les entérocoques et les espèces *Bacillus*.<sup>10</sup>
- L'exposition prolongée des réactifs à des températures autres que les températures spécifiées a un effet adverse sur ceux-ci.
- L'exposition des antigènes de Listeria O à des températures inférieures à 2 °C peut entraîner une autoagglutination. Les antigènes doivent constituer des suspensions lisses uniformes. Examiner les flacons d'antigènes pour observer si une agglutination s'est produite avant de les utiliser. Éliminer systématiquement ceux qui présentent une agglutination.
- Il est important pour ce test de respecter la durée et la température d'incubation recommandées. En outre, s'assurer que le bain-marie est placé à l'abri de vibrations mécaniques.
- Jeter tout **Difco** Listeria O Antiserum trouble ou présentant un précipité après réhydratation ou conservation.

**CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES**

- Le témoin positif, utilisant l'antigène de Listeria O approprié, doit présenter une agglutination de 3+ ou supérieure dans le test sur lame.
- Le témoin positif, utilisant l'antigène de Listeria O approprié, doit présenter une agglutination de 2+ ou supérieure dans l'essai en tube à 1/320.
- Le témoin négatif ne doit présenter aucune agglutination.

La sensibilité des **Difco** Listeria O Antisera de types 1, 4 et polyvalents se détermine en démontrant une réactivité appropriée à la fois dans les tests sur lame et les essais en tube, comme défini dans la section " Résultats ", à l'aide du **Difco** Listeria O Antigen homologue. La spécificité est déterminée en démontrant une absence de réactivité contre les groupes non-apparentés des **Difco** Listeria O Antigens (hétérologues).

**CONDITIONNEMENT**

No réf.	Description
223001	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Type 1, 1 mL
223011	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Type 4, 1 mL
223021	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Poly, 1 mL
223031	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Type 1 (lame), 5 mL
223051	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Type 1 (tube), 25 mL
223041	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Type 4 (lame), 5 mL
223061	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Type 4 (tube), 25 mL
223143	<b>Difco</b> FA Buffer, séché, 6 x 10 g
223142	<b>Difco</b> FA Buffer, séché, 100 g
223141	<b>Difco</b> FA Buffer, séché, 10 kg

**BIBLIOGRAPHIE** : voir la rubrique "References" du texte anglais.

## **BD Difco Listeria** **Antisera and Antigens**

Deutsch

**VERWENDUNGSZWECK**

**Difco** Listeria O Antisera, Typen 1, 4 und Poly dienen zur Identifizierung von *Listeria monocytogenes* bei Objektträger- und Röhrchen-Agglutinationstests.

**Difco** Listeria O Antigens, Typen 1 und 4 (Slide und Tube) dienen als positive Kontrollen jeweils bei Objektträger- und Röhrchen-Agglutinationstests.



## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

*Listeria monocytogenes* wurden das erste Mal 1926 von Murray, Webb und Swann,<sup>1</sup> beschrieben und stellen ein weit verbreitetes Problem für die öffentliche Gesundheit und die Nahrungsmittelindustrie dar. Dieser Organismus kann beim Menschen Krankheiten und Tod verursachen, besonders bei immungeschwächten Personen und schwangeren Frauen.<sup>2</sup> Der erste dokumentierte Ausbruch von Listeriose in Nahrungsmitteln fand 1985<sup>3</sup> statt. Seither haben mikrobiologische und epidemiologische Belege aus sowohl sporadischen wie auch epidemischen Listeriosefällen gezeigt, dass die Hauptübertragung durch die Aufnahme von mit *L. monocytogenes* kontaminierten Nahrungsmitteln erfolgt.<sup>4</sup>

Der Organismus wurde von einer Handelsmolkerei und anderen Nahrungsmittel verarbeitenden Anlagen isoliert und ist allgegenwärtig. Er ist in einer Vielzahl unverarbeiteter Nahrungsmittel vorhanden sowie im Boden, im Abwasser, in Silage und Flusswasser.<sup>5</sup>

*Listeria* spp. wachsen in einem pH-Bereich von 4,4 - 9,6 und überleben in Nahrungsmittelprodukten mit pH-Werten außerhalb dieser Parameter.<sup>6</sup> *Listeria* spp. sind mikroaerophile, grampositive, nichtkapselnde, nichtverzweigende, reguläre, kurze, motile Stäbchen, die keine Sporen bilden. Die Motilität ist am ausgeprägtesten bei 20 °C. *Listeria* spp.-Stämme sind untergliedert in Serumtypen basierend auf zellulären (O) und flagellaren (H) Antigenen.<sup>7</sup> Es sind dreizehn (13) *L. monocytogenes*-Serumtypen bekannt. Die meisten menschlichen Krankheiten werden von den Serumtypen 1/2a, 1/2b und 4b verursacht.<sup>8</sup>

## VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Die Identifikation von *L. monocytogenes* umfasst sowohl den biochemischen als auch den serologischen Nachweis.

Für den serologischen Nachweis ist es erforderlich, dass der Mikroorganismus (das Antigen) mit seinem entsprechenden Antikörper reagiert. Bei dieser *In-vitro*-Reaktion kommt es zu makroskopischen Verklumpungen, der sogenannten Agglutination. Die gewünschte homologe Reaktion sollte rasch, ohne Dissoziation (hohe Avidität) und mit starker Bindung (hoher Affinität) erfolgen.

Da ein Mikroorganismus (Antigen) auch mit Antikörpern agglutinieren kann, die als Reaktion auf eine andere Spezies gebildet wurden, sind heterologe Reaktionen möglich. Diese zeichnen sich durch einen langsamen und schwachen Reaktionsverlauf aus. Derartige unerwartete und evtl. unvorhersehbare Reaktionen können bei der serologischen Identifizierung einige Verwirrung stiften. Eine positive homologe Agglutinationsreaktion sollte die morphologische und biochemische Identifizierung des Mikroorganismus unterstützen.

Die Agglutination des somatischen Antigens beim Objektträger zeigt sich als fester, körniger Klumpen. Homologe Reaktionen laufen schnell und heftig ab (3+). Heterologe Reaktionen laufen langsam und schwach ab.

Die Agglutination des somatischen Antigens beim Röhrchentest zeigt sich als lockere Flockenbildung, die sich leicht erneut suspendieren lässt. Homologe Reaktionen mit Difco Listeria O Antisera sollten einen Titer von 2+ bei einer Verdünnung von 1 : 320 übersteigen.

## REAGENZEN

**Difco** Listeria O Antisera, Typen 1, 4 und Poly sind stabile, lyophilisierte, polyklonale Kaninchen-Antisera und enthalten ca. 0,04 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Listeria O Antisera, Typen 1 und 4 sind für die entsprechenden *L. monocytogenes*-Serumtypen spezifisch, wohingegen Listeria O Antiserum Poly Agglutinine für die *L. monocytogenes*-Serumtypen 1 und 4 enthält.

