
RAPID'*L.mono* Agar

User Guide

Selective chromogenic medium for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other species of *Listeria* in food products for human consumption and in environmental samples

Catalog #3563694, Prepared plates, 90 mm x 20 dishes

Catalog #3563964, Prepared plates, 90 mm x 120 dishes

Catalog #3555294, Ready-to-use kit (for 200 ml), includes bottled agar medium, supplements

Catalog #3564293, Dehydrated, 500 g

Catalog #3564294, Supplement 1, freeze dried, 10 vials

Catalog #3564746, Supplement 2, liquid, 10 vials



BIO-RAD

Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>L.mono</i> Principle	1
Section 3	Theoretical Formula	1
Section 4	Shelf Life and Storage	2
Section 5	Materials Required but Not Supplied	2
	Equipment.....	2
	Supplies	2
Section 6	Precautions, Limitations of Use, and Quality Control	3
Section 7	Protocol.....	4
	Preparation of Dehydrated Medium.....	4
	Preparation of Bottled Medium	4
	Detection of <i>L. monocytogenes</i> and <i>Listeria</i> genus	5
	Enumeration of <i>L. monocytogenes</i>	6
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	6
Section 9	Confirmation of Other Methods.....	7
Section 10	Test Performance and Validations	8
Section 11	References.....	8
Section 12	Revision History	9

Section 1 Introduction

Serious outbreaks of *Listeria monocytogenes* continue to plague the food safety industry. *Listeria* is dangerous in the way that it can survive and grow, however slowly, at refrigerated temperatures in ready-to-eat processed foods. *Listeria monocytogenes* is a particularly problematic pathogen, as it can cause serious health problems and possible death, particularly in immunosuppressed individuals, newborns, and the elderly. Infection is known to cause still births and miscarriages in pregnant women. Listeriosis develops with symptoms such as fever, fatigue, nausea, vomiting, and diarrhea and has a mortality rate of 30%, but may be higher in vulnerable individuals. Approximately 90% of all reported cases of listeriosis result in hospitalization. A rapid culture method is necessary to cut down on time to results and to make sure those results are accurate.

Section 2 RAPID'*L.mono* Principle

The principle behind RAPID'*L.mono* Medium relies on the specific detection of phospholipase C (PIPLC) activity of *L. monocytogenes* and on the inability of this species to metabolise xylose. After 24 hr of incubation, *L. monocytogenes* form characteristic blue (pale blue, grey-blue to dark blue) colonies without a yellow halo. Colonies formed by other species of *Listeria* are white, with or without a yellow halo. *Listeria ivanovii* form blue-green colonies with a yellow halo (xylose-positive characteristic). This halo can appear after 24–48 hr of incubation. The selective solution in the medium permits inhibition of most interfering flora (gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts, and molds). RAPID'*L.mono* permits a rapid and specific identification of *L. monocytogenes* in 24 hr and of other *Listeria* species in 24–48 hr after preparing samples in compliance with standards.

Section 3 Theoretical Formula

Peptones	30 g
Meat extract	5 g
Yeast extract	1 g
Lithium chloride	9 g
Xylose	10 g
Phenol red	0.12 g
Growth activators	2 g
Chromogenic solution	1 ml
Selective solution	20 ml
Agar B	13 g
Distilled water	qsp 1,000 ml

Final pH at 25°C = 7.2 ± 0.2

Section 4 Shelf Life and Storage

- Dehydrated agar: 2–8°C in carefully sealed package, in a dry and dark place
- Prepoured agar: 2–8°C in carefully sealed package, in a dark place
- Plate prepared from the dehydrated agar: 1 week at 2–8°C in carefully sealed package, in a dry and dark place

Section 5 Materials Required but Not Supplied

Equipment

- All usual laboratory equipment
- Hot plate
- Scale, sensitivity of 0.1 g
- Stirrer/homogenizer
- Thermostatically controlled incubator or incubation room, precise to $\pm 1^\circ\text{C}$
- Water bath

Supplies

- Confirmation:
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (catalog #3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (catalog #3578113)
 - Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (for example, catalog #3563695, prepared plates 90 mm x 20; 3563965, prepared plates 90 mm x 120; 3555200, 250 ml x 6 bottles; 3564043, dehydrated, 500 g; 3564041, AL Supplement 1, 10 vials; 3564042, AL Supplement 2, 10 vials)
 - PALCAM agar (for example catalog #3564754, dehydrated 500 g; 3564752, supplement, 10 vials)
 - Rhamnose test (catalog #3553669, 1 ml x 28 vials)
- Diluent for enumeration, tryptone salt (catalog #3555754, 9 ml x 25 tubes; 3555756, 900 ml x 6 bottles; 3555796, 3 L x 4 bags; 3564544, 500 g)
- Enrichment medium, Fraser ½ broth (catalog #3555797, 225 ml bottles x 6; 3555794, 3 L x 4 bags; 3564604, dehydrated 500 g; 3564616, supplement, 10 vials)
- Inoculating loops and spreaders
- Resuscitation medium, Buffered Peptone Water (BPW), (catalog #3554179, 225 ml x 6 bottles; 3564684, dehydrated 500 g; 3555790, 2 x 5 L bags; 3555795, 4 x 3 L bags)

Section 6 Precautions, Limitations of Use, and Quality Control

- Sterile petri dishes
- Sterile pipets
- Sterile weigh bags

Section 6 Precautions, Limitations of Use, and Quality Control

Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria such as *L. monocytogenes*
- Media that have come in contact with food samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- Avoid prolonged overheating of the product during melting
- Before using RAPID'*L.mono* Agar, let the petri dishes dry at 25–50°C until droplets disappear from the surface of the medium, in compliance with the EN ISO 7218 standard. Avoid prolonged drying, however, as this could alter the performance of the medium
- When using the enumeration method, inoculate the medium using a spreader. After spreading, the dishes can be left as they are on the work surface for 15–30 min before incubation in order to permit the inoculum to be correctly absorbed by the agar
- When using bottled RAPID'*L.mono* Agar, a white deposit at the bottom of the bottle is normal. To ensure resuspension and satisfactory homogeneity, it is important to stir the bottle by hand when it is taken out of the boiling and melting water baths and to pour it immediately after adding the supplements
- Before inoculation, RAPID'*L.mono* Agar is red to red-orange and opaque. Some color variation can be observed without any impact on the performance

Limitations of Use

- A strain of *L. ivanovii* with slow xylose activity can be found in sheep milk. This typical strain is difficult to differentiate from a *L. monocytogenes* strain, even after 48 hr on RAPID'*L.mono* Agar. Therefore, Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti confirmation isn't advised when sheep milk products are tested
- Some rare *L. monocytogenes* strains are characterized by slow PIPLC activity, which could result in a slower development of the typical blue color. Extending the incubation time by 48 hr may be required. During the NF Validation study, 200 strains of *L. monocytogenes* were tested and none demonstrated slow PIPLC activity
- Sample volumes over 25 g have not been tested as part of NF VALIDATION

Quality Control

- Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality assurance procedure at all stages, from reception of raw materials through marketing of the finished products. Each batch of finished product undergoes quality control according to EN ISO 11133 and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria. Documentation relative to the production and quality control of each batch is kept on file
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit www.bio-rad.com

Section 7 Protocol

Preparation of Dehydrated Medium

1. Always shake bottle before use.
2. Dissolve 68.1 g of powder in 950 ml of distilled water and mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Warm slowly while stirring and bring to a boil (maximum boil 2 min). Avoid overheating.
4. Cool the medium to 45–50°C in a water bath.
5. Aseptically add and homogenize 2 vials of Supplement 1, each reconstituted by adding 14 ml of sterile water.
6. Aseptically add and homogenize 2 vials of Supplement 2.
7. If necessary, mix on a magnetic stirrer until dispensed.
8. Dispense in petri dishes.
9. Leave to set on a cool, level surface.
10. Do not stack the dishes.
11. One 500 g bottle of powder makes 7.4 L of medium.

Preparation of Bottled Medium

1. In a boiling water bath, melt the contents of the RAPID'*L.mono* Agar bottle.
2. Remove from heat and stir the bottle contents by hand to resuspend the white deposit.
3. Cool the bottle to 47–50°C in a water bath. Stir bottle contents by hand before adding supplements.
4. Aseptically add 1 vial of Supplement 1 reconstituted with 14 ml of sterile water and 1 vial of Supplement 2.
5. Mix thoroughly. Avoid frothing.

Section 7 Protocol

6. Immediately pour the medium into petri dishes.
7. Leave to set on a cool, level surface.
8. Do not stack the dishes.
9. One kit allows the preparation of approximately 13 plates.

Detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* genus

1. Dilute n g or n ml of sample in $9 \times n$ ml Fraser $\frac{1}{2}$ broth. Homogenize with stirrer/homogenizer.
2. Incubate at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr.
3. After the enrichment step, the broth can be stored at $2\text{--}8^\circ\text{C}$ for 72 hr.
4. Using a sterile pipet remove 0.1 ml of sample and place drops on the outside edge of half of the agar surface.
5. Using a sterile Pasteur pipet or inoculating loop, spread sample over half the agar surface in a to-and-fro motion.
6. On the other half of the agar surface, streak for isolation by spreading the deposit in relatively close streaks over the entire dish from the edge of the previous spread.
7. Incubate the upturned dishes at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr.
8. *L. monocytogenes* form pale blue, grey-blue to dark blue round and smooth colonies, without yellow halo, with an average diameter of 1–2 mm. Depending on the food matrix, the depth of blue color of the colony may vary.
9. Other *Listeria* spp. colonies are typically white or pale yellow, with or without a yellow halo, forming a round shape with a smooth, convex appearance, average diameter 1–2 mm. *L. ivanovii* form blue-green colonies with a yellow halo.
10. In the case of “non-detected” target of *Listeria* genus (other than *L. monocytogenes*), 48 hr of incubation are required to provide a negative result.
11. After the incubation step, plates can be stored at $2\text{--}8^\circ\text{C}$ for 72 hr.

Enumeration of *L. monocytogenes*

1. Dilute n g or ml of sample in $9 \times n$ ml of BPW.
2. Incubate at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ for $1 \text{ hr} \pm 5 \text{ min}$. This step is optional; the resuscitation step was not applied during the 2018 NF VALIDATION renewal study.
3. Spread 0.1 ml on one plate.
4. If necessary, prepare a 1:10 dilution (or more) in tryptone salt diluent or BPW as per the ISO 6887 standard and spread 0.1 ml of each dilution on a plate.

Section 8 Confirmation of Positive Results

5. If estimating small numbers, spread 1 ml of sample over three plates of 90 mm diameter (~0.33 ml/plate) or over one plate of 140 mm diameter (NF VALIDATION certified protocol). It is also possible to spread 1 ml over two plates of 90 mm diameter (not NF VALIDATION certified).
6. Incubate the upturned dishes at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr.
7. Read plate and enumerate typical colonies. Count only dishes containing a maximum of 150 characteristic colonies and a maximum of 300 colonies in total.
8. Refer to EN ISO 7218 standard for inoculation, colony counting, calculation and expression of results.

Section 8 Confirmation of Positive Results

1. In the context of AOAC validation, confirm suspect isolated colonies according to classic confirmation test procedure described in the standard reference methods.
2. In the context of NF VALIDATION, confirmation of *L. monocytogenes* performed on only one colony is sufficient and must be done in one of the following ways:
 - a. Using the conventional tests described in the CEN or ISO standard methods (including the purification step).
 - b. Using nucleic probes as described in the ISO 7218 standard (for example, iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, catalog #3578124) using isolated colonies (with or without purification step).
 - c. Confirmed using a rhamnose test (catalog # 3553669).
 - d. Using any other NF VALIDATION certified method based on a different principle from that of RAPID'*L.mono*. The validated protocol of the second method must be respected in its entirety. All steps preceding the detection step used as a starting point for confirmation must be common to both methods.
3. In the context of NF VALIDATION, confirmation of *Listeria* spp. other than *L. monocytogenes* performed on only one colony is sufficient and must be done in one of the following ways:
 - a. Using the conventional tests described in the CEN or ISO standard methods (including the purification step).
 - b. Using nucleic probes as described in the ISO 7218 standard (for example, iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, catalog #3578113) using isolated colonies (with or without purification step).
 - c. Repicking and spotting at least one isolated colony on an AL or a PALCAM agar plate. Up to 15 colonies can be confirmed on a single AL or PALCAM agar plate.
 - d. Using any other NF VALIDATION certified method based on a different principle from that of RAPID'*L.mono* Agar. The validated protocol of the second method must be respected in its entirety. All steps preceding the detection step used as a starting point for confirmation must be common to both methods.

Section 9 Confirmation of Other Methods


4. Suspected colonies can be confirmed by using the MALDI Biotyper test (Bruker's Biotyper System includes a MALDI time-of-flight mass spectrometer and MBT Compass Software, version 4) directly from an isolated colony or after a purification step. This option is certified by MicroVal according to ISO 16140-6 (2017LR75).
5. In the event of discordant results (presumptive positive with RAPID'*L.mono*, negative with confirmation method), the laboratory must follow the necessary steps to ensure validity of the result obtained.
6. In the case of a positive result confirmed for *L. monocytogenes* with the RAPID'*L.mono* enumeration method, it is not necessary to duplicate the *L. monocytogenes* confirmation step for the same sample tested with the RAPID'*L.mono* detection method.
7. When using the enumeration protocol, confirming fewer than five colonies involves a risk of overestimating because of the presence of typical colonies that would not be *L. monocytogenes*.