**Difco** Listeria O Antigens, Typen 1 und 4 (Tube und Slide) sind Suspensionen von geeigneten *L. monocytogenes*-Serumtypen, die 0,3 % Formaldehyd als Konservierungsmittel enthalten. Wenn die Reagenzien gemäß der empfohlenen Vorgehensweise verwendet werden, können folgende Tests durchgeführt werden:

Reagenz	Fläschchen	Anzahl Tests
Listeria O Antiserum	1 mL	10 Röhrchentests oder 400 Objektträgertests
Listeria O Antigen (Slide)	5 mL	100 Objektträgertests
Listeria O Antigen (Tube)	25 mL	5 Röhrchentests

## Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

*In-vitro*-Diagnostikum.

Die Verpackung dieses Produkts enthält Naturkautschuk (getrocknet).

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen und Verwendung aseptischer Techniken erfolgen. Nach Gebrauch sind Proben, Behälter, Objektträger, Röhrchen und sonstiges kontaminiertes Material im Autoklaven zu sterilisieren. Die Gebrauchsanleitung ist sorgfältig zu befolgen.

**Aufbewahrung:** Lyophilisierte und rehydrierte Difco Listeria O Antisera bei 2 bis 8 °C aufbewahren.

**Difco** Listeria O Antigen (Slide und Tube) bei 2 - 8 °C aufbewahren.

Werden die Reagenzien längere Zeit anderen Temperaturen ausgesetzt als vorgeschrieben, ist dies den Produkten abträglich.

**Haltbarkeit des Produkts:** Das angegebene Verfallsdatum gilt für das in der ungeöffneten Packung aufbewahrte Produkt bei Einhaltung der Lagervorschriften. Zusammenklebendes, verfärbtes oder sonstige Verfallsanzeichen aufweisendes Produkt nicht verwenden. Die Antigenfläschchen vor Gebrauch auf Agglutination prüfen. Suspensionen mit Agglutination sind unbrauchbar und zu verwerfen. Wolkige Antisera oder solche, die nach Rehydrierung oder Aufbewahrung Niederschläge zeigen, sind zu entsorgen.

## PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

**Klinische Proben:** *Listeria* kann aus selektiven differenzierten Medien, wie beispielsweise McBride Listeria Agar, Oxford Agar, Modified Oxford Agar, LPM Agar oder PALCAM Medium gewonnen werden. Für spezifische Empfehlungen zur Isolierung von *Listeria* aus klinischen Proben einschlägige Quellen konsultieren.<sup>8-10</sup> Sicherstellen, dass eine Reinkultur des Mikroorganismus gewonnen wurde und die biochemischen Testreaktionen der Identifizierung des Organismus als *L. monocytogenes* entsprechen. Wenn diese Kriterien erfüllt sind, kann die serologische Identifizierung durchgeführt werden.

**Nahrungsmittel- oder Milchproben:** *Listeria* kann gewonnen werden, wenn bei den Proben das Überwachsen durch konkurrierende Mikroorganismen verhindert wird und die Wiedergewinnung verletzter Mikroorganismen gewährleistet ist. Für spezifische Empfehlungen zur Isolierung von *Listeria* aus Nahrungsmitteln einschlägige Quellen konsultieren.<sup>6,11,12</sup> Nach dem Beachten eines etablierten Protokolls eine Reinkultur des Mikroorganismus isolieren und sicherstellen, dass die biochemischen Testreaktionen der Identifizierung des Organismus als *L. monocytogenes* entsprechen. Wenn diese Kriterien erfüllt sind, kann die serologische Identifizierung durchgeführt werden.

#### VERFAHREN

**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** **Difco** Listeria O Antiserum Type 1, **Difco** Listeria O Antiserum Type 4, **Difco** Listeria O Antiserum Poly, **Difco** Listeria O Antigen Type 1 (Slide), **Difco** Listeria O Antigen Type 1 (Tube), **Difco** Listeria O Antigen Type 4 (Slide), **Difco** Listeria O Antigen Type 4 (Tube).

**Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:**

**Objektträger:** **Difco** FA Buffer (Dried), Agglutinations-Objektträger, Applikatorstäbchen, Wasserbad (80 - 100 °C), Pipetten.

**Röhrchentest:** **Difco** FA Buffer (Dried), McFarland-Trübheitsstandard Nr. 3, Kulturröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenständer, serologische Pipetten 1 mL, Wasserbad 50 °C, Gefrierschrank (2 - 8 °C), Formaldehyd.

**Vorbereitung der Reagenzien:** Vor der Testdurchführung alle Materialien Zimmertemperatur annehmen lassen. Sicherstellen, dass alle gläsernen Utensilien und Pipetten sauber sind und keine Rückstände aufweisen (wie z.B. von Reinigungsmitteln).

**Listeria O Antisera:** Zum Rehydrieren in jedes Fläschchen 1 mL steriles, destilliertes Wasser geben. Zur vollständigen Auflösung des Inhalts Röhrchen vorsichtig drehen.

**Listeria O Antigens** (Slide und Tube) sind gebrauchsfertig.

#### Testverfahren

##### Objektträgertest

1. **Difco** FA Buffer gemäß den Anweisungen auf dem Etikett rehydrieren.
2. Eine Öse voll Testisolat-Wachstum eines festen, nichthemmenden Agarmediums in ca. 5 mL **Difco** FA Buffer suspendieren.
3. Die Organismussuspension 1 h lang (im Wasserbad) bei 80 - 100 °C erhitzen.
4. Die Suspension bei 2000 bis 5000/Min 15 bis 20 min suspendieren und den Flüssigkeitsüberstand dann entfernen.
5. Den Organismus in verbleibenden Rest des Flüssigkeitsüberstands nochmals suspendieren.
6. Eine Verdünnung von 1 : 20 des gewünschten **Difco** Listeria Antiserum in 0,85%iger NaCl-Lösung vorbereiten.
7. 1 Tropfen des gewünschten, verdünnten **Difco** Listeria Antiserum auf jeweils einen separaten Bereich auf dem Agglutinations-Objektträger geben. 1 Tropfen **Difco** FA Buffer auf einen dritten Bereich auf dem selben Objektträger geben. Der erste Antiserumtropfen wird für das Testisolat verwendet; der zweite für die positive Kontrolle. Der Tropfen **Difco** FA Buffer dient als negative Kontrolle.
8. 1 Tropfen der Organismussuspension aus Schritt 5 dem ersten Antiserumtropfen hinzugeben.
9. **Positive Kontrolle:** Einen Tropfen homologen **Difco** Listeria O Antigen (Slide) dem zweiten Tropfen Antiserum hinzufügen.
10. **Negative Kontrolle:** Einen Tropfen der Organismussuspension aus Schritt 5 zu dem Tropfen **Difco** FA Buffer auf dem Agglutinations-Objektträger geben.
11. Den Objektträger 1 bis 2 min lang drehen und anschließend im Hinblick auf Agglutination begutachten.