Section 9 Confirmation of Other Methods



Confirmation of Positive Results with iQ-Check *Listeria* spp. and iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kits (NF VALIDATION Certified Protocol)

1. Using a sterile loop, streak 100 µl of enrichment broth (LSB or Fraser ½ broth) on RAPID'*L.mono* Agar.
2. Incubate plates at 37 ± 1°C for 24 ± 2 hr.
3. *L. monocytogenes* form pale blue, grey-blue to dark blue colonies and other *Listeria* spp. form white or pale yellow colonies with or without a yellow halo on RAPID'*L.mono* Agar.

Section 10 Test Performance and Validations

Certification	Scope	Validation Protocol	Reference Protocol	Certificate Reference
AOAC-RI	Brie cheese, surimi, mixed salad, deli turkey	Performance Tested Methods	FDA BAM Chap. 10 USDA MLG 8.11	 License# 030406

Section 11 References

NORDVAL	All human food products and production environmental samples	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) NF EN ISO 11290-2 (2017)	 NordVal #022
NF VALIDATION	All human food products and production environmental samples	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) EN ISO 11290-2 (2017)	 BRD: 07/04–09/98 BRD: 07/05–09/01 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 References

Amilli A, Goldfine H, and Portnoy DA. (1991). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 173, 751–754.

Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis D.W, Holzappel W. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *Int J Food Microbiol* 109, 127–131.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. (1990). Enhanced haemolysis agar (EHA)—an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* *Food Microbiol* 8, 37–49.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. 1990: Performance of enhanced haemolysis agar compared to Oxford medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food enrichment broths. *Food Microbiol* 8, 51-62.

Foret J and Dorey F (1997). Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru. *Sciences des Aliments* 17, 219–225.

Heisick JE, Rosas-Marty LI and Tatini SR. (1995). Enumeration of Viable *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* in Foods. *J Food Prot* 58, 733–736.

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

Section 12 Revision History

ISO 11290-1:2017 - Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -- Part 1: Detection method.

ISO 11290-2:2017 - Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -- Part 2: Enumeration method.

Karpiskova R., Pejchalova M., Mokrosova J, Vytrasova J, Smuharova P, Ruprich J. (2000). Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. J Microbiol Methods 41, 267-271.

Leclercq A (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'*L.mono* and ALOA solid media. J Microbiol Methods 57, 251–258.

Manafi M (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. Int J Food Microbiol 60, 205-218.

Mengaud J, Braun-Breton C, and Cossart P. (1991). Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? Mol Microbiol, 5, 367–372.

Notermans SH, Dufrenne J. et al. (1991). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. Appl Envir Microbiol 57, 2666–2670.

Polivka C (2001). Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium RAPID'*L.mono*. Arch Lebensmittelhygiene 52, 22–23.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online at <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>

United States Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 10 *Listeria monocytogenes*. Online at <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
March 2020	10000127436 Ver A	- Major change - New document design - Document number change – previous version RAPID_ <i>L.mono</i> _V14_01 July 2019
June 2021	10000127436 Ver B	- Minor change - NF VALIDATION renewal
May 2023	10000127436 Ver C	- Minor change - MALDI Biotyper confirmation clarification - <i>L. monocytogenes</i> confirmation clarification - NF VALIDATION renewal - References update

Visit www.bio-rad.com/rapidmedia for more information on our complete range of RAPID Chromogenic Media.

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. IQ-CHECK is a trademark of Bio-Rad Europe GmbH in certain jurisdictions. All trademarks used herein are the property of their respective owner.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

RAPID' *L.mono* Agar

Guide d'utilisation

Milieu chromogénique sélectif pour la détection et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et d'autres espèces de *Listeria* dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine et dans les échantillons environnementaux

N° de référence 3563694, boîte préparée, 90 mm x 20 boîtes

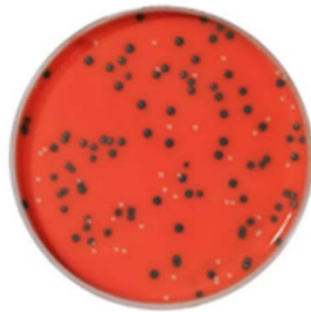
N° de référence 3563964, boîte préparée, 90 mm x 120 boîtes

N° de référence 3555294, kit prêt à l'emploi (pour 200 ml), avec milieu gélosé en flacon et suppléments

N° de référence 3564293, base déshydratée, 500 g

N° de référence 3564294, Supplement 1, lyophilisé, 10 flacons

N° de référence 3564746, Supplement 2, liquide, 10 flacons



BIO-RAD

Sommaire

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>L.mono</i> - Principe.....	1
Section 3	Formule théorique.....	1
Section 4	Durée de conservation et stockage	2
Section 5	Matériel requis non fourni	2
	Matériel	2
	Produits.....	2
Section 6	Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité	3
Section 7	Protocole.....	4
	Préparation du milieu déshydraté.....	4
	Préparation du milieu en flacon	5
	Détection de <i>L. monocytogenes</i> et du genre <i>Listeria</i>	5
	Dénombrement de <i>L. monocytogenes</i>	6
Section 8	Confirmation des résultats positifs.....	6
Section 9	Confirmation d'autres méthodes.....	7
Section 10	Performance du test et validations	8
Section 11	Références.....	8
Section 12	Historique des révisions.....	10

Section 1 Introduction

De graves épidémies dues à *Listeria monocytogenes* continuent de préoccuper l'industrie alimentaire. Le genre *Listeria* est dangereux car il peut survivre et croître, quoique lentement, à des températures de réfrigération dans les aliments transformés prêts-à-consommer. *Listeria monocytogenes* est un agent pathogène particulièrement problématique ; il peut entraîner de graves problèmes de santé, voire la mort, notamment chez les personnes immunodéprimées, les nouveau-nés et les personnes âgées. Chez la femme enceinte, une infection peut causer un avortement spontané et une mortalité. La listériose provoque les symptômes suivants : fièvre, fatigue, nausées, vomissements, diarrhée. Le taux de mortalité est de 30 % et peut être supérieur chez les personnes vulnérables. Environ 90 % de l'ensemble des cas rapportés de listériose aboutissent à une hospitalisation. Une méthode de culture rapide est nécessaire, de façon à réduire le temps d'obtention des résultats et à garantir la précision de ces derniers.

Section 2 RAPID'*L.mono* - Principe

Le principe du milieu RAPID'*L.mono* repose sur la détection spécifique de l'activité phospholipase C (PIPLC) de *L. monocytogenes* et sur l'inaptitude de cette espèce à métaboliser le xylose. Après 24 hr d'incubation, *L. monocytogenes* forme des colonies caractéristiques bleues (bleu pâle, gris-bleu à bleu foncé) sans halo jaune. Les colonies formées par les autres espèces de *Listeria* sont blanches, avec ou sans halo jaune. *Listeria ivanovii* forme des colonies bleu-vert avec un halo jaune (caractéristique xylose +). Ce halo peut apparaître après 24-48 hr d'incubation. La solution sélective du milieu permet d'inhiber la majorité de la flore interférente (bactéries à Gram positif et à Gram négatif, levures et moisissures). RAPID'*L.mono* permet ainsi l'identification rapide et spécifique de *L. monocytogenes* en 24 hr et des autres espèces de *Listeria* en 24-48 hr après la préparation des échantillons conformément aux normes.

Section 3 Formule théorique

Peptones	30 g
Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	1 g
Chlorure de lithium	9 g
Xylose	10 g
Rouge de phénol	0,12 g
Activateurs de croissance	2 g
Solution chromogène	1 ml
Solution sélective	20 ml
Agar B	13 g
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

pH final à 25 °C = 7,2 ± 0,2

Section 4

Durée de conservation et stockage

- Gélose base déshydratée : 2–8 °C en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière
- Gélose précoulée : 2–8 °C en emballage soigneusement scellé, à l'abri de la lumière
- Boîte préparée à partir de la gélose base déshydratée : 1 semaine à 2–8 °C, en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Plaque chauffante
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur-homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatique, précision ± 1 °C
- Bain-marie

Produits

- Confirmation :
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (n° de référence 3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (n° de référence 3578113)
 - Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti (par exemple, n° de référence 3563695, boîtes préparées 90 mm x 20 ; 3563965, boîtes préparées 90 mm x 120 ; 3555200, 250 ml x 6 flacons ; 3564043, base déshydratée, 500 g ; 3564041, AL Supplement 1, 10 flacons ; 3564042, AL Supplement 2, 10 flacons)
 - PALCAM Agar (par exemple n° de référence 3564754, base déshydratée 500 g ; 3564752, supplément, 10 flacons)
 - Rhamnose Test (n° de référence 3553669, 1 ml x 28 flacons)
- Diluant pour le dénombrement, tryptone-sel (n° de référence 3555754, 9 ml x 25 tubes ; 3555756, 90 ml x 6 flacons ; 3555796, 3 L x 4 poches ; 3564544, 500 g)
- Milieu d'enrichissement, bouillon Fraser ½ (n° de référence 3555797, flacons 225 ml x 6 ; 3555794, 3 L x 4 poches ; 3564604, base déshydratée, 500 g ; 3564616, supplément, 10 flacons)

Section 6 Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité

- Anses d'inoculation et étaleurs
- Milieu de revivification, eau peptonée tamponnée (Buffered Peptone Water, BPW) (n° de référence 3554179, 225 ml x 6 flacons ; 3564684, base déshydratée 500 g ; 3555790, 2 x 5 L poches ; 3555795, 4 x 3 L poches)
- Boîtes de Petri stériles
- Pipettes stériles
- Sacs de pesée stériles

Section 6 Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité

Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses telles que les *L. monocytogenes*.
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons alimentaires doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Éviter toute surchauffe prolongée du produit pendant la fusion.
- Avant d'utiliser le milieu RAPID'L.mono, laisser sécher les boîtes, conformément à la norme EN ISO 7218, à 25 °C-50 °C jusqu'à disparition des gouttelettes de la surface. Toutefois, éviter un séchage prolongé, lequel pourrait altérer les performances du milieu.
- Lors de l'application de la méthode de dénombrement, bien ensemercer le milieu à l'aide d'un étaleur. Après l'étalement, afin de permettre à l'inoculum d'être correctement absorbé par la gélose, les boîtes peuvent être laissées en l'état pendant 15 à 30 min sur la paillasse avant l'incubation.
- Gélose RAPID'L.mono en flacon : le dépôt blanc au fond du flacon est normal. Afin d'assurer la remise en suspension et une homogénéité satisfaisante, il est important de bien agiter manuellement le flacon à la sortie des bains-marie à ébullition et à fusion, et de couler immédiatement après l'ajout des suppléments.
- Avant inoculation, le milieu RAPID'L.mono est une gélose opaque, rouge à rouge-orangé. Une variation de couleur peut être observée dans cette gamme, sans aucun impact sur les performances culturelles.

Limites d'utilisation

- Il est possible de trouver dans le lait de brebis une souche de *L. ivanovii* avec une activité de xylose lente. Cette souche typique est difficile à distinguer d'une souche de *L. monocytogenes*, même après 48 hr sur RAPID'Lmono Agar. Il est par conséquent déconseillé d'utiliser la confirmation Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti sur les échantillons contenant du lait de brebis.

Section 7 Protocole

- Certaines souches rares de *L. monocytogenes* sont caractérisées par une activité PIPLC lente, ce qui peut ralentir l'apparition de la couleur bleue typique. Il peut être nécessaire de prolonger la durée d'incubation de 48 hr. Lors de l'étude NF VALIDATION, 200 souches de *L. monocytogenes* ont été analysées et aucune n'a présenté une activité PIPLC lente.
- Les volumes d'échantillon supérieurs à 25 g n'ont pas été testés dans le cadre de la marque NF VALIDATION.

Contrôle qualité

- Chaque produit fabriqué et commercialisé par Bio-Rad est soumis à une procédure d'assurance qualité à toutes les étapes, de la réception des matières premières jusqu'à la mise sur le marché du produit fini. Chaque lot de produits finis subit un contrôle qualité conforme à EN ISO 11133 et est mis sur le marché uniquement s'il satisfait aux critères d'acceptabilité. La documentation relative à la production et au contrôle qualité de chaque lot est archivée.
- Pour consulter la fiche de données de sécurité (FDS) et le certificat d'analyse, visiter www.bio-rad.com

Section 7 Protocole

Préparation du milieu déshydraté

1. Toujours agiter le flacon avant utilisation.
2. Dissoudre 68,1 g de poudre dans 950 ml d'eau distillée et mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène.
3. Chauffer doucement en mélangeant et porter à ébullition (durée maximum d'ébullition 2 min). Éviter toute surchauffe.
4. Faire refroidir le milieu à 45-50 °C dans un bain-marie.
5. Ajouter et homogénéiser aseptiquement 2 flacons de Supplément 1, chacun reconstitué grâce à l'ajout de 14 ml d'eau stérile.
6. Ajouter et homogénéiser aseptiquement 2 flacons de Supplément 2.
7. Si nécessaire, mélanger sur un agitateur magnétique jusqu'à la répartition.
8. Répartir dans les boîtes de Petri.
9. Laisser solidifier sur une surface plane et froide.
10. Ne pas empiler les boîtes.
11. 500 g de poudre permettent de reconstituer 7,4 L de milieu.