##### Röhrchentest

1. Eine Öse voll Testorganismus von einem festen Agarmedium in formalisierten **Difco** FA Buffer (0,3 mL Formaldehyd pro 300 mL **Difco** FA Buffer) suspendieren. Auf eine Dichte anpassen, die ungefähr der des McFarland-Trübheitsstandards Nr. 3 entspricht.
2. Eine Reihe mit 9 Kulturröhrchen (12 x 75 mm) für jede zu testenden Organismussuspension vorbereiten, einschließlich einer Reihe für die positive Kontrolle.
3. In das erste Röhrchen jeder Reihe formalisierten 0,9 mL **Difco** FA Buffer geben, in das zweite und jedes weitere Röhrchen jeder Reihe 0,5 mL.
4. Mit einer serologischen 1-mL-Pipette, 0,1 mL **Difco** Listeria Antiserum in das Röhrchen 1 jeder Reihe einbringen und gut durchmischen. 0,5 mL Flüssigkeit von Röhrchen 1 in Röhrchen 2 verbringen und gut durchmischen. In gleicher Weise jeweils 0,5 mL in das nächste Röhrchen übertragen, bis Röhrchen 8 erreicht ist. Aus Röhrchen 8 nach dem Durchmischen 0,5 mL der Flüssigkeit abgießen. Röhrchen 9 ist ein Röhrchen mit negativer Kontrolle. Nach Hinzufügen der Mikroorganismen-Testsuspension beträgt in Röhrchen 1 bis 8 die Endkonzentration jeweils 1 : 20 bis 1 : 2560.
5. Zu jedem der 9 Röhrchen 0,5 mL der Mikroorganismen-Testsuspension hinzufügen.
6. Zu jedem der 9 Fläschchen mit dem Antiserum in der Reihe mit der positiven Kontrolle 0,5 mL eines geeigneten **Difco** Listeria O Antigen zugeben.
7. Zum Durchmischen Röhrchenständer schütteln. 2 Stunden lang in einem Wasserbad bei 50 °C inkubieren. Über Nacht einfrieren. Am nächsten Morgen auf Agglutination überprüfen.

**Qualitätssicherung durch den Anwender:** Bei Anwendung sowohl positive als auch negative Antigen-Kontrollen durchführen, um die Leistung der Antisera, die Techniken und die Methodik zu überprüfen. Wenn die Ergebnisse der positiven Kontrolle oder negativen Kontrolle nicht wie beschrieben ausfallen, ist der Test ungültig und die Ergebnisse können nicht gemeldet werden.

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten NCCLS-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

#### ERGEBNISSE

##### Objekträgeretest

1. Die Ergebnisse werden folgendermaßen abgelesen und dokumentiert:

4+	100%ige Agglutination; Hintergrund klar bis leicht trüb
3+	75%ige Agglutination; Hintergrund leicht wolkig
2+	50%ige Agglutination; Hintergrund mäßig wolkig
1+	25%ige Agglutination; Hintergrund wolkig
-	Keine Agglutination

2. Bei dem Testisolat stellt eine innerhalb von 1 bis 2 min erfolgende Agglutination des Grades 3+ oder stärker ein positives Ergebnis dar.  
3. Eine teilweise (weniger als 3+) oder verzögerte Agglutinationsreaktion ist als negativ zu bewerten.

##### Röhrchentest

1. Die Ergebnisse werden folgendermaßen abgelesen und dokumentiert:

4+	100%ige Agglutination; Hintergrund klar bis leicht trüb
3+	75%ige Agglutination; Hintergrund leicht wolkig
2+	50%ige Agglutination; Hintergrund mäßig wolkig
1+	25%ige Agglutination; Hintergrund wolkig
-	Keine Agglutination

2. Bei dem Testisolat stellt eine Agglutination der Stärke 2+ oder stärker bei einer Verdünnung von 1 : 320 ein positives Ergebnis dar.

#### VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

- Serologische Techniken unter Verwendung von **Difco** Listeria O Antisera liefern nur einen zusätzlichen Hinweis auf das Vorliegen von *L. monocytogenes*. Für die endgültige Identifizierung müssen morphologische, serologische und biochemische Eigenschaften berücksichtigt werden.
- Übermäßige Wärme aus externen Quellen (heiße bakteriologische Öse, Brennerflamme, Lichtquelle o. ä.) kann die glatte Suspension des Mikroorganismus verhindern oder zum Verdunsten oder Ausfällen des Testgemischs führen. Es kann zu falsch positiven Reaktionen kommen.
- Grobe Kulturoisolate sind möglich; sie agglutinieren spontan und führen zur Agglutination der negativen Kontrolle (Autoagglutination). Falls es zu einer Autoagglutination kommt, ist die Kultur grob und nicht zum Testen geeignet. Eine Subkultur auf einem nichthemmenden Medium anlegen, inkubieren, und den Organismus erneut testen.
- Agglutinationsreaktionen von 3+ oder mehr im Objekträgeretest werden als positive Reaktionen gewertet. Kreuzreaktionen in einer Agglutination der Stärke 1+ oder 2+ sind wahrscheinlich, da somatische Antigene von verschiedenen Organismen, wie beispielsweise Staphylokokken, Enterokokken und *Bacillus*-Spezies<sup>10</sup>, gemeinsam verbraucht werden.
- Werden die Reagenzien längere Zeit anderen Temperaturen ausgesetzt als vorgeschrieben, ist dies den Produkten abträglich.
- Durch Einwirkung von Temperaturen unter 2 °C auf Listeria O Antigen kann es zu einer Autoagglutination kommen. Antigene müssen eine glatte, gleichmäßige Suspension ergeben. Die Antigenfläschchen vor Gebrauch auf Agglutination prüfen. Suspensionen mit Agglutination sind unbrauchbar und zu verwerfen.
- Bei diesem Test ist es wichtig, sich an die empfohlenen Inkubationszeiten und temperaturen zu halten. Darüber hinaus ist darauf zu achten, dass das Wasserbad keinen mechanischen Vibrationen ausgesetzt wird.
- Wolkiges **Difco** Listeria O Antiserum oder solches, das nach dem Rehydrieren oder der Aufbewahrung Niederschläge zeigt, ist zu entsorgen.

#### LEISTUNGSMERKMALE

- Die positive Kontrolle sollte im Objekträgeretest, unter Verwendung des entsprechenden Listeria O Antigen, eine Agglutination des Grades 3+ oder stärker aufweisen.
- Die positive Kontrolle sollte im Röhrchentest, unter Verwendung des entsprechenden Listeria O Antigen, eine Agglutination des Grades 2+ oder stärker bei einer Verdünnung von 1 : 320 aufweisen.
- Die negative Kontrolle darf keine Agglutination aufweisen.

Die Sensibilität von **Difco** Listeria O Antisera, Typ 1, 4 und Poly wird durch Nachweis der entsprechenden Reaktivität im Objekträger- und Röhrchentest (wie im Abschnitt "Ergebnisse" beschrieben) mithilfe des entsprechenden homologen **Difco** Listeria O Antigen bestimmt. Die Spezifität wird durch Nachweis der Nichtreaktivität gegenüber nicht-verwandten (heterologen) **Difco** Listeria O Antigen bestimmt.

#### LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
223001	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Type 1, 1 mL
223011	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Type 4, 1 mL
223021	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Poly, 1 mL
223031	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Type 1 (Slide), 5 mL
223051	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Type 1 (Tube), 25 mL
223041	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Type 4 (Slide), 5 mL
223061	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Type 4 (Tube), 25 mL
223143	<b>Difco</b> FA Buffer, Dried, 6 x 10 g
223142	<b>Difco</b> FA Buffer, Dried, 100 g
223141	<b>Difco</b> FA Buffer, Dried, 10 kg

LITERATURNACHWEIS: S. "References" im englischen Text.

## **BD Difco Listeria** **Antisera and Antigens**

Italiano

**USO PREVISTO**

**Difco** Listeria O Antisera Tipi 1, 4 e Poly sono utilizzati per l'identificazione di *Listeria monocytogenes* nei test di agglutinazione su vetrino ed in provetta.

**Difco** Listeria O Antigeni Tipi 1 e 4 (Vetrino e Provetta) sono utilizzati come controlli positivi rispettivamente nei test di agglutinazione su vetrino ed in provetta.

**SOMMARIO E SPIEGAZIONE**

Descritta per la prima volta nel 1926 da Murray, Webb e Swann,<sup>1</sup> *Listeria monocytogenes* è una problematica diffusa che affligge l'igiene pubblica e i settori alimentari. Questo organismo può causare la malattia e la morte per gli esseri umani, in particolare per gli individui immunocompromessi e le donne in gravidanza.<sup>2</sup> La prima epidemia di listeriosi veicolata da alimenti è stata registrata nel 1985<sup>3</sup> e, da allora, la dimostrazione microbiologica ed epidemiologica derivante da casi sporadici ed epidemici di listeriosi ha evidenziato che la principale modalità di trasmissione è il consumo di generi alimentari contaminati da *L. monocytogenes*.<sup>4</sup>

L'organismo è stato isolato da caseifici commerciali e altri impianti di trasformazione alimentare ed è onnipresente in natura, essendo diffuso in una grande varietà di alimenti non trasformati nonché nel suolo, negli scarichi fognari, nel foraggio stoccato e nelle acque fluviali.<sup>5</sup>

Le specie *Listeria* crescono in presenza di una gamma di pH che varia tra 4,4 e 9,6 e sopravvive in prodotti alimentari con livelli di pH esterni ai parametri citati.<sup>6</sup> (Le specie *Listeria*) Sono microrganismi a bastoncello mobili, corti, regolari, microaerofili, gram-positivi, asporigeni, non-incapsulati, non-ramificanti. La mobilità è maggiormente accentuata a 20 °C.

Le famiglie appartenenti alle specie *Listeria* si suddividono in sierotipi basati su antigeni cellulari (O) e flagellati (H).<sup>7</sup> Sono noti tredici sierotipi di *L. monocytogenes*. La maggior parte dei disturbi negli esseri umani è provocata dai sierotipi 1/2a, 1/2b e 4b.<sup>8</sup>

**PRINCIPI DELLA PROCEDURA**

L'identificazione di *L. monocytogenes* comprende la conferma biochimica e sierologica. La conferma sierologica richiede che il microrganismo (antigene) reagisca con l'anticorpo corrispondente. Questa reazione *in vitro* produce grumi macroscopici, un fenomeno chiamato agglutinazione. La reazione tra omologhi desiderata avviene con rapidità, non è dissociante (elevata avidità) e fortemente legante (elevata affinità).

Esiste la possibilità di reazioni tra eterologhi, in quanto un microrganismo (antigene) può agglutinare un anticorpo prodotto in risposta ad alcune altre specie. Queste sono caratterizzate da scarsa resistenza e formazione lenta. Simili reazioni, impreviste e, forse, imprevedibili, possono ingenerare confusione nel riconoscimento sierologico. Una reazione di agglutinazione positiva tra omologhi deve essere consistente con l'identificazione morfologica e biochimica del microrganismo.

Nella prova in vetrino l'agglutinazione somatica appare come un consistente grumo granulare. Le reazioni tra omologhi hanno un rapido svolgimento e sono resistenti (3+). Le reazioni tra eterologhi sono deboli e la loro formazione è lenta.

L'agglutinazione dell'antigene somatico nel test in provetta appare come una flocculazione lenta facilmente risospesibile. Le reazioni tra omologhi con Listeria O Antisera devono superare un titolo di 2+ a 1:320.

**REAGENTI**

**Difco** Listeria O Antisera Tipi 1, 4 e Poly sono antisieri policlonali di coniglio liofilizzati, contenenti circa 0,04% di Timerosal come conservante. Listeria O Antisera Tipi 1 e 4 sono specifici per i rispettivi sierotipi di *L. monocytogenes* mentre Listeria O Antiserum Poly contiene agglutinine per i sierotipi 1 e 4 di *L. monocytogenes*.

**Difco** Listeria O Antigeni Tipi 1 e 4 (Provetta) e (Vetrino) sono sospensioni di sierotipi di *L. monocytogenes* adatti contenenti 0,3% di formaldeide come conservante. Se utilizzati secondo la procedura prescritta, i reagenti avranno il seguente rendimento:

Reagente	Flacone	Numero di test
Listeria O Antiserum	1 mL	10 test in provetta o 400 test su vetrino
Listeria O Antigen (Slide)	5 mL	100 test su vetrino
Listeria O Antigen (Tube)	25 mL	5 test in provetta

**Avvertenze e precauzioni**

Per uso diagnostico *in vitro*.

La confezione di questo prodotto contiene gomma naturale secca.

Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. Dopo l'uso, sterilizzare in autoclave campioni, contenitori, vetrini, provette e tutti gli altri materiali contaminati. Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.

**Conservazione** - Conservare **Difco** Listeria O Antisera liofilizzati e reidratati a 2 - 8 °C.

Conservare **Difco** Listeria O Antigen (Vetrino) e (Provetta) a 2 - 8°C.

L'esposizione prolungata dei reagenti a temperature diverse da quelle indicate può danneggiare i prodotti.

**Deterioramento del prodotto** - La data di scadenza si riferisce al prodotto in confezione integra e conservato come prescritto. Non usare il prodotto se appare indurito, scolorito o presenta altri segni di deterioramento. Prima dell'utilizzo, esaminare l'agglutinazione dei flaconi di antigene. Le sospensioni che presentano agglutinazione non sono stabili e devono essere scartate. Eliminare gli antisieri torbidi o che presentano un precipitato dopo la reidratazione o la conservazione.

### RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

**Accuratezza clinica** - I *Listeria* possono essere recuperati su supporto differenziale selettivo come McBride Listeria Agar, Oxford Agar, Modified Oxford Agar, LPM Agar o PALCAM Medium. Per specifiche informazioni sull'isolamento di *Listeria* da campioni clinici, consultare gli opportuni riferimenti.<sup>8-10</sup> Stabilire che la coltura del microorganismo sia pura e che le reazioni biochimiche siano coerenti con l'identificazione dell'organismo come *L. monocytogenes*. Una volta soddisfatti questi criteri, è possibile eseguire l'identificazione sierologica.