Préparation du milieu en flacon

1. Dans un bain-marie à ébullition, faire fondre le contenu du flacon RAPID' *L.mono* Agar.
2. Agiter manuellement le flacon à sa sortie afin de remettre en suspension le dépôt blanc.
3. Faire refroidir le flacon à 47-50 °C dans un bain-marie. Agiter manuellement le flacon avant l'ajout des suppléments.
4. Ajouter aseptiquement 1 flacon de supplément 1 reconstitué avec 14 ml d'eau stérile, ainsi qu'1 flacon de supplément 2.
5. Mélanger soigneusement. Éviter de faire mousser.
6. Verser immédiatement le milieu dans les boîtes de Petri.
7. Laisser solidifier sur une surface plane et froide.
8. Ne pas empiler les boîtes.
9. Un kit permet de préparer environ 13 boîtes.

Détection de *L. monocytogenes* et du genre *Listeria*

1. Diluer n g ou n ml d'échantillon dans $9 \times n$ ml de bouillon Fraser $\frac{1}{2}$. Homogénéiser avec un agitateur-homogénéisateur.
2. Incuber à 30 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
3. Après l'étape d'enrichissement, le bouillon peut être stocké à 2-8 °C pendant 72 hr.
4. Prélever 0,1 ml d'échantillon à l'aide d'une pipette stérile et placer des gouttes sur le bord extérieur de la moitié de la surface gélosée.
5. À l'aide d'une pipette Pasteur stérile ou d'une anse d'inoculation, étaler l'échantillon sur la moitié de la surface gélosée dans un mouvement de va-et-vient.
6. Sur l'autre moitié de la surface gélosée, isoler le dépôt en stries relativement proches sur toute la boîte, en partant du bord du dernier étalement.
7. Incuber les boîtes retournées à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
8. *L. monocytogenes* forme des colonies de forme ronde et d'aspect lisse, de couleur bleu pâle, bleu-gris à bleu foncé, sans halo jaune et avec un diamètre moyen de 1 à 2 mm. Selon les matrices alimentaires, la couleur bleue de la colonie peut être nuancée.
9. Les autres colonies de *Listeria* spp. sont typiquement blanches ou jaune pâle avec ou sans halo jaune, de forme ronde, avec un aspect lisse et convexe et un diamètre moyen de 1 à 2 mm. *L. ivanovii* présente des colonies bleu-vert avec un halo jaune.
10. En cas de « cible non détectée » du genre *Listeria* (autre que *L. monocytogenes*), 48 hr d'incubation sont nécessaires pour déclarer un résultat négatif.

Section 8 Confirmation des résultats positifs

11. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2-8 °C pendant 72 hr.

Dénombrement de *L. monocytogenes*

1. Diluer n g ou ml d'échantillon dans $9 \times n$ ml d'eau peptonée tamponnée.
2. Incuber à 20 ± 1 °C pendant $1 \text{ hr} \pm 5 \text{ min}$. Cette étape est facultative ; l'étape de revivification n'a pas été appliquée durant l'étude de renouvellement de NF VALIDATION réalisée en 2018.
3. Étaler 0,1 ml sur une boîte.
4. Si nécessaire, préparer une dilution au 1:10 (ou plus) avec diluant tryptone-sel ou eau peptonée tamponnée conformément à la norme ISO 6887 et étaler 0,1 ml de chaque dilution sur une boîte.
5. S'il est nécessaire de procéder à l'estimation de petits nombres, étaler 1 ml de l'échantillon sur la surface de trois boîtes de 90 mm de diamètre (~ 0,33 ml/boîte) ou d'une boîte de 140 mm de diamètre (protocole certifié NF VALIDATION). Il est également possible d'étaler 1 ml de l'échantillon sur la surface de deux boîtes de 90 mm de diamètre (protocole non certifié NF VALIDATION).
6. Incuber les boîtes retournées à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
7. Procéder à la lecture des boîtes et dénombrer les colonies typiques. Compter uniquement les boîtes contenant un maximum de 150 colonies caractéristiques et un maximum de 300 colonies au total.
8. Consulter la norme EN ISO 7218 pour obtenir des informations sur l'inoculation, le comptage des colonies, les calculs et l'expression des résultats.

Section 8 Confirmation des résultats positifs

1. Dans le contexte de la validation AOAC, confirmer les colonies isolées suspectes conformément à la procédure de test de confirmation classique décrite dans les méthodes de référence normalisées.
2. Dans le contexte de la marque NF VALIDATION, une confirmation de la présence de *L. monocytogenes* effectuée sur une seule colonie est suffisante ; elle doit être effectuée de l'une des façons suivantes :
 - a. À l'aide des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées CEN ou ISO (y compris l'étape de purification).
 - b. À l'aide de sondes nucléiques comme décrit dans la norme ISO 7218 (par exemple, iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, n° de référence 3578124), avec des colonies isolées (avec ou sans étape de purification).
 - c. À l'aide d'un test Rhamnose (n° de référence 3553669).
 - d. À l'aide de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION fondée sur un principe différent de celui de RAPID'*L.mono*. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être suivi dans sa totalité. Toutes les étapes antérieures à l'étape de détection utilisée comme point de départ pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

Section 9 Confirmation d'autres méthodes

3. Dans le contexte de la marque NF VALIDATION, une confirmation de la présence de *Listeria* spp. autres que *L. monocytogenes* effectuée sur une seule colonie est suffisante ; elle doit être effectuée de l'une des façons suivantes :
 - a. À l'aide des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées CEN ou ISO (y compris l'étape de purification).
 - b. À l'aide de sondes nucléiques comme décrit dans la norme ISO 7218 (par exemple, iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, n° de référence 3578113) avec des colonies isolées (avec ou sans étape de purification).
 - c. Repiquage par spot d'au moins une colonie isolée sur une boîte gélosée AL ou PALCAM. Jusqu'à 15 colonies peuvent être confirmées sur une seule boîte gélosée AL ou PALCAM.
 - e. À l'aide de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION fondée sur un principe différent de celui de RAPID'L.mono Agar. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être suivi dans sa totalité. Toutes les étapes antérieures à l'étape de détection utilisée comme point de départ pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.
4. Les colonies suspectes peuvent être confirmées en utilisant le test MALDI Biotyper (le système Biotyper de Bruker comprend un spectromètre de masse MALDI time-of-flight et du logiciel MBT Compass, version 4) directement à partir d'une colonie isolée ou après une étape de purification. Cette option est certifiée par MicroVal selon la norme ISO 16140-6 (2017LR75).
5. En cas de résultats discordants (présumé positif avec RAPID'Lmono, négatif avec la méthode de confirmation), le laboratoire doit suivre les étapes nécessaires pour garantir la validité du résultat obtenu.
6. En cas de résultat positif confirmé pour *L. monocytogenes* avec la méthode de dénombrement RAPID'L.mono, il n'est pas nécessaire de répéter l'étape de confirmation de *L. monocytogenes* avec la méthode de détection RAPID'L.mono pour un même échantillon.
7. Dans le contexte du protocole de dénombrement, confirmer moins de cinq colonies comporte un risque de surestimation dû à la présence de colonies typiques qui ne seraient pas *L. monocytogenes*.

Section 9 Confirmation d'autres méthodes




Confirmation des résultats positifs avec les kits iQ-Check *Listeria* spp. et iQ-Check *Listeria monocytogenes* II (protocole certifié NF VALIDATION)

1. À l'aide d'une anse stérile, strier 100 µl de bouillon d'enrichissement (LSB ou Fraser ½) sur RAPID'Lmono Agar.
2. Incuber les boîtes à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.

Section 10 Performance du test et validations

3. Sur RAPID'Lmono Agar, les *L. monocytogenes* forment des colonies bleu pâle, gris-bleu à bleu foncé ; les autres *Listeria* spp. forment des colonies de couleur blanche ou jaune pâle, avec ou sans halo jaune.

Section 10 Performance du test et validations

Certification	Domaine	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
AOAC-RI	Brie, surimi, salade composée et dinde traiteur	Performance Tested Methods	FDA BAM Chap. 10 USDA MLG 8.11	 License* 030406
NORDVAL	Tous les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et les échantillons environnementaux de production	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) NF EN ISO 11290-2 (2017)	 NordVal n° 022
NF VALIDATION	Tous les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et les échantillons environnementaux de production	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) EN ISO 11290-2 (2017)	 BRD : 07/04-09/98 BRD : 07/05-09/01 MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO-ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 Références

Amilli A, Goldfine H, and Portnoy DA. (1991). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 173, 751-754.

Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis D.W, Holzapfel W. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *Int J Food Microbiol* 109, 127-131.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. (1990). Enhanced haemolysis agar (EHA)—an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* *Food Microbiol* 8, 37-49.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. 1990: Performance of enhanced haemolysis agar compared to Oxford medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food enrichment broths. *Food Microbiol* 8, 51-62.

Section 11 Références

Foret J and Dorey F (1997). Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru. *Sciences des Aliments* 17, 219-225.

Heisick JE, Rosas-Marty LI and Tatini SR. (1995). Enumeration of Viable *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* in Foods. *J Food Prot* 58, 733-736.

ISO 6887-1:2017 – Microbiologie de la chaîne alimentaire – Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.

ISO 18593:2018 - Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthodes horizontales pour les prélèvements de surface

ISO 11290-1:2017 - Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. — Partie 1 : Méthode de recherche.

ISO 11290-2:2017 - Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. — Partie 2 : Méthode de dénombrement.

Karpiskova R., Pejchalova M., Mokrosova J, Vytrasova J, Smuharova P, Ruprich J. (2000). Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. *J Microbiol Methods* 41, 267-271.

Leclercq A (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'Lmono and ALOA solid media. *J Microbiol Methods* 57, 251-258.

Manafi M (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol* 60,205-218.

Mengaud J, Braun-Breton C, and Cossart P. (1991). Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol Microbiol*, 5, 367-372.

Notermans SH, Dufrenne J. et al. (1991). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl Envir Microbiol* 57, 2666-2670.

Polivka C (2001). Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium RAPID'/.*mono*. *Arch Lebensmittelhygiene* 52, 22-23.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online at <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlq-8.pdf?MOD=AJPERES>

United States Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 10 *Listeria monocytogenes*. Online at <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>

Section 12 Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Mars 2020	10000127436 Ver A	- Modification importante - Nouvelle conception de document - Modification du numéro de document – version précédente RAPID L.mono V14 01 juillet 2019
Juin 2021	10000127436 Ver B	- Modification mineure - Renouvellement de NF VALIDATION
Mai 2023	10000127436 Ver C	- Modification mineur - Précision de la confirmation par MALDI Biotyper - Précision de la confirmation des <i>L. monocytogenes</i> - Renouvellement de la NF VALIDATION - Mise à jour des références

Visiter www.bio-rad.com/rapidmedia pour plus d'informations sur la gamme complète de milieux chromogènes RAPID.

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc. IQ-CHECK est une marque déposée de Bio-Rad Europe, GmbH dans certaines circonscriptions. Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

RAPID'*L.mono* Agar

Anwenderhandbuch

Selektives chromogenes Medium zum Nachweis und zur Zählung von *Listeria monocytogenes* und anderen *Listeria*-Spezies in Lebensmitteln für den menschlichen Verzehr sowie in Umweltproben

Katalog-Nr. 3563694, gebrauchsfertige Agarplatten, 20 Agarplatten x 90 mm

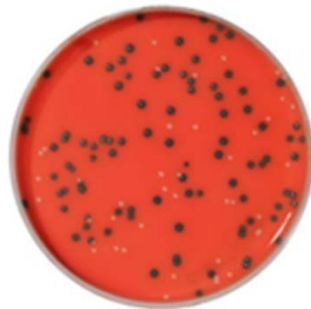
Katalog-Nr. 3563964, gebrauchsfertige Agarplatten, 120 Agarplatten x 90 mm

Katalog-Nr. 3555294, gebrauchsfertiges Kit (für 200 ml), inkl. Agar in Flaschen, Supplemente

Katalog-Nr. 3564293, Dehydriert, 500 g

Katalog-Nr. 3564294, Supplement 1, gefriergetrocknet, 10 Fläschchen

Katalog-Nr. 3564746, Supplement 2, flüssig, 10 Fläschchen



BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Section 1	Einleitung	1
Section 2	Prinzip von RAPID' <i>L.mono</i>	1
Section 3	Theoretische Zusammensetzung	1
Section 4	Haltbarkeit und Lagerung	2
Section 5	Zusätzlich benötigtes Material	2
	Geräte	2
	Zubehör.....	2
Section 6	Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle	3
Section 7	Protokoll.....	4
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums.....	4
	Zubereitung des abgefüllten Mediums	5
	Nachweis von <i>L. monocytogenes</i> und <i>Listeria</i> als Gattung.....	5
	Zählung von <i>L. monocytogenes</i>	6
Section 8	Bestätigung positiver Ergebnisse	6
Section 9	Bestätigung anderer Methoden	7
Section 10	Testleistung und Testvalidierungen.....	8
Section 11	Literatur.....	8
Section 12	Revisionshistorie.....	10

Section 1 Abschnitt 1 Einleitung

In der Lebensmittelindustrie kommt es immer wieder zu sicherheitsrelevanten Ausbrüchen von *Listeria monocytogenes*. Listerien stellen ein Gesundheitsrisiko dar, weil sie bei gekühlten Temperaturen in verzehrfertigen, verarbeiteten Nahrungsmitteln überleben und sich, wenngleich langsam, vermehren können. *Listeria monocytogenes* ist ein besonders problematischer Erreger, da er schwerwiegende Erkrankungen verursachen und auch zum Tod führen kann, insbesondere bei immungeschwächten Personen, Neugeborenen und älteren Menschen. Bei schwangeren Frauen kann eine Infektion zu einer Totgeburt oder Fehlgeburt führen. Eine Listeriose äußert sich durch Symptome wie Fieber, Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall und ist mit einer Sterberate von 30 % verbunden, die bei besonders anfälligen Personen noch höher liegt. Ungefähr 90 % aller gemeldeten Fälle von Listeriose erfordern eine stationäre Behandlung. Eine schnelle und korrekte Befundung hängt von der Verfügbarkeit einer schnellen Kulturmethode ab.

Section 2 Abschnitt 2 Prinzip von RAPID'*L.mono*

Die Funktionsweise von RAPID'*L.mono* beruht auf dem spezifischen Nachweis der Phospholipase C (PIPLC)-Aktivität von *L. monocytogenes* und auf der Unfähigkeit dieser Spezies, Xylose zu metabolisieren. Nach 24-stündiger Inkubation bildet *L. monocytogenes* charakteristisch blaue (hellblaue, graublaue bis dunkelblaue) Kolonien ohne gelben Hof. Kolonien, die von anderen *Listeria*-Spezies gebildet werden, sind weiß, mit oder ohne gelben Hof. *Listeria ivanovii* bildet blaugrüne Kolonien mit gelbem Hof (aufgrund des Vorhandenseins von Xylose). Dieser Hof kann nach 24-48-stündiger Inkubation sichtbar werden. Die selektive Lösung im Medium ermöglicht die Hemmung des Wachstums der meisten Begleitflora (grampositive und gramnegative Bakterien, Hefen und Schimmelpilze). RAPID'*L.mono* ermöglicht eine schnelle und spezifische Identifizierung von *L. monocytogenes* innerhalb von 24 Stunden und anderer *Listeria*-Spezies innerhalb von 24-48 Stunden nach Standardvorbereitung der Proben.

Section 3 Abschnitt 3 Theoretische Zusammensetzung

Peptone	30 g
Fleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	1 g
Lithiumchlorid	9 g
Xylose	10 g
Phenolrot	0,12 g
Wachstumsaktivatoren	2 g
Chromogene Lösung	1 ml
Selektive Lösung	20 ml
Agar B	13 g
Destilliertes Wasser	qsp 1.000 ml

Finaler pH-Wert bei 25 °C = 7,2 ± 0,2

Section 4 Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydrierter Agar: Trocken und lichtgeschützt in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 2–8 °C.
- Gebrauchsfertige Agarplatten: Lichtgeschützt in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 2–8 °C.
- Aus dehydriertem Agar hergestellte Agarplatten: 1 Woche bei trockener und lichtgeschützter Lagerung in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 2–8 °C

Section 5 Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Heizplatte
- Waage, bis auf 0,1 g genau
- Rührer/Homogenisator
- Thermostatisch kontrollierter Inkubator oder Inkubationskammer, bis auf ± 1 °C genau
- Wasserbad

Zubehör

- Bestätigung:
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (Katalog-Nr. 3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (Katalog-Nr. 3578113)
 - *Listeria* Agar nach Ottaviani und Agosti (z. B. Katalog-Nr. 3563695, 20 gebrauchsfertige Agarplatten x 90 mm; 3563965, 120 gebrauchsfertige Agarplatten x 90 mm; 3555200, 6 Flaschen x 250 ml; 3564043, dehydriert, 500 g; 3564041, AL Supplement 1, 10 Fläschchen; 3564042, AL Supplement 2, 10 Fläschchen)
 - PALCAM Agar (z. B. Katalog-Nr. 3564754, dehydriert, 500 g; 3564752, Supplement, 10 Fläschchen)
 - Rhamnose-Test (Katalog-Nr. 3553669, 28 Fläschchen x 1 ml)
- Verdünnungsmittel zum Zählen, Tryptonsalz (Katalog-Nr. 3555754, 25 Röhrchen x 9 ml; 3555756, 6 Flaschen x 90 ml; 3555796, 4 Beutel x 3 L; 3564544, 500 g)
- Anreicherungsmedium, Halb Fraser Bouillon (Katalog-Nr. 3555797, 6 Flaschen x 225 ml; 3555794, 4 Beutel x 3 L; 3564604, dehydriert, 500 g; 3564616, Supplement, 10 Fläschchen)
- Impfösen und Impfspatel

Section 6 Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

- Reaktivierungsmedium, gepuffertes Peptonwasser (GPW; Buffered Peptone Water, BPW) (Katalog-Nr. 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3564684, dehydriert, 500 g; 3555790, 2 Beutel x 5 L; 3555795, 4 Beutel x 3 L)
- Sterile Petrischalen
- Sterile Pipetten
- Sterile Probenbeutel

Section 6 Abschnitt 6 Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen, lebenden Bakterien wie *L. monocytogenes* sollten angemessene Schutzvorkehrungen getroffen werden (zum Beispiel Handschuhe und Laborkittel tragen).
- Medien, die mit Nahrungsmittelproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen zu entsorgen.
- Zu langes Überhitzen des Produkts beim Schmelzen vermeiden.
- Die Petrischalen vor der Verwendung von RAPID'*L.mono* Agar gemäß der Norm EN ISO 7218 bei 25–50 °C trocknen lassen, bis die Tröpfchen von der Oberfläche des Mediums verschwunden sind. Längeres Trocknen ist jedoch zu vermeiden, um die Effizienz des Mediums nicht zu verändern.
- Bei Anwendung der Zählmethode das Medium mit einem Impfspatel inokulieren. Nach dem Ausstreichen können die Schalen vor der Inkubation 15–30 min stehen gelassen werden, damit das Inokulum vom Agar aufgenommen werden kann.
- Bei abgefülltem RAPID'*L.mono* Agar ist eine weiße Ablagerung am Boden der Flasche normal. Zur Resuspendierung und zur Sicherstellung einer ausreichenden Homogenität ist es wichtig, den geschmolzenen Inhalt der Flasche zu schwenken, wenn diese aus dem kochenden Wasserbad genommen wird, und ihn sofort nach Zugabe der Supplemente in die Schalen zu gießen.
- RAPID'*L.mono* Agar ist vor dem Inokulieren rot bis rot-orangefarben und opak. Es kann eine gewisse Farbabweichung auftreten, ohne dass die Effizienz des Mediums dadurch beeinträchtigt würde.

Anwendungsbeschränkungen

- In Schafsmilch kommt ein *L. ivanovii*-Stamm mit langsamer Aktivität zur Spaltung von Xylose vor. Dieser typische Stamm ist selbst nach 48 hr auf RAPID'*L.mono* Agar schwer von *L. monocytogenes* zu unterscheiden. Daher ist eine Bestätigung mit dem *Listeria*-Agar nach Ottaviani und Agosti bei Testung von Erzeugnissen aus Schafsmilch nicht empfehlenswert.

Section 7 Protokoll

- Einige seltene Stämme von *L. monocytogenes* zeichnen sich durch langsame PIPLC-Aktivität aus, was zu einer entsprechend langsameren Entwicklung der typischen blauen Farbe führen kann. In solchen Fällen muss die Inkubationsdauer möglicherweise auf 48 hr verlängert werden. Im Rahmen der NF Validation-Studie wurden 200 *L. monocytogenes*-Stämme getestet, von denen keiner eine langsame PIPLC-Aktivität aufwies.
- Im Rahmen der NF-Validierung wurden keine Probenvolumina über 25 g getestet.

Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. Jede Charge des fertigen Produkts wird einer Qualitätskontrolle gemäß EN ISO 11133 unterzogen und gelangt nur dann in den Vertrieb, wenn sie die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Dokumente im Zusammenhang mit der Herstellung und der Überprüfung jeder Charge werden archiviert.
- Das Sicherheitsdatenblatt und das Analysezertifikat für das Produkt sind im Internet auf www.bio-rad.com erhältlich.

Section 7 Abschnitt 7 Protokoll

Vorbereitung des dehydrierten Mediums

1. Die Flasche vor jedem Gebrauch schütteln.
2. 68,1 g Pulver werden in 950 ml destilliertem Wasser gelöst und zu einer homogenen Suspension gemischt.
3. Langsam unter Rühren erwärmen und zum Kochen bringen (maximal 2 min). Zu langes und starkes Erhitzen vermeiden.
4. Das Medium in einem Wasserbad auf 45–50°C abkühlen lassen.
5. 2 Fläschchen Supplement 1, jeweils mit 14 ml sterilem Wasser rekonstituiert, unter sterilen Bedingungen zugeben und homogenisieren.
6. 2 Fläschchen Supplement 2 unter sterilen Bedingungen zugeben und homogenisieren.
7. Dazu gegebenenfalls mit einem Magnetrührer mischen.
8. In Petrischalen geben.
9. Auf einer kühlen, ebenen Fläche fest werden lassen.
10. Die Schalen nicht aufeinander stapeln.
11. 500 g Pulver ergeben 7,4 L Medium.

Zubereitung des abgefüllten Mediums

1. In einem kochenden Wasserbad den Inhalt der Flasche mit RAPID'*L.mono* Agar schmelzen lassen.
2. Aus dem Wasserbad nehmen und den Flascheninhalt schwenken, um die weiße Ablagerung in Suspension zu bringen.
3. Die Flasche in einem Wasserbad auf 47–50 °C abkühlen lassen. Vor der Zugabe der Supplemente den Flascheninhalt schwenken.
4. 1 Fläschchen Supplement 1, mit 14 ml sterilem Wasser rekonstituiert, und 1 Fläschchen Supplement 2 unter sterilen Bedingungen zugeben.
5. Gründlich mischen. Schaumbildung vermeiden.
6. Das Medium sofort in Petrischalen gießen.
7. Auf einer kühlen, ebenen Fläche fest werden lassen.
8. Die Schalen nicht aufeinander stapeln.
9. Mit einem Kit können ungefähr 13 Agarplatten hergestellt werden.

Nachweis von *L monocytogenes* und *Listeria* als Gattung

1. n g oder n ml Probe in $9 \times n$ ml Halb Fraser Bouillon verdünnen. Mit dem Rührer / Homogenisator homogenisieren.
2. Bei 30 ± 1 °C für 24 ± 2 hr inkubieren.
3. Nach der Anreicherung kann die Bouillon 72 hr bei 2–8°C gelagert werden.
4. 0,1 ml Probe mit einer sterilen Pipette entnehmen und auf den äußeren Rand der Hälfte der Agaroberfläche tropfen.
5. Die Probe mit einer sterilen Pasteurpipette oder einer Impföse in einer Hin- und Herbewegung auf der Hälfte der Agaroberfläche verteilen.
6. Auf der anderen Hälfte der Agaroberfläche die aufgebrachte Menge in relativ engen Streifen vom Rand der zuvor aufgetragenen Menge aus über die gesamte Schale ausstreichen, um Einzelkolonien zu erhalten.
7. Die Platten umdrehen und 24 ± 2 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren.
8. *L. monocytogenes* bildet hellblaue, graublaue bis dunkelblaue runde und glatte Kolonien ohne gelben Hof mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 1–2 mm. Die Intensität der blauen Farbe der Kolonie kann abhängig von der Nahrungsmittelmatrix variieren.
9. Andere *Listeria* spp.-Kolonien sind typischerweise weiß oder blassgelb mit oder ohne gelben Hof und glatter, runder und konvexer Form mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 1–2 mm. *L. ivanovii* bildet blaugrüne Kolonien mit gelbem Hof.

Section 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

10. Wenn in Bezug auf *Listeria* als Gattung (andere als *L. monocytogenes*) ein Ergebnis „nicht nachgewiesen“ erhalten wird, ist eine Inkubationsdauer von 48 hr erforderlich, um das negative Ergebnis zu bestätigen.
11. Nach der Inkubation können die Platten für 72 hr bei 2–8°C gelagert werden.