**Campioni alimentari o caseari** - E' possibile rintracciare i *Listeria* nel caso in cui i campioni siano lavorati per recuperare microrganismi lesionati e per impedire lo sviluppo eccessivo dei microrganismi concorrenti. Per le procedure prescritte relative all'isolamento di *Listeria* da alimenti, consultare gli opportuni riferimenti.<sup>6,11,12</sup> Dopo aver seguito una procedura predeterminata, isolare una coltura pura del microorganismo e confermare che le reazioni biochimiche siano coerenti con l'identificazione dell'organismo come *L. monocytogenes*. Una volta soddisfatti questi criteri, è possibile eseguire l'identificazione sierologica.

### PROCEDIMENTO

**Materiali forniti** - **Difco** Listeria O Antiserum Tipo 1, **Difco** Listeria O Antiserum Tipo 4, **Difco** Listeria O Antiserum Poly, **Difco** Listeria O Antigen Tipo 1 (Vetrino), **Difco** Listeria O Antigen Tipo 1 (Provetta), **Difco** Listeria O Antigen Tipo 4 (Vetrino), **Difco** Listeria O Antigen Tipo 4 (Provetta).

### Materiali necessari ma non forniti

**Test su vetrino** - **Difco** FA Buffer (Essiccato), piastre di agglutinazione, stick di applicazione, bagnomaria (80 - 100 °C), contagocce.

**Test in provetta** - **Difco** FA Buffer (Essiccato), standard di torbidità McFarland n° 3, provette per colture da 12 x 75 mm con relativo rack, pipette sierologiche da 1 mL, bagnomaria a 50 °C, frigorifero (2 - 8 °C), formaldeide.

**Preparazione dei reagenti** - Prima di eseguire i test, lasciare equilibrare tutti i materiali a temperatura ambiente. Assicurarsi che tutta la vetreria e le pipette siano pulite e prive di residui di detergenti o altro.

**Listeria O Antiserum** - per reidratare, dispensare in ogni fialone 1 mL di acqua depurata sterile. Rotolare delicatamente per dissolvere completamente il contenuto.

**Listeria O Antigens** (Vetrino) e (Provetta) sono pronti all'uso.

### Procedura del test

#### Test su vetrino

1. Reidratare **Difco** FA Buffer seguendo le istruzioni riportate sull'etichetta.
2. Sospendere un'aliquota di crescita dell'isolato di prova da un terreno agar solido non inibitorio in 5 mL circa di **Difco** FA Buffer.
3. Riscaldare la sospensione dell'organismo a 80 - 100 °C (a bagnomaria) per 1 h.
4. Centrifugare la sospensione a 2.000 - 5.000 RCF per 15 - 20 min e rimuovere la massa compatta del fluido supernatante.
5. Sospendere nuovamente l'organismo nella parte rimanente del fluido supernatante.
6. Preparare una diluizione 1:20 del **Difco** Listeria Antiserum desiderato in una soluzione allo 0,85% di NaCl.
7. Su una piastra di agglutinazione, dispensare 1 goccia del **Difco** Listeria Antiserum desiderato diluito su ciascuna delle due aree separate. Dispensare 1 goccia di **Difco** FA Buffer su una terza area della stessa piastra. La prima goccia di antisiero sarà utilizzata per l'isolato di prova e la seconda per il controllo positivo. La goccia di **Difco** FA Buffer sarà utilizzata per il controllo negativo.
8. Dispensare 1 goccia di sospensione dell'organismo dalla fase 5 sulla prima goccia di antisiero.
9. **Controllo positivo** - Dispensare 1 goccia del **Difco** Listeria O Antigen (Vetrino) omologo sulla seconda goccia di antisiero.
10. **Controllo negativo** - Dispensare 1 goccia di sospensione dell'organismo dalla fase 5 sulla goccia di **Difco** FA Buffer sulla piastra di agglutinazione.
11. Rotolare la piastra per 1 - 2 min e poi leggere il risultato di agglutinazione.

#### Test in provetta

1. Sospendere un'aliquota dell'organismo di prova da un terreno agar solido in **Difco** FA Buffer formalizzato (0,3 mL di formaldeide in 300 mL di **Difco** FA Buffer). Regolare fino ad una densità pari circa allo standard di torbidità McFarland n° 3.
2. Preparare una fila di 9 provette di coltura (12 x 75 mm) per ogni sospensione dell'organismo da analizzare, ed una fila per il controllo positivo.
3. Dispensare 0,9 mL di **Difco** FA Buffer formalizzato nella prima provetta di ogni fila e 0,5 mL nelle provette rimanenti.
4. Con una pipetta sierologica da 1 mL, dispensare 0,1 mL di **Difco** Listeria Antiserum desiderato nella provetta 1 di ogni fila e mescolare accuratamente. Trasferire 0,5 mL dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,5 mL sino alla provetta 8, gettando 0,5 mL dalla provetta 8 dopo la miscelazione. La provetta 9 è la provetta del controllo negativo. All'aggiunta della sospensione del microorganismo da testare, le diluizioni finali dovranno essere da 1:20 a 1:2560 per le provette rispettivamente da 1 a 8.
5. Dispensare 0,5 mL di sospensione dell'organismo da testare in ciascuna delle 9 provette.
6. Dispensare 0,5 mL di **Difco** Listeria O Antigen adeguato in ciascuna delle 9 provette contenenti antisiero nella fila del controllo positivo.
7. Agitare il portaprovette per mescolare. Incubare a bagnomaria a 50 °C per 2 h. Refrigerare per tutta la notte. Leggere i risultati dell'agglutinazione la mattina seguente.

**Controllo di qualità a cura dell'utente** - Al momento dell'uso, testare gli antigeni di controllo positivo e negativo per verificare le performance dell'antisiero, le tecniche e la metodologia. Se i risultati del controllo positivo e del controllo negativo si discostano da quelli descritti, il test è da considerarsi non valido e non è possibile registrare i risultati.

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità del laboratorio specifico. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione NCCLS in merito.

#### RISULTATI

##### Test su vetrino

1. Leggere e registrare i risultati come segue.

4+	100% di agglutinazione (sfondo da trasparente a leggermente appannato)
3+	75% di agglutinazione (sfondo leggermente torbido)
2+	50% di agglutinazione (sfondo moderatamente torbido)
1+	25% di agglutinazione (sfondo torbido)
-	Nessuna agglutinazione

2. Per il test dell'isolato, si considera positivo un risultato di agglutinazione pari a 3+ o superiore entro 1 - 2 min.  
3. Un'agglutinazione parziale (minore di 3+) o ritardata, si considera un risultato negativo.

##### Test in provetta

1. Leggere e registrare i risultati come segue.

4+	100% di agglutinazione (sfondo da trasparente a leggermente appannato)
3+	75% di agglutinazione (sfondo leggermente torbido)
2+	50% di agglutinazione (sfondo moderatamente torbido)
1+	25% di agglutinazione (sfondo torbido)
-	Nessuna agglutinazione

2. Per il test dell'isolato, si considera positivo un risultato di agglutinazione pari a 2+ o superiore a 1:320.

#### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Le tecniche sierologiche che utilizzano **Difco** Listeria O Antiserum servono come dimostrazione corroborante dell'identificazione di *L. monocytogenes*. Non è possibile effettuare l'identificazione finale senza considerare la caratterizzazione morfologica, sierologica e biochimica.
- Il calore eccessivo da fonti esterne (ansa batteriologica calda, fiamma di bruciatore, fonte di luce, ecc.) può impedire la formazione di una sospensione omogenea del microorganismo o causare evaporazione o precipitazione della miscela da testare e dar luogo a reazioni false positive.
- Le colture disomogenee di isolati sono soggette ad agglutinazione spontanea con conseguente agglutinazione dei controlli negativi (autoagglutinazione). Se si verifica autoagglutinazione, la coltura è disomogenea e non può essere analizzata. Eseguire una subcoltura su un terreno non inibitorio, incubare e rianalizzare l'organismo.
- Le reazioni di agglutinazione di 3+ o superiori, per quanto riguarda il test su vetrino sono da interpretare come reazioni positive. Reazioni incrociate prodotte in agglutinazioni da 1+ o 2+ sono probabili a causa degli antigeni somatici condivisi da organismi differenti come stafilococchi, enterococchi e specie *Bacillus*.<sup>10</sup>
- L'esposizione prolungata dei reagenti a temperature diverse da quelle indicate può danneggiare i prodotti.
- L'esposizione di Listeria O Antigeni a temperature inferiori a 2 °C può produrre autoagglutinazione. Gli antigeni devono trovarsi in sospensioni uniformi ed omogenee. Prima dell'utilizzo, esaminare l'agglutinazione dei flaconi di antigene. Le sospensioni che presentano agglutinazione non sono stabili e devono essere scartate.
- In questo test, è importante usare i tempi e le temperature di incubazione raccomandati. Assicurarsi inoltre che il bagnomaria sia situato in una posizione non soggetta ad alcuna vibrazione meccanica.
- Eliminare il **Difco** Listeria O Antiserum torbido o che presenta un precipitato dopo la reidratazione o la conservazione.

#### PERFORMANCE

- Il controllo positivo con il Listeria O Antigen adatto, nel test su vetrino deve evidenziare un'agglutinazione pari a 3+ o superiore.
- Il controllo positivo con il Listeria O Antigen adatto, nel test in provetta a 1:320 deve evidenziare un'agglutinazione pari a 2+ o superiore.
- Il controllo negativo non deve evidenziare alcuna agglutinazione.

La sensibilità dei **Difco** Listeria O Antiserum Tipi 1, 4 e Poly viene determinata dimostrando un'adeguata reattività sia nelle prove su vetrino che in quelle in provetta, come definito nella sezione "Risultati", utilizzando il rispettivo **Difco** Listeria O Antigen. La specificità è determinata dimostrando la non reattività con gruppi non legati al **Difco** Listeria O Antigeni (eterologhi).

#### DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
223001	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Tipo 1, 1 mL
223011	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Tipo 4, 1 mL
223021	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Poly, 1 mL
223031	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Tipo 1 (Vetrino), 5 mL
223051	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Tipo 1 (Provetta), 25 mL
223041	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Tipo 4 (Vetrino), 5 mL
223061	<b>Difco</b> Listeria O Antigen Tipo 4 (Provetta), 25 mL
223143	<b>Difco</b> FA Buffer, Essiccato, 6 x 10 g
223142	<b>Difco</b> FA Buffer, Essiccato, 100 g
223141	<b>Difco</b> FA Buffer, Essiccato, 10 kg

**BIBLIOGRAFIA:** Vedere "References" nel testo inglese.



# **BD Difco Listeria** **Antisera and Antigens**

Español

**USO PREVISTO**

**Difco** Listeria O Antisera (antisuero para Listeria O **Difco**) tipos 1, 4 y Poly se utilizan para identificar Listeria monocytogenes en pruebas de aglutinación en portaobjetos y en tubos. **Difco** Listeria O Antigens tipos 1 y 4 (portaobjetos y tubo) se utilizan como controles positivos en las pruebas de aglutinación en portaobjetos y en tubo, respectivamente.

**RESUMEN Y EXPLICACION**

Descrita por primera vez en 1926 por Murray, Webb y Swann<sup>1</sup>, *Listeria monocytogenes* supone un problema generalizado para la salud pública y las industrias alimentarias. Este organismo puede causar enfermedad y muerte en los seres humanos, particularmente en las personas inmunodeprimidas y las mujeres embarazadas<sup>2</sup>. El primer brote por vía alimentaria detectado de listeriosis fue en 1985<sup>3</sup> y, desde ese entonces, las pruebas microbiológicas y epidemiológicas de listeriosis, tanto de casos esporádicos como epidémicos, han demostrado que la vía principal de transmisión es a través de los alimentos contaminados con *L. monocytogenes*<sup>4</sup>.

El organismo se ha aislado en plantas de elaboración de productos lácteos y otros productos alimentarios; es omnipresente en el medio ambiente natural y se encuentra en un amplio espectro de alimentos sin procesar, así como en el suelo, alcantarillados, ensilaje y aguas fluviales<sup>5</sup>.

*Listeria* spp. se cultiva en un intervalo de pH de 4,4 - 9,6 y sobrevive en productos alimentarios con niveles de pH fuera de estos parámetros<sup>6</sup>. *Listeria* spp. son bacilos microaerófilos, gram positivos, asporógenos, no encapsulados, no ramificados, regulares y cortos. La movilidad es más pronunciada a una temperatura de 20 °C.

Las cepas de *Listeria* spp. se dividen en serotipos basados en antígenos celulares (O) y flagelares (H)<sup>7</sup>. Se conocen trece serotipos de *L. monocytogenes*. La mayoría de las enfermedades humanas son causadas por los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b<sup>8</sup>.

**PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO**

La identificación de *L. monocytogenes* incluye confirmación tanto bioquímica como serológica.

La confirmación serológica requiere que el microorganismo (antígeno) reaccione con su correspondiente anticuerpo. Esta reacción *in vitro* produce la formación de grumos macroscópicos denominada aglutinación. La reacción homóloga deseada es rápida, de unión fuerte (alta afinidad) y no disociativa (alta avidéz).

Dado que un microorganismo (antígeno) puede aglutinarse con un anticuerpo producido como respuesta a alguna otra especie, son posibles las reacciones heterólogas. Éstas se caracterizan por ser débiles y de lenta formación. Dichas reacciones imprevistas y posiblemente impredecibles pueden causar confusión en la identificación serológica. Una reacción de aglutinación homóloga positiva debería apoyar la identificación morfológica y bioquímica del microorganismo.

La aglutinación del antígeno somático en la prueba en portaobjetos aparece como una aglutinación granular firme. Las reacciones homólogas son rápidas y fuertes (3+). Las reacciones heterólogas son débiles y lentas.

La aglutinación del antígeno somático en la prueba en tubo aparece como una floculación no firme que puede suspenderse nuevamente con facilidad. Las reacciones homólogas con Listeria O Antisera deben superar una titulación de 2+ a 1:320.