Zählung von *L. monocytogenes*

1. n g bzw. ml Probe in $9 \times n$ ml GPW verdünnen.
2. 1 hr \pm 5 min bei 20 ± 1 °C inkubieren. Dieser Schritt ist optional. Der Schritt der Wiederbelebung wurde nicht in der Studie zur Erneuerung der 2018 NF Validierung beantragt.
3. 0,1 ml auf einer Platte ausstreichen.
4. Gegebenenfalls eine Verdünnung von 1:10 (oder mehr) in Tryptonsalz oder GPW gemäß der Norm ISO 6887 herstellen und 0,1 ml jeder Verdünnung auf einer Platte ausstreichen.
5. Wenn die zu schätzende Keimzahl gering ist, 1 ml Probe auf drei Agarplatten mit 90 mm Durchmesser (~0,33 ml/Agarplatte) oder in einer Agarplatte mit 140 mm Durchmesser verteilen (NF VALIDATION-zertifiziertes Protokoll). Alternativ kann auch 1 ml auf zwei Platten mit 90 mm Durchmesser ausgestrichen werden (nicht NF VALIDATION-zertifiziert).
6. Die Platten umdrehen und 24 ± 2 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren.
7. Die Platten ablesen und die Anzahl der typischen Kolonien zählen. Nur solche Petrischalen zählen, die maximal 150 charakteristische Kolonien und insgesamt maximal 300 Kolonien enthalten.
8. Die Norm EN ISO 7218 enthält Informationen zum Beimpfen, Zählen von Kolonien sowie zum Berechnen und Angeben der Ergebnisse.

Section 8 Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

1. Im Rahmen einer AOAC-Validierung vermutete Einzelkolonien nach dem klassischen Bestätigungstestverfahren, das in den Standardreferenzmethoden beschrieben ist, bestätigen.
2. Im Rahmen der NF-Validierung ist die Bestätigung von *L. monocytogenes* mit lediglich einer Kolonie anhand einer der folgenden Methoden ausreichend:
 - a. Mit den in CEN- oder ISO-Normen beschriebenen herkömmlichen Tests (einschließlich des Reinigungsschritts).
 - b. Durch Verwendung von Nukleinsonden wie in der Norm ISO 7218 beschrieben (z. B. iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, Katalog-Nr. 3578124) unter Verwendung von Einzelkolonien (mit oder ohne Reinigungsschritt).
 - c. Bestätigung durch einen Rhamnose-Test (Katalog-Nr. 3553669).
 - d. Durch Verwendung einer anderen NF VALIDATION-zertifizierten Methode, die auf einem anderen Testprinzip als dem von RAPID'*L. mono* beruht. Das validierte Protokoll dieser zweiten Methode muss ohne Abwandlungen durchgeführt werden. Alle Schritte vor dem

Section 9 Bestätigung anderer Methoden

Nachweisschritt als Ausgangspunkt für die Bestätigung müssen in beiden Methoden identisch sein.

3. Im Rahmen der NF-Validierung ist die Bestätigung von anderen *Listeria* spp. als *L. monocytogenes* mit lediglich einer Kolonie anhand einer der folgenden Methoden ausreichend:
 - a. Mit den in CEN- oder ISO-Normen beschriebenen herkömmlichen Tests (einschließlich des Reinigungsschritts).
 - b. Durch Verwendung von Nukleinsonden wie in der Norm ISO 7218 beschrieben (z. B. iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, Katalog-Nr. 3578113) unter Verwendung von Einzelkolonien (mit oder ohne Reinigungsschritt).
 - c. Durch erneutes Picken und Identifizierung von mindestens einer isolierten Kolonie auf einer AL- oder PALCAM-Agarplatte. Auf einer AL- oder PALCAM-Agarplatte können bis zu 15 Kolonien bestätigt werden.
 - e. Durch Verwendung einer anderen NF VALIDATION-zertifizierten Methode, die auf einem anderen Testprinzip als dem von RAPID'*L.mono* beruht. Das validierte Protokoll dieser zweiten Methode muss ohne Abwandlungen durchgeführt werden. Alle Schritte vor dem Nachweisschritt als Ausgangspunkt für die Bestätigung müssen in beiden Methoden identisch sein.
4. Verdächtige Kolonien können durch die Verwendung des MALDI Biotyper Tests (Bruker's Biotyper System inklusive des MALDI TOF (time-of-flight) Massenspektrometers und der MBT Compass Software, Version 4) direkt aus einer isolierten Kolonie oder nach einem Aufreinigungsschritt, bestätigt werden. Diese Option ist von MicroVal gemäß ISO 16140-6 (2017LR75) zertifiziert.
5. Bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen (vermutlich positiv auf RAPID'*L.mono*, negativ mit der Bestätigungsmethode) muss das Labor die erforderlichen Schritte ausführen, um die Validität des erhaltenen Ergebnisses sicherzustellen.
6. Im Fall eines positiven Ergebnisses, das das Vorhandensein von *L. monocytogenes* mit der RAPID'*L.mono* Zählmethode bestätigt, ist es nicht notwendig den Bestätigungsschritt für *L. monocytogenes* der selben Probe zu duplizieren, die mit der RAPID'*L.mono* Nachweismethode untersucht wurde.
7. Bei Verwendung des Protokolls für die Zählung besteht bei der Bestätigung von weniger als fünf Kolonien das Risiko einer zu hohen Einschätzung, da typische Kolonien vorhanden sind, bei denen es sich nicht um *L. monocytogenes* handelt.

Section 9 Abschnitt 9 Bestätigung anderer Methoden




Bestätigung positiver Ergebnisse mit dem iQ-Check *Listeria* spp. und dem iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (von NF VALIDATION-zertifiziertes Protokoll)

1. Mit einer sterilen Impföse 100 µl Anreicherungsbouillon (LSB oder Halb Fraser Bouillon) auf RAPID'*L.mono* Agar ausstreichen.

Section 10 Testleistung und Testvalidierungen

2. Die Platten bei 37 ± 1 °C für 24 ± 2 hr inkubieren.
3. *L. monocytogenes* bildet auf RAPID'*L.mono* Agar hellblaue, graublau bis dunkelblaue Kolonien und andere *Listeria* spp. weiße oder blassgelbe Kolonien mit oder ohne gelben Hof.

Section 10 Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierungen

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
AOAC-RI	Weichkäse, Surimi, Mischsalat, Truthahnaufschnitt	Leistungsgeprüfte Methoden	FDA BAM Chap. 10 USDAMLG8.11	 Lizenznr. 030406
NORDVAL	Alle Lebensmittelproben und Umgebungsproben aus dem Bereich Produktion	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) NF EN ISO 11290-2 (2017)	 NordVal #022
NF VALIDATION	Alle Lebensmittelproben und Umgebungsproben aus dem Bereich Produktion	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) EN ISO 11290-2 (2017)	 BRD: 07/04-09/98 BRD: 07/05-09/01 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR- Zertifizierungsstelle http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 Abschnitt 11 Literatur

Amilli A, Goldfine H, and Portnoy DA. (1991). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 173, 751-754.

Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis D.W, Holzapfel W. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *Int J Food Microbiol* 109, 127-131.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. (1990). Enhanced haemolysis agar (EHA)—an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* *Food Microbiol* 8, 37-49.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. 1990: Performance of enhanced haemolysis agar compared to Oxford medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food enrichment broths. *Food Microbiol* 8, 51-62.

Section 11 Literatur

Foret J and Dorey F (1997). Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru. *Sciences des Aliments* 17, 219-225.

Heisick JE, Rosas-Marty LI and Tatini SR. (1995). Enumeration of Viable *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* in Foods. *J Food Prot* 58, 733-736.

ISO 6887-1:2017 – Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen - Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen

ISO 18593:2018 – Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen

ISO 11290-1:2017 - Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* und von *Listeria* spp. - Teil 1: Nachweisverfahren.

ISO 11290-2:2017 - Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* und von *Listeria* spp. - Teil 2: Zählverfahren.

Karpiskova R., Pejchalova M., Mokrosova J, Vytrasova J, Smuharova P, Ruprich J. (2000). Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. *J Microbiol Methods* 41, 267-271.

Leclercq A (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'Lmono and ALOA solid media. *J Microbiol Methods* 57, 251-258.

Manafi M (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol* 60,205-218.

Mengaud J, Braun-Breton C, and Cossart P. (1991). Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol Microbiol*, 5, 367-372.

Notermans SH, Dufrenne J. et al. (1991). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl Envir Microbiol* 57, 2666-2670.

Polivka C (2001). Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium RAPID'..mono. *Arch Lebensmittelhygiene* 52, 22-23.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* horn Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online at <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlq-8.pdf?MOD=AJPERES>

United States Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 10 *Listeria monocytogenes*. Online at <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>

Section 12 Abschnitt 12 Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
März 2020	10000127436 Ver A	- Bedeutende Änderung - Neue Aufmachung des Dokuments - Änderung der Dokumentnummer – vorhergehende Version RAPID' <i>L.mono</i> V14 01. Juli 2019
Juni 2021	10000127436 Ver B	- Kleine Änderung - Erneuerung der NF VALIDATION
Mai 2023	10000127436 Ver C	- Kleinere Änderung - Klarstellung der Bestätigung durch MALDI Biotyper - Klarstellung der Bestätigung von <i>L. monocytogenes</i> - Erneuerung der NF Validation - Aktualisierung der Referenzen

Weitere Informationen über unser vollständiges Angebot an chromogenen RAPID Medien finden Sie bei uns im Internet auf www.bio-rad.com/rapidmedia.

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc. IQ-CHECK ist in bestimmten Ländern eine Marke der Bio-Rad Europe GmbH. Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

RAPID' *L.mono* Agar

Istruzioni per l'uso

Terreno cromogenico selettivo per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* e altre specie di *Listeria* in prodotti alimentari destinati al consumo umano e in campioni ambientali

Numero catalogo 3563694, piastre preparate, 90 mm x 20 piastre

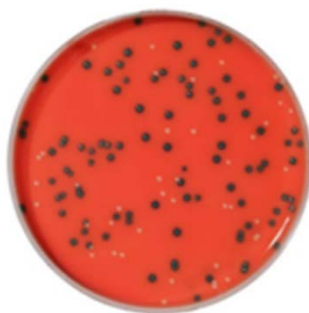
Numero catalogo 3563964, piastre preparate, 90 mm x 120 piastre

Numero catalogo 3555294, Kit pronto per l'uso (per 200 ml), include flacone di terreno di agar e supplementi

Numero catalogo 3564293, in forma disidratata, 500 g

Numero catalogo 3564294, supplemento 1, liofilizzato, 10 flaconi

Numero catalogo 3564746, supplemento 2, liquido, 10 flaconi



BIO-RAD

Indice

Section 1	Introduzione	1
Section 2	Principio di RAPID' <i>L.mono</i>	1
Section 3	Formula teorica.....	1
Section 4	Durata e conservazione.....	2
Section 5	Materiali necessari ma non forniti.....	2
	Apparecchiatura.....	2
	Materiali	2
Section 6	Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità	3
Section 7	Protocollo.....	4
	Preparazione del terreno disidratato	4
	Preparazione del terreno in flacone.....	5
	Rilevazione di <i>L. monocytogenes</i> e del gene <i>Listeria</i>	5
	Conta di <i>L. monocytogenes</i>	6
Section 8	Conferma dei risultati positivi.....	6
Section 9	Conferma di altri metodi.....	7
Section 10	Prestazioni del test e validazioni	8
Section 11	Riferimenti.....	8
Section 12	Cronologia delle revisioni.....	10

Section 1 Introduzione

Gravi focolai di *Listeria monocytogenes* continuano a minare la sicurezza dell'industria alimentare. Il pericolo della *Listeria* deriva dal modo in cui questi batteri riescano, seppur lentamente, a sopravvivere e crescere a basse temperature in alimenti cotti pronti al consumo. La *Listeria monocytogenes* è un agente patogeno particolarmente aggressivo, poiché può essere responsabile di gravi problemi di salute e di possibile morte, soprattutto negli individui immunodepressi, nei neonati e nelle persone anziane. Nelle donne in gravidanza l'infezione è spesso causa di morte fetale endouterina e aborti spontanei. La listeriosi si manifesta con sintomi quali febbre, affaticamento, nausea, vomito e diarrea con un tasso di mortalità del 30% che potrebbe essere superiore negli individui vulnerabili. Circa il 90% dei casi segnalati di listeriosi richiede l'ospedalizzazione. Per ottenere risultati accurati in tempi più brevi, è necessario eseguire un metodo di coltura rapido.

Section 2 Principio di RAPID'*L.mono*

Il principio alla base del terreno RAPID' L.mono si fonda sulla specifica rilevazione dell'attività di fosfolifasi C (PIPLC) della *L. monocytogenes* e sull'incapacità di questa specie di metabolizzare lo xilosio. Dopo 24 hr di incubazione, le *L. monocytogenes* generano caratteristiche colonie di colore blu (da blu chiaro, a grigio-blu a blu scuro) senza alone giallo. Le colonie generate da altre specie di *Listeria* sono di colore bianco con o senza alone giallo. Le *Listeria ivanovii* generano colonie di colore blu-verde con alone giallo (carattere positivo allo xilosio). Questo alone può comparire dopo 24-48 hr di incubazione. La soluzione selettiva del terreno consente di inibire la maggior parte della flora interferente (batteri gram-positivi e gram-negativi, lieviti e muffe). RAPID' L.mono consente di identificare in modo rapido e specifico la *L. monocytogenes* in 24 hr e altre specie di *Listeria* in 24-48 hr dopo la preparazione dei campioni in conformità agli standard.