**REACTIVOS**

**Difco** Listeria O Antisera tipos 1, 4 y Poly son antisueros de conejo policlonales liofilizados que contienen aproximadamente 0,04% de timerosal como conservante. Listeria O Antisera Tipos 1 y 4 son específicos para los serotipos respectivos de *L. monocytogenes* mientras Listeria O Antiserum Poly contiene aglutininas para *L. monocytogenes*, serotipos 1 y 4.

**Difco** Listeria O Antigens tipos 1 y 4 (tubo) y (portaobjetos) son suspensiones de los serotipos apropiados de *L. monocytogenes* con formaldehído al 0.3% como conservante. Cuando se utilizan de acuerdo al procedimiento sugerido, los reactivos dan los siguientes resultados:

Reactivo	Frasco	Número de pruebas
Listeria O Antiserum	1 mL	10 pruebas en tubo o 400 pruebas en portaobjetos
Listeria O Antigen (portaobjetos)	5 mL	100 pruebas en portaobjetos
Listeria O Antigen (tubo)	25 mL	5 pruebas en tubo

**Advertencias y precauciones**

Para uso diagnóstico *in vitro*.

El envase de este producto contiene goma natural seca.

Emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todo el proceso. Después del uso, se deberán esterilizar muestras, envases, portaobjetos, tubos y demás material contaminado en autoclave. Es necesario seguir al pie de la letra las instrucciones de uso.

**Almacenamiento:** Almacenar **Difco** Listeria O Antisera, liofilizados y rehidratados, a una temperatura de 2 - 8 °C.

Almacenar **Difco** Listeria O Antigen (portaobjetos) y (tubos) a una temperatura de 2 - 8°C. Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes de las especificadas es perjudicial para los productos.



**Deterioro del producto:** La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada. No utilizar si el producto está aglutinado o descolorido, o si evidencia otras señales de deterioro. Antes de utilizar los frascos de antígeno, examinarlos para detectar aglutinación. Las suspensiones que presenten aglutinación no son utilizables y deberán ser desechadas. Descartar los antisueños que tengan turbidez o que presenten precipitados después de la rehidratación o el almacenamiento.

#### RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

**Muestras clínicas:** *Listeria* puede recuperarse de medios de diferenciación selectivos tales como el agar McBride *Listeria*, agar Oxford, agar Oxford modificado, agar LPM o medio PALCAM. Consultar las referencias correspondientes para obtener recomendaciones específicas acerca del aislamiento de *Listeria* de muestras clínicas<sup>8-10</sup>. Determinar que se ha obtenido un cultivo puro del microorganismo y que las reacciones de las pruebas bioquímicas sean acordes con la identificación del organismo como *L. monocytogenes*. Después de haberse satisfecho estos criterios, se podrá realizar la identificación serológica.

**Muestras alimentarias o lácteas:** Puede recuperarse *Listeria* cuando las muestras se procesan para recuperar microorganismos lesionados y evitar el crecimiento excesivo de microorganismos competidores. Consultar las referencias apropiadas para obtener los procedimientos recomendados para el aislamiento de *Listeria* a partir de alimentos<sup>5,11,12</sup>. Al seguir el protocolo establecido, aislar un cultivo puro del microorganismo y confirmar que las reacciones de pruebas bioquímicas son acordes con la identificación del organismo como perteneciente a la especie *L. monocytogenes*. Después de haberse satisfecho estos criterios, se podrá realizar la identificación serológica.

#### PROCEDIMIENTO

**Materiales suministrados:** **Difco** *Listeria* O Antiserum tipo 1, **Difco** *Listeria* O Antiserum tipo 4, **Difco** *Listeria* O Antiserum Poly, **Difco** *Listeria* O Antigen tipo 1 (portaobjetos), **Difco** *Listeria* O Antigen tipo 1 (tubo), **Difco** *Listeria* O Antigen tipo 4 (portaobjetos), **Difco** *Listeria* O Antigen tipo 4 (tubo).

#### Materiales necesarios pero no suministrados:

**Prueba en portaobjetos:** **Difco** FA Buffer (deshidratado), portaobjetos de aglutinación, aplicadores, baño María (80 - 100 °C), droppers.

**Tubo de ensayo:** **Difco** FA Buffer (deshidratado), patrón de turbidez N° 3 de McFarland, tubos de cultivo de 12 x 75 mm y gradilla, pipetas serológicas de 1 mL, baño María de 50 °C, frigorífico (2 - 8 °C), formaldehído.

**Preparación del reactivo:** Equilibrar todos los materiales a temperatura ambiente antes de realizar las pruebas. Asegurarse de que el material de vidrio y las pipetas estén limpios y libres de residuos, como, por ejemplo, detergente.

**Listeria O Antisera:** Para rehidratar, agregar 1 mL de agua purificada estéril a cada frasco. Girar suavemente para disolver el contenido por completo.

**Listeria O Antigenos** (portaobjetos) y (tubo) están listos para usar.

#### Procedimiento de análisis

##### Prueba en portaobjetos

1. Rehidratar **Difco** FA Buffer conforme a las instrucciones de la etiqueta.
2. Suspender un asa llena del crecimiento del aislado de prueba de un medio de agar sólido no inhibitor en aproximadamente 5 mL de **Difco** FA Buffer.
3. Calentar la suspensión de organismo a 80 - 100 °C (en baño María) durante 1 h.
4. Centrifugar la suspensión a 2.000 - 5.000 RCF durante 15 - 20 min y retirar el grueso del líquido sobrenadante.
5. Volver a suspender el organismo en la porción restante del líquido sobrenadante.
6. Preparar una solución de 1:20 de **Difco** *Listeria* Antiserum deseado en una solución de NaCl al 0,85%.
7. En un portaobjetos de aglutinación, colocar 1 gota del **Difco** *Listeria* Antiserum diluido deseado en cada una de las dos áreas diferentes. Colocar una gota de **Difco** FA Buffer en la tercera área del mismo portaobjetos. La primera gota de antisuero se utilizará para el aislado de prueba y la segunda, para el control positivo. La gota de **Difco** FA Buffer se utilizará para el control negativo.
8. Colocar 1 gota de suspensión de organismo del paso 5 a la primera gota de antisuero.
9. **Control positivo:** Colocar 1 gota de **Difco** *Listeria* O Antigen (portaobjetos) homólogo a la segunda gota de antisuero.
10. **Control negativo:** Colocar 1 gota de suspensión de organismo del paso 5 a la gota de **Difco** FA Buffer en el portaobjetos de aglutinación.
11. Girar el portaobjetos durante 1 - 2 min y efectuar la lectura para determinar si se ha producido aglutinación.