Section 3 Formula teorica

Peptoni	30 g
Estratto di carne	5 g
Estratto di lievito	1 g
Cloruro di litio	9 g
Xilosio	10 g
Rosso fenolo	0,12 g
Attivatori di crescita	2 g
Soluzione cromogena	1 ml
Soluzione selettiva	20 ml
Agar B	13 g
Acqua distillata	qsp 1.000 ml

pH finale a 25°C = 7,2 ± 0,2

Section 4

Durata e conservazione

- Agar disidratato: 2-8°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo asciutto e buio
- Agar preparato: 2-8°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo buio
- Piastra preparata da agar disidratato: 1 settimana a 2-8°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo asciutto e buio

Section 5

Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Piastra riscaldante
- Bilancia, sensibilità di 0,1 g
- Agitatore/omogeneizzatore
- Incubatore o camera di incubazione con controllo termostatico, con precisione di $\pm 1^\circ\text{C}$
- Bagnomaria

Materiali

- Conferma:
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (numero catalogo 3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (numero catalogo 3578113)
 - Agar *Listeria* secondo Ottaviani e Agosti (ad esempio, numero catalogo 3563695, piastre preparate 90 mm x 20; 3563965, piastre preparate 90 mm x 120; 3555200, 250 ml x 6 flaconi; 3564043, in forma disidratata, 500 g; 3564041, supplemento AL 1, 10 fiale; 3564042, supplemento AL 2, 10 fiale)
 - Agar PALCAM (ad esempio, numero catalogo 3564754, in forma disidratata 500 g; 3564752, supplemento, 10 fiale)
 - Rhamnose test (numero catalogo 3553669, 1 ml x 28 fiale)
- Diluente per enumerazione, sale triptone (numero catalogo 3555754, 9 ml x 25 provette; 3555756, 90 ml x 6 flaconi; 3555796, 3 L x 4 sacche; 3564544, 500 g)
- Terreno di arricchimento, brodo ½ Fraser (numero catalogo 3555797, 225 ml x 6; 3555794, 3 L x 4 sacche; 3564604, in forma disidratata, 500 g; 3564616, supplemento, 10 fiale)

Section 6 Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità

- Anse per inoculazione e spatole
- Terreno di rigenerazione, acqua peptonata tamponata (BPW) (numero catalogo 3554179, 225 ml x 6 bottiglie; 3564684, in forma disidratata 500 g; 3555790, 2 L x 5 sacche; 3555795, 4 L x 3 sacche)
- Piastre di Petri sterili
- Pipette sterili
- Sacchi per pesata sterili con filtro

Section 6 Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità

Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi quali *L. monocytogenes*
- I terreni entrati in contatto con campioni di alimenti devono essere considerati come contaminati e quindi smaltiti in conformità alle normative e direttive locali
- Evitare il surriscaldamento prolungato del prodotto durante la liquefazione
- Prima di utilizzare RAPID' *L.mono* Agar, lasciare asciugare le piastre di Petri conformemente alla norma EN ISO 7218 a 25–50°C fino alla scomparsa delle goccioline dalla superficie del terreno. Evitare, tuttavia, l'asciugatura prolungata che potrebbe alterare la prestazione del terreno
- Quando si fa ricorso al metodo per la conta, inoculare il terreno utilizzando una spatola. Dopo aver utilizzato la spatola, per consentire che l'inoculo venga correttamente assorbito dall'agar, lasciare le piastre come tali sulla superficie di lavoro per 15-30 minuti prima dell'incubazione.
- Quando si utilizza RAPID' *L.mono* Agar in flacone, è possibile che si formi un deposito di colore bianco sul fondo della bottiglia. Per garantire una risospensione e un'omogeneità adeguata, è importante agitare a mano il flacone una volta estratto dal bagnomaria bollente e arrivato a temperatura di fusione e versare immediatamente il contenuto dopo aver aggiunto i supplementi
- Prima dell'inoculazione, RAPID' *L.mono* Agar è di colore rosso/rosso-arancione e opaco. Alcune variazioni di colore possono essere osservate senza alcun impatto sulle prestazioni

Limitazioni d'uso

- Un ceppo di *L. ivanovii* con una lenta attività di metabolizzazione dello xilosio può essere trovato nel latte ovino. È difficile distinguere questo ceppo tipico dal ceppo di *L. monocytogenes*, anche dopo 48 hr sul terreno di coltura RAPID' *L.mono* Agar. Quindi l'utilizzo del terreno AL (Agar *Listeria* according to Ottaviani&Agosti) è sconsigliato per la conferma di test positivi in prodotti a base di latte ovino.

Section 7 Protocollo

- Alcuni rari ceppi di *L. monocytogenes* sono caratterizzati da una lenta attività di PIPLC, che potrebbe essere la causa dello sviluppo tardivo del tipico colore blu. Potrebbe essere necessario prolungare il tempo di incubazione di 48 hr. Durante lo studio di NF VALIDATION, sono stati testati 200 ceppi di *L. monocytogenes* e nessuno di questi ha confermato una lenta attività di PIPLC
- Nell'ambito della NF VALIDATION, non sono stati analizzati i campioni con volume superiore a 25 g

Controllo qualità

- Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo di qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio soltanto se risulta conforme ai criteri di accettazione. La documentazione relativa alla produzione e al controllo qualità di ogni batch viene conservata su file
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare il sito www.bio-rad.com

Section 7 Protocollo

Preparazione del terreno disidratato

1. Agitare sempre il flacone prima dell'uso.
2. Dissolvere 68,1 g di polvere in 950 ml di acqua distillata e miscelare fino ad ottenere una sospensione omogenea.
3. Riscaldare gradualmente mentre è in atto un'agitazione e portare a ebollizione (ebollizione massima 2 minuti). Evitare il surriscaldamento.
4. Raffreddare il terreno a 45-50°C a bagnomaria.
5. Aggiungere in condizioni asettiche 2 fiale di supplemento 1, ciascuna ricostituita con 14 ml di acqua sterile.
6. Aggiungere e omogeneizzare in condizioni asettiche 2 fiale di supplemento 2.
7. Se necessario, miscelare su un agitatore magnetico fino alla dispensazione.
8. Dispensare su piastre di Petri
9. Lasciar agire su una superficie piana e fredda.
10. Non impilare le piastre.
11. Un flacone di polvere da 500 g produce 7,4 L di terreno.

Preparazione del terreno in flacone

1. Raffreddare i contenuti del flacone di RAPID' *L.mono* Agar a bagnomaria bollente.
2. Rimuovere dal calore e agitare a mano i contenuti del flacone per risospendere il deposito bianco.
3. Raffreddare il flacone a 47-50°C a bagnomaria. Agitare a mano i contenuti del flacone prima di aggiungere i supplementi.
4. Aggiungere in condizioni asettiche 1 fiala di supplemento 1, ricostituita con 14 ml di acqua sterile e 1 fiala di supplemento 2.
5. Miscelare accuratamente. Evitare la formazione di schiuma.
6. Versare immediatamente il terreno nelle piastre di Petri.
7. Lasciar agire su una superficie piana e fredda.
8. Non impilare le piastre.
9. Un kit consente la preparazione di circa 13 piastre.

Rilevazione di *L. monocytogenes* e del gene *Listeria*

1. Diluire n g o n ml di campione in $9 \times n$ ml di brodo Fraser 1/2 . Omogeneizzare con un agitatore/ omogeneizzatore.
2. Incubare a 30 ± 1 °C per 24 ± 2 hr.
3. Al termine della fase di arricchimento, il brodo può essere conservato a 2-8°C per 72 hr.
4. Rimuovere 0,1 ml di campione con una pipetta sterile e depositare le gocce sul bordo esterno di metà della superficie di agar.
5. Con una pipetta Pasteur sterile o un'ansa per inoculazione, distribuire il campione su metà della superficie di agar con un movimento di "avanti e indietro".
6. Sull'altra metà della superficie di agar, strisciare per isolamento distribuendo il deposito in strisce relativamente ravvicinate sull'intera piastra dal bordo della distribuzione precedente.
7. Incubare le piastre capovolte a 37 ± 1 °C per 24 ± 2 hr.
8. Le *L. monocytogenes* generano colonie sferiche e lisce dal colore blu chiaro, grigio-blu e blu scuro, senza alone giallo, con un diametro medio di 1-2 mm. L'intensità del blu può variare in base alla matrice alimentare.
9. Altre colonie di *Listeria* spp. sono generalmente di colore bianco o giallo chiaro, con o senza alone giallo, caratterizzate da una forma sferica e da un aspetto liscio e convesso e con un diametro di 1-2 mm. Le *L. ivanovii* generano colonie blu-verdi con alone giallo.
10. Nel caso in cui il target del gene *Listeria* (all'infuori di *L. monocytogenes*) risulti "non rilevato", per ottenere un risultato negativo sono necessarie 48 hr di incubazione.

Section 8 Conferma dei risultati positivi

11. Al termine della fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a 2-8°C per 72 hr.

Conta di *L. monocytogenes*

1. Diluire n g o ml di campione in $9 \times n$ ml di BPW.
2. Incubare a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ per $1 \text{ hr} \pm 5$ minuti. Questo passaggio è facoltativo: lo step di reattivazione non è stato applicato durante il rinnovo della NF VALIDATION del 2018.
3. Distribuire 0,1 ml su una piastra.
4. Se necessario, eseguire una diluizione 1:10 (o più) in sale triptone o BPW conformemente alla norma ISO 6887 e distribuire 0,1 ml di ciascuna diluizione su una piastra.
5. Se si stimano numeri ridotti, distribuire 1 ml di campione su tre piastre da 90 mm (~0,33 ml/piastra) o su una piastra da 140 mm (protocollo certificato da NF VALIDATION). È inoltre possibile distribuire 1 ml su due piastre da 90 mm (protocollo non certificato da NF VALIDATION).
6. Incubare le piastre capovolte a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 hr.
7. Leggere le piastre e contare le colonie tipiche. Contare solo le piastre contenenti un massimo di 150 colonie caratteristiche e un massimo di 300 colonie in totale.
8. Fare riferimento alla norma EN ISO 7218 per l'inoculazione, la conta delle colonie, il calcolo e l'espressione dei risultati.

Section 8 Conferma dei risultati positivi

1. Nell'ambito della validazione AOAC, confermare le colonie isolate sospette secondo la tradizionale procedura del test di conferma descritta nei metodi di riferimento standard.
2. Nell'ambito della NF VALIDATION, per la *L. monocytogenes* è sufficiente la conferma eseguita su un'unica colonia sulla base di uno dei seguenti metodi:
 - a. Utilizzando i test convenzionali descritti nei metodi standard CEN o ISO (inclusa la fase di purificazione).
 - b. Mediante sonde nucleiche, come descritto nella norma ISO 7218 (ad esempio, con iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, numero catalogo 3578124) utilizzando colonie isolate (con o senza fase di purificazione).
 - c. Utilizzando il Rhamnose test (numero catalogo 3553669)
 - d. Utilizzando qualsiasi altro metodo certificato di NF VALIDATION basato su un principio diverso rispetto a quello di RAPID' *L. mono*. Il protocollo validato del secondo metodo deve essere rispettato interamente. Tutte le fasi che precedono la fase di ricerca usata come punto di inizio per la conferma devono essere comuni a entrambi i metodi.

Section 9 Conferma di altri metodi

3. Nell'ambito della NF VALIDATION, per le *Listeria* spp. diverse dalla *L. monocytogenes* è sufficiente la conferma eseguita su un'unica colonia sulla base di uno dei seguenti metodi:
 - a. Utilizzando i test convenzionali descritti nei metodi standard CEN o ISO (inclusa la fase di purificazione).
 - b. Mediante sonde nucleiche, come descritto nella norma ISO 7218 (ad esempio, con iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, numero catalogo 3578113) utilizzando colonie isolate (con o senza fase di purificazione).
 - c. Prelevando nuovamente ed eseguendo l'inoculazione spot di almeno una colonia isolata su una piastra di agar PALCAM. È possibile confermare fino a 15 colonie su una singola piastra di agar AL o PALCAM.
 - e. Utilizzando qualsiasi altro metodo certificato di NF VALIDATION basato su un principio diverso rispetto a quello di RAPID' *L.mono* Agar. Il protocollo validato del secondo metodo deve essere rispettato interamente. Tutte le fasi che precedono la fase di ricerca usata come punto di inizio per la conferma devono essere comuni a entrambi i metodi.
4. Le colonie sospette possono essere confermate utilizzando il test MALDI Biotyper (il sistema Biotyper di Bruker include uno spettrometro di MALDI TOF e il software MBT Compass, versione 4) direttamente da una colonia isolata o dopo una fase di purificazione. Questa opzione è certificata da MicroVal secondo ISO 16140-6 (2017LR75).
5. In caso di risultati discordanti (presunto positivo con RAPID' *L.mono*, negativo con metodo di conferma), il laboratorio deve seguire le fasi necessarie per garantire la validità del risultato ottenuto.
6. In caso di risultato positivo confermato per *L. monocytogenes* con il metodo di enumerazione RAPID'*L.mono*, non è necessario ripetere la fase di conferma di *L. monocytogenes* per lo stesso campione testato con il metodo di rilevamento RAPID'*L.mono*.
7. Quando si utilizza il protocollo di enumerazione, confermare meno di cinque colonie comporta il rischio di sovrastima a causa della presenza di colonie tipiche che potrebbero non essere *L. monocytogenes*.