##### Prueba en tubo

1. Suspender un asa llena del organismo de prueba de un medio de agar sólido en **Difco** FA Buffer formalinizado (0,3 mL de formaldehído cada 300 mL de **Difco** FA Buffer). Ajustar a una densidad aproximadamente equivalente al patrón de turbidez N° 3 de McFarland.
2. Preparar una fila de 9 tubos de cultivo (12 x 75 mm) para cada suspensión de organismo que ha de analizarse, incluida una fila para el control positivo.
3. Dispensar 0,9 mL de **Difco** FA Buffer formalinizado al primer tubo en cada fila y 0,5 mL a los tubos restantes.
4. Con una pipeta serológica de 1 mL, añadir 0,1 mL del **Difco** *Listeria* Antiserum deseado al tubo 1 en cada fila y mezclar bien. Transferir 0,5 mL del tubo 1 al tubo 2 y mezclar bien. De manera similar, continuar transfiriendo 0,5 mL hasta el tubo 8 y descartar 0,5 mL del tubo 8 después de mezclar. El tubo 9 es un tubo de control negativo. Al agregar la suspensión del organismo de prueba, las diluciones finales serán de 1:20 hasta 1:2560 para los tubos 1 a 8, respectivamente.
5. Agregar 0,5 mL de la suspensión del organismo de prueba a cada uno de los 9 tubos.
6. Agregar 0,5 mL del **Difco** *Listeria* O Antigen apropiado a cada uno de los 9 tubos que contienen antisuero en la fila de control positivo.

7. Agitar la gradilla para mezclar. Incubar en baño María de 50 °C durante 2 h. Refrigerar de un día para el otro. Efectuar la lectura para ver si presenta aglutinación a la mañana siguiente.

**Control de calidad del usuario:** En el momento del uso, analizar los cultivos de control tanto positivos como negativos para comprobar el rendimiento de los antisueros, las técnicas y la metodología. Si los resultados de la prueba para el control positivo o negativo no resultan tal como se describen, la prueba no es válida y los resultados no se pueden informar.

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de NCCLS y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

#### RESULTADOS

##### Prueba de portaobjetos

1. Efectuar la lectura y registrar los resultados de la siguiente forma:

4+	100% de aglutinación (fondo transparente a ligeramente lechoso)
3+	75% de aglutinación (fondo ligeramente turbio)
2+	50% de aglutinación (fondo moderadamente turbio)
1+	25% de aglutinación (fondo turbio)
-	Sin aglutinación

2. Para las cepas aisladas de análisis, un valor de aglutinación de 3+ o más al cabo de 1 - 2 min indica un resultado positivo.
3. Una aglutinación parcial (menos de 3+) o demorada debe considerarse como reacción negativa.

##### Prueba en tubo

1. Leer y registrar los resultados de la siguiente forma:

4+	100% de aglutinación (fondo transparente a ligeramente lechoso)
3+	75% de aglutinación (fondo ligeramente turbio)
2+	50% de aglutinación (fondo moderadamente turbio)
1+	25% de aglutinación (fondo turbio)
-	Sin aglutinación

2. Para la cepa aislada de análisis, un resultado positivo se indica mediante la aglutinación de 2+ o más a 1:320.

#### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Las técnicas serológicas que utilizan **Difco** Listeria O Antiserum sirven para corroborar la identificación de *L. monocytogenes*. No se puede realizar una identificación final sin considerar la caracterización morfológica, serológica y bioquímica.
2. El calor excesivo proveniente de fuentes externas (asa bacteriológica caliente, llama del mechero, fuente de luz, etc.) puede impedir la formación de una suspensión uniforme del microorganismo o causar la evaporación o precipitación de la mezcla de análisis. Pueden ocurrir reacciones positivas falsas.
3. Efectivamente ocurren cepas aisladas de cultivos rugosos, las cuales se aglutinarán espontáneamente, lo que causa la aglutinación de los controles negativos (autoaglutinación). Si ocurre autoaglutinación, el cultivo es rugoso y no se podrá analizar. Realizar un subcultivo en un medio no inhibitorio, incubar y repetir la prueba del organismo.
4. Las reacciones de aglutinación de 3+ o más se interpretan como reacciones positivas. Las reacciones cruzadas que generan aglutinación de 1+ o 2+ son posibles, dado que existen antígenos somáticos en común entre diferentes organismos, tales como estafilococos, enterococos y la especie *Bacillus*.
5. Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes a las especificadas es perjudicial para los productos.
6. La exposición de Listeria O Antigen a temperaturas por debajo de 2 °C puede causar autoaglutinación. Los antígenos deben ser suspensiones uniformes homogéneas. Inspeccionar los frascos de antígenos en busca de aglutinación antes de su utilización. Las suspensiones que presenten aglutinación no son utilizables y deberán ser desechadas.
7. En esta prueba es importante respetar el tiempo y la temperatura de incubación recomendados. Además, se debe comprobar que el baño María se encuentre en un lugar libre de vibraciones mecánicas.
8. Descartar cualquier **Difco** Listeria O Antiserum turbio o con precipitación después de la rehidratación o almacenamiento.

#### CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

1. El control positivo con el Listeria O Antigen apropiado debe mostrar una aglutinación de 3+ o más en la prueba en portaobjetos.
2. El control positivo con Listeria O Antigen apropiado debe mostrar una aglutinación de 2+ o más a 1:320 en la prueba en tubo.
3. El control negativo no debe mostrar ningún indicio de aglutinación.

La sensibilidad de **Difco** Listeria O Antiserum tipos 1, 4 y Poly se determina al demostrar la reactividad correspondiente en las pruebas tanto en portaobjetos como en tubo, según se define en la sección "Resultados" mediante el **Difco** Listeria O Antigen homólogo correspondiente. La especificidad se determina al demostrar la falta de reactividad frente a **Difco** Listeria O Antigen no relacionados (heterólogos).

**DISPONIBILIDAD****N° de cat. Descripción**

223001	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum tipo 1, 1 mL
223011	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum tipo 4, 1 mL
223021	<b>Difco</b> Listeria O Antiserum Poly, 1 mL
223031	<b>Difco</b> Listeria O Antigen tipo 1 (portaobjetos), 5 mL
223051	<b>Difco</b> Listeria O Antigen tipo 1 (tubo), 25 mL
223041	<b>Difco</b> Listeria O Antigen tipo 4 (portaobjetos), 5 mL
223061	<b>Difco</b> Listeria O Antigen tipo 4 (tubo), 25 mL
223143	<b>Difco</b> FA Buffer, deshidratado, 6 x 10 g
223142	<b>Difco</b> FA Buffer, deshidratado, 100 g
223141	<b>Difco</b> FA Buffer, deshidratado, 10 kg

**BIBLIOGRAFIA:** Ver "References" en el texto en inglés.



Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare



Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före / YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) / JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) / AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) / VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) / AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) / JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) / EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) / ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) / AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) / MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mês do ano) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) / AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiaca) / aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden)



Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (partii)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo



Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autoriseret representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisais / In vitro diagnostisk medicinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicínsk anordning för in vitro-diagnostik



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning



Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen



Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Inneholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Küllaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> teszthez elegendő / Contenuto sufficiente per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Inneholder tilstrækkelig for <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Contêmo suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester



Control / Kontrola / Kontrol / Controle / Kontroll / Kontrolli / Contrôle / Kontrolle / Έλεγχος / Controllo / Kontrolè / Controllo



Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, Maryland 21152 USA  
800-638-8663



BENEX Limited  
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate  
Shannon, County Clare, Ireland  
Tel: 353-61-47-29-20  
Fax: 353-61-47-25-46

Difco is a trademark of Difco Laboratories, Inc., a subsidiary of Becton, Dickinson and Company.

BD and BD Logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company.  
© 2005 BD.