Section 9 Conferma di altri metodi




Conferma dei risultati positivi con il kit iQ-Check *Listeria* spp. e il kit iQ-Check *Listeria monocytogenes* II (protocollo certificato da NF VALIDATION)

1. Utilizzando un'ansa sterile, strisciare 100 µl di brodo di arricchimento (brodo LSB o Fraser 1/2) su RAPID' *L.mono* Agar.
2. Incubare le piastre a 37 ± 1°C per 24 ± 2 hr.

Section 10 Prestazioni del test e validazioni

3. Le *L. monocytogenes* generano colonie di colore blu chiaro, grigio-blu e blu scuro, mentre altre *Listeria* spp. generano colonie bianche o giallo chiaro con o senza alone giallo su RAPID' *L.mono* Agar.

Section 10 Prestazioni del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
AOAC-RI	Formaggio Brie, surimi, insalata mista, tacchino	Performance Tested Methods	FDA BAM Cap. 10 USDAMLG8.11	 Licenza* 030406
NORDVAL	Tutti i prodotti alimentari destinati al consumo umano e i campioni ambientali di produzione	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) NF EN ISO 11290-2 (2017)	 NordVal n. 022
NF VALIDATION	Tutti i prodotti alimentari destinati al consumo umano e i campioni ambientali di produzione	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) EN ISO 11290-2 (2017)	 BRD: 07/04-09/98 BRD: 07/05-09/01 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR Certificazione http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 Riferimenti

Amilli A, Goldfine H, and Portnoy DA. (1991). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 173, 751-754.

Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis D.W, Holzapfel W. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *Int J Food Microbiol* 109, 127-131.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. (1990). Enhanced haemolysis agar (EHA)—an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* *Food Microbiol* 8, 37-49.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. 1990: Performance of enhanced haemolysis agar compared to Oxford medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food enrichment broths. *Food Microbiol* 8, 51-62.

Foret J and Dorey F (1997). Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru. *Sciences des Aliments* 17, 219-225.

Section 11 Riferimenti

Heisick JE, Rosas-Marty LI and Tatini SR. (1995). Enumeration of Viable *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* in Foods. *J Food Prot* 58, 733-736.

ISO 6887-1:2017 – Microbiologia della catena alimentare – Preparazione dei campioni di prova, della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali per l'analisi microbiologica – Parte 1: Regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali.

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling.

ISO 11290-1:2017 -Microbiologia della catena alimentare - Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. - Parte 1: Metodo per la ricerca.

ISO 11290-2:2017 -Microbiologia della catena alimentare - Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. - Parte 2: Metodo per la conta.

Karpiskova R., Pejchalova M., Mokrosova J, Vytrasova J, Smuharova P, Ruprich J. (2000). Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. *J Microbiol Methods* 41, 267-271.

Leclercq A (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'Lmono and ALOA solid media. *J Microbiol Methods* 57, 251-258.

Manafi M (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol* 60,205-218.

Mengaud J, Braun-Breton C, and Cossart P. (1991). Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol Microbiol*, 5, 367-372.

Notermans SH, Dufrenne J. et al. (1991). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl Envir Microbiol* 57, 2666-2670.

Polivka C (2001). Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium RAPID'..mono. *Arch Lebensmittelhygiene* 52, 22-23.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online at <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlq-8.pdf?MOD=AJPERES>

United States Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 10 *Listeria monocytogenes*. Online at <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>

Section 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Marzo 2020	10000127436 Ver A	- Modifica importante - Nuova struttura del documento - Modifica al numero di documento – versione precedente RAPID L.mono V14 01 luglio 2019
Giugno 2021	10000127436 Ver B	- Piccola modifica - Rinnovo di NF VALIDATION
Maggio 2023	10000127436 Ver C	- Piccola modifica - Chiarimento conferma con MALDI Biotiper - Chiarimento conferma <i>L. monocytogenes</i> - Rinnovo NF VALIDATION - Aggiornamento riferimenti

Per ulteriori informazioni sulla nostra gamma completa di terreni cromogenici RAPID, visitare il sito www.bio-rad.com/rapidmedia.

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc. IQ-CHECK è un marchio registrato di Bio-Rad Europe GmbH in determinate giurisdizioni. Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi titolari.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

RAPID' *L.mono* Agar

Guia do usuário

Meio cromogênico seletivo para a detecção e enumeração de *Listeria monocytogenes* e outras espécies de *Listeria* em produtos alimentícios para consumo humano e em amostras ambientais

Nº do catálogo 3563694, Meios de cultura preparados, 90 mm x 20 placas

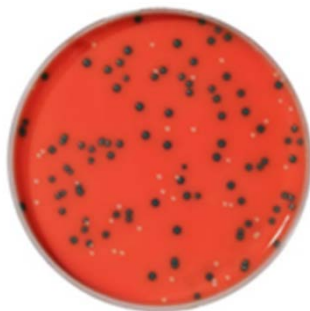
Nº do catálogo 3563964, Meios de cultura preparados, 90 mm x 120 placas

Nº do catálogo 3555294, kit pronto para uso (para 200 ml), inclui meio de ágar engarrafado e suplementos

Nº do catálogo 3564293, Desidratado, 500 g

Nº do catálogo 3564294, Supplement 1, congelar seco, 10 ampolas

Nº do catálogo 3564746, Supplement 2, líquido, 10 ampolas



BIO-RAD

Índice

Section 1	Introdução	1
Section 2	Princípio RAPID' <i>L.mono</i>	1
Section 3	Fórmula Teórica.....	1
Section 4	Prazo de validade e armazenamento	2
Section 5	Materiais necessários, mas não fornecidos	2
	Equipamento.....	2
	Suprimentos.....	2
Section 6	Precauções, limitações de uso e controle de qualidade	3
Section 7	Protocolo.....	4
	Preparação do Meio Desidratado.....	4
	Preparação de Meio Engarrafado	5
	Deteção dos Gêneros <i>L. monocytogenes</i> e <i>Listeria</i>	5
	Contagem de <i>L. monocytogenes</i>	6
Section 8	Confirmação de Resultados Positivos	6
Section 9	Confirmação de outros métodos	7
Section 10	Desempenho e validação do teste	8
Section 11	Referências.....	8
Section 12	Histórico de Revisão.....	10

Section 1 Introdução

Surtos graves de *Listeria monocytogenes* continuam a atormentar a indústria de segurança alimentar. A *Listeria* é perigosa porque pode sobreviver e crescer, ainda que lentamente, em temperaturas refrigeradas em alimentos processados prontos para o consumo. A *Listeria monocytogenes* é um patógeno particularmente problemático, pois pode causar sérios problemas de saúde e possível morte, particularmente em indivíduos imunossuprimidos, recém-nascidos e idosos. A infecção é conhecida por causar natimortos e abortos espontâneos em mulheres grávidas. A listeriose se desenvolve com sintomas como febre, fadiga, náuseas, vômitos e diarreia e tem uma taxa de mortalidade de 30%, mas pode ser maior em indivíduos vulneráveis. Aproximadamente 90% de todos os casos notificados de listeriose resultam em hospitalização. Um método de cultura rápido é necessário para reduzir o tempo de obtenção dos resultados e garantir que esses resultados sejam precisos.

Section 2 Princípio RAPID'*L.mono*

O princípio do meio RAPID'*L.mono* é baseado na detecção específica da atividade de fosfolipase C (PIPLC) do *L. monocytogenes* e na incapacidade desta espécie de metabolizar a xilose. Após 24 hr de incubação, o *L. monocytogenes* forma colônias azuis características (azul claro, de azul acinzentado a azul escuro) sem um halo amarelo. As colônias formadas por outras espécies de *Listeria* são brancas, com ou sem um halo amarelo. A *Listeria ivanovii* forma colônias azul-esverdeadas com um halo amarelo (característica positiva para xilose). Este halo pode aparecer após 24-48 hr de incubação. A solução seletiva no meio permite a inibição da maior parte da flora interferente (bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e bolores). O RAPID'*L.mono* permite uma identificação rápida e específica do *L. monocytogenes* em 24 hr e de outras espécies de *Listeria* em 24-48 hr após a preparação das amostras de acordo com os padrões.

Section 3 Fórmula Teórica

Peptonas	30 g
Extrato de carne	5 g
Extrato de levedura	1 g
Cloreto de lítio	9g
Xilose	10 g
Vermelho de fenol	0,12 g
Ativadores do crescimento	2 g
Solução cromogênica	1 ml
Solução seletiva	20 ml
Ágar B	13 g
Água destilada	qsp 1.000 ml

pH final a 25°C = 7,2 ± 0,2

Section 4

Prazo de validade e armazenamento

- Ágar desidratado: 2-8°C em embalagem cuidadosamente vedada e em ambiente seco e escuro
- Ágar preparado: 2-8°C em embalagem cuidadosamente vedada em ambiente escuro
- Meio de cultura preparado a partir do ágar desidratado: 1 semana a 2-8°C em embalagem cuidadosamente vedada e em ambiente seco e escuro

Section 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Placa de aquecimento
- Escala, sensibilidade de 0,1 g
- Misturador/homogeneizador
- Incubadora ou sala de incubação controlada termostaticamente, com precisão de ± 1 °C
- Banho-maria

Suprimentos

- Confirmação:
 - Kit de detecção de PCR em tempo real iQ-Check *Listeria monocytogenes* II (nº no catálogo 3578124), Kit de detecção de PCR em tempo real iQ-Check *Listeria* spp. (nº no catálogo 3578113)
 - Ágar *Listeria* de acordo com Ottaviani e Agosti (por exemplo, 3563695, placas preparadas de 90 mm x 20; 3563965, placas preparadas de 90 mm x 120; 3555200, 250 ml x 6 frascos; 3564043, desidratado, 500 g; 3564041, AL Suplemento 1, 10 ampolas; 3564042, AL Suplemento 2, 10 ampolas)
 - Agar PALCAM (por exemplo, nº no catálogo 3564754, desidratado 500 g; 3564752, suplemento, 10 ampolas)
 - Teste de Rhamnose (nº no catálogo 3553669, 1 ml x 28 ampolas)
- Diluente para enumeração, sal de triptona (nº no catálogo 3555754, 9 ml x 25 tubos; 3555756, 90 ml x 6 frascos, 3555796, sacos de 3 x 4 L, 3564544, 500 g)
- Meio de enriquecimento, caldo Fraser Vz (nº do catálogo 3555797, 225 ml frascos x 6; 3555794, 3 L x 4 sacos; 3564604, desidratado, 500 g; 3564616, suplemento, 10 ampolas)

Section 6 Precauções, limitações de uso e controle de qualidade

- Inoculação de loops e espalhadores
- Meio de ressuscitação, Água Peptonada Tamponada (BPW), (nº no catálogo 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3564684, desidratado 500 g; 3555790, 2 sacos de 5 L; 3555795, 4 sacos de 3 L)
- Placas de Petri estéreis
- Pipetas estéreis
- Sacos de pesagem estéreis

Section 6 Precauções, limitações de uso e controle de qualidade

Precauções

- Respeite as boas práticas de laboratório (EN ISO 7218). É necessário o uso de proteção adequada, como luvas e jalecos, ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas, como a *L. monocytogenes*
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- Evite o superaquecimento prolongado do produto durante o derretimento
- Antes de utilizar o Ágar RAPID'Lmono, deixe secar as placas de Petri a 25-50°C, até que as gotículas desapareçam da superfície do meio, em conformidade com a norma EN ISO 7218. Evite a secagem prolongada, porém, pois isso poderia alterar o desempenho do meio
- Ao usar o método de enumeração, inocule o meio usando um espalhador. Após espalhar, as placas podem ser deixadas como estão na superfície de trabalho por 15-30 minutos antes da incubação, a fim de permitir que o inóculo seja absorvido corretamente pelo ágar
- Ao usar Ágar engarrafado RAPID'/.mono , um depósito branco no fundo da garrafa é normal. Para garantir a ressuspensão e homogeneidade satisfatória, é importante mexer o frasco manualmente quando ele é retirado dos banhos-maria de água fervente e de derretimento e despejar imediatamente após adicionar os suplementos
- Antes da inoculação, o Ágar RAPID'Lmono é vermelho a vermelho alaranjado e opaco. Alguma variação de cor pode ser observada, sem qualquer impacto no desempenho

Limitações de uso

- Uma cepa de *L. ivanovii* com atividade de xilose lenta pode ser encontrada no leite de ovelha. Esta cepa típica é difícil de diferenciar de uma cepa de *L. monocytogenes* , mesmo após 48 hr em Ágar RAPID'Lmono. Portanto, o Ágar *Listeria* , de acordo com a confirmação de Ottaviani e Agosti, não é aconselhado quando produtos de leite de ovelha são testados

Section 7 Protocolo

- Algumas cepas raras de *L. monocytogenes* são caracterizados por uma atividade PIPLC lenta, que pode resultar em um desenvolvimento mais lento da cor azul típica. Pode ser necessário estender o tempo de incubação em 48 hr. Durante o estudo NF Validation, 200 cepas de *L. monocytogenes* foram testadas e nenhuma demonstrou uma atividade lenta de PIPLC
- Volumes de amostra acima de 25 g não foram testados como parte da NF VALIDATION

Controle de qualidade

- Todos os produtos fabricados e comercializados pela Bio-Rad estão sujeitos aos procedimentos de garantia de qualidade em todas as etapas, desde a recepção da matéria-prima até a comercialização do produto final. Cada lote de produto acabado passa por um controle de qualidade de acordo com a EN ISO 11133 e é comercializado apenas quando satisfaz os critérios de aceitabilidade. A documentação relativa à produção e ao controle de qualidade de cada lote é mantida arquivada
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite www.bio-rad.com

Section 7 Protocolo

Preparação do Meio Desidratado

1. Agite sempre a garrafa antes de usar.
2. Dissolva 68,1 g de pó em 950 ml de água destilada e misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Aqueça lentamente enquanto mexe e deixe ferver (fervura no máximo 2 min). Evite o sobreaquecimento.
4. Resfrie o meio até 45-50°C em um banho-maria.
5. Adicione asepticamente e homogeneíze 2 ampolas de Suplemento 1, cada uma reconstituída com 14 ml de água estéril.
6. Adicione asepticamente e homogeneíze 2 ampolas de Suplemento 2.
7. Se necessário, misture em um agitador magnético até dispensar.
8. Dispense em placas de Petri.
9. Deixe descansar em uma superfície nivelada e fria.
10. Não empilhe as placas.
11. Um frasco de 500 g de pó produz 7,4 L de meio.

Preparação de Meio Engarrafado

1. Em banho-maria fervente, derreta o conteúdo do frasco de Ágar RAPID' *L.mono* .
2. Retire do fogo e mexa o conteúdo do frasco manualmente para ressuspender o depósito branco.
3. Resfrie o frasco até 47–50°C em um banho-maria. Mexa o conteúdo do frasco com as mãos antes de adicionar suplementos.
4. Adicione assepticamente 1 ampola de Suplemento 1 reconstituída com 14 ml de água estéril e 1 ampola de Suplemento 2.
5. Misture cuidadosamente. Evite espumar.
6. Despeje imediatamente o meio em placas de Petri.
7. Deixe descansar em uma superfície nivelada e fria.
8. Não empilhe as placas.
9. Um kit permite a preparação de aproximadamente 13 placas.

Detecção dos Gêneros *L. monocytogenes* e *Listeria*

1. Dilua n g ou n ml de amostra em $9 \times n$ ml de caldo Fraser $\frac{1}{2}$ concentração. Uniformize com o misturador/homogeneizador.
2. Incubar a 30 ± 1 °C por 24 ± 2 hr.
3. Após o passo de enriquecimento, o caldo pode ser armazenado com uma temperatura entre +2 e +8°C por 72 hr.
4. Usando uma pipeta estéril, remova 0,1 ml da amostra e coloque as gotas na borda externa da metade da superfície do ágar.
5. Usando uma pipeta Pasteur estéril ou um loop inoculante, espalhe a amostra pela metade da superfície de ágar em um movimento de vai-e-vem.
6. Na outra metade da superfície de ágar, estrie o depósito em faixas relativamente próximas sobre todo o prato a partir da borda da distribuição anterior.
7. Deixe incubar as placas viradas ao contrário a 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 hr.
8. O *L. monocytogenes* forma colônias redondas e lisas de cor azul claro, azul acinzentado a azul escuro, sem halo amarelo, com diâmetro médio de 1-2 mm. Dependendo da matriz alimentar, a profundidade da cor azul da colônia pode variar.
9. Outras colônias de *Listeria* spp. são tipicamente brancas ou amarelo claro, com ou sem halo amarelo, formando uma forma redonda com uma aparência lisa e convexa, diâmetro médio de 1-2 mm. *L. ivanovii* forma colônias verde-azuladas com um halo amarelo.
10. No caso de alvo "não detectado" do gênero *Listeria* (exceto *L. monocytogenes*), 48 hr de incubação são necessárias para fornecer um resultado negativo.

Section 8 Confirmação de Resultados Positivos

11. Após a incubação, as placas podem ser armazenadas a 2-8°C por 72 h.

Contagem de *L. monocytogenes*

1. Dilua n g ou ml de amostra em $9 \times n$ ml de BPW.
2. Deixe incubar a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1 ± 5 hr. Esta etapa é opcional. A etapa de ressuscitação não foi aplicada durante o estudo de renovação 2018 NF VALIDATION.
3. Espalhe 0,1 ml em uma placa.
4. Se necessário, prepare uma diluição de 1:10 (ou mais) em diluente de sal de triptona ou BPW de acordo com a norma ISO 6887 e espalhe 0,1 ml de cada diluição em uma placa.
5. Se estimar números pequenos, espalhe 1 ml de amostra em três placas de 90 mm de diâmetro (-0,33 ml/placa) ou em uma placa de 140 mm de diâmetro (protocolo certificado pela NF VALIDATION). Também é possível espalhar 1 ml em duas placas de 90 mm de diâmetro (não certificadas pela NF VALIDATION).
6. Deixe incubar as placas viradas ao contrário a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 hr.
7. Leia a placa e enumere as colônias típicas. Conte apenas placas contendo um máximo de 150 colônias características e um máximo de 300 colônias no total.
8. Consulte a norma EN ISO 7218 para inoculação, contagem de colônias, cálculo e expressão de resultados.

Section 8

Confirmação de Resultados Positivos

1. No contexto da validação AOAC, verifique as colônias isoladas suspeitas de acordo com o procedimento clássico de teste de confirmação descrito nos métodos de referência padrão.
2. No contexto da NF VALIDATION, a confirmação de *L. monocytogenes* realizada em apenas uma colônia é suficiente e deve ser feita de uma das seguintes maneiras:
 - a. Usando os testes convencionais descritos nos métodos padrão CEN ou ISO (incluindo a etapa de purificação).
 - b. Usando sondas nucleicas conforme descrito no padrão ISO 7218 (por exemplo, kit de detecção de PCR em tempo real iQ-Check *L. monocytogenes* II, nº no catálogo 3578124) usando colônias isoladas (com ou sem etapa de purificação).
 - c. Confirmado usando um teste de Rhamnose (nº no catálogo 3553669).
 - d. Usar qualquer outro método certificado NF VALIDATION baseado em um princípio diferente do da RAPID'..mono. O segundo protocolo de método validado deve ser completamente respeitado. Todas as etapas anteriores à etapa de detecção utilizada como ponto de partida para a confirmação devem ser comuns a ambos os métodos.

Section 9 Confirmação de outros métodos




3. No contexto da NF VALIDATION, a confirmação de outras *Listeria* spp. além do *L. monocytogenes* realizada em apenas uma colônia é suficiente e deve ser feita de uma das seguintes maneiras:
 - a. Usando os testes convencionais descritos nos métodos padrão CEN ou ISO (incluindo a etapa de purificação).
 - b. Usando sondas nucleicas conforme descrito no padrão ISO 7218 (por exemplo, iQ-Check *Listeria* spp. kit de detecção de PCR em tempo real, nº no catálogo 3578113) usando colônias isoladas (com ou sem etapa de purificação).
 - c. Recoletar e inocular pelo menos uma colônia isolada em uma placa de ágar AL ou PALCAM. Até 15 colônias podem ser confirmadas em uma única placa de ágar AL ou PALCAM.
 - e. Usando qualquer outro método certificado NF VALIDATION baseado em um princípio diferente do Ágar RAPID'*L.mono*. O segundo protocolo de método validado deve ser completamente respeitado. Todas as etapas anteriores à etapa de detecção utilizada como ponto de partida para a confirmação devem ser comuns a ambos os métodos.
4. As colônias suspeitas podem ser confirmadas usando o teste MALDI Biotyper (o Sistema Biotyper do Bruker inclui um espectrômetro de massa MALDI time-of-flight e MBT Compass Software, versão 4) diretamente de uma colônia isolada ou após uma etapa de purificação. Esta opção tem certificação MicroVal de acordo com a norma ISO 16140-6 (2017LR75).
5. No caso de resultados discordantes (presumivelmente positivos com RAPID'*L.mono*, negativos com método de confirmação), o laboratório deve seguir as etapas necessárias para garantir a validade do resultado obtido.
6. No caso de um resultado positivo confirmado para *L. monocytogenes* com o método de enumeração RAPID'*L.mono*, não é necessário duplicar a etapa de confirmação de *L. monocytogenes* para a mesma amostra testada com o método de detecção RAPID'*L.mono*.
7. Ao usar o protocolo de enumeração, confirmar menos de cinco colônias envolve o risco de fazer uma superestimativa devido à presença de colônias típicas que não são *L. monocytogenes*.

Section 9 Confirmação de outros métodos

Confirmação de Resultados Positivos com os Kits iQ-Check *Listeria* spp. e iQ-Check *Listeria monocytogenes* II (Protocolo certificado NF VALIDATION)

1. Usando um loop estéril, estriar 100 µl de caldo de enriquecimento (LSB ou caldo Fraser V2) em Ágar RAPID'*L.mono*.
2. Incube placas a 37 ± 1 °C por 24 ± 2 hr.
3. A *L. monocytogenes* forma colônias de azul claro, azul-cinza a azul-escuro e outras *Listeria* spp. formam colônias brancas ou amarelas claras com ou sem um halo amarelo em Ágar RAPID'*L.mono*.

Section 10 Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
AOAC-RI	Queijo brie, surimi, salada mista, peru fatiado	Métodos de desempenho testados	FDA BAM Cap. 10 USDAMLG8.11	 Licença 030406
NORDVAL	Todas as amostras ambientais de produtos e produção para alimentação humana	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) NF EN ISO 11290-2 (2017)	 NordVal #022
NF VALIDATION	Todas as amostras ambientais de produtos e produção para alimentação humana	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) EN ISO 11290-2 (2017)	 BRD: 07/04-09/98 BRD: 07/05-09/01 ALTERNATIVOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela AFNOR Certificação http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 Referências

Amilli A, Goldfine H, and Portnoy DA. (1991). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. J Exp Med 173, 751-754.

Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis D.W, Holzapfel W. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. Int J Food Microbiol 109, 127-131.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. (1990). Enhanced haemolysis agar (EHA)—an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* Food Microbiol 8, 37-49.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. 1990: Performance of enhanced haemolysis agar compared to Oxford medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food enrichment broths. Food Microbiol 8, 51-62.

Foret J and Dorey F (1997). Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru. Sciences des Aliments 17, 219-225.

Heisick JE, Rosas-Marty LI and Tatini SR. (1995). Enumeration of Viable *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* in Foods. J Food Prot 58, 733-736.

Section 11 Referências

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling.

ISO 11290-1:2017 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method.

ISO 11290-2:2017 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 2: Enumeration method.

Karpiskova R., Pejchalova M., Mokrosova J, Vytrasova J, Smuharova P, Ruprich J. (2000). Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. J Microbiol Methods 41, 267-271.

Leclercq A (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'*L.mono* and ALOA solid media. J Microbiol Methods 57, 251-258.

Manafi M (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. Int J Food Microbiol 60,205-218.

Mengaud J, Braun-Breton C, and Cossart P. (1991). Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? Mol Microbiol, 5, 367-372.

Notermans SH, Dufrenne J. et al. (1991). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. Appl Envir Microbiol 57, 2666-2670.

Polivka C (2001). Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium RAPID'*L. mono*. Arch Lebensmittelhygiene 52, 22-23.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* horn Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online at <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlq-8.pdf?MOD=AJPERES>

United States Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 10 *Listeria monocytogenes*. Online at <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>

Section 12 Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Março 2020	10000127436 Ver A	- Alteração importante - Novo design de documento - Alteração do número do documento – versão anterior RAPID <i>L.mono</i> V14 01 de Julho de 2019
Junho 2021	10000127436 Ver B	- Pequena alteração - Renovação da NF VALIDATION
Mai 2023	10000127436 Ver C	- Pequena alteração - Confirmação do MALDI Biotyper - <i>L. monocytogenes</i> esclarecimento sobre confirmação - Renovação da VALIDAÇÃO NF - Atualização das referências

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para obter mais informações sobre a nossa completa linha de meios cromogênicos RAPID.

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc. iQ-CHECK é uma marca comercial da Bio-Rad Europe GmbH em certas jurisdições. Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

RAPID'*L.mono* Agar

Manual de usuario

Medio cromogénico selectivo para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en productos alimentarios para consumo humano y en muestras ambientales

Referencia #3563694, placas preparadas, placas de 90 mm x 20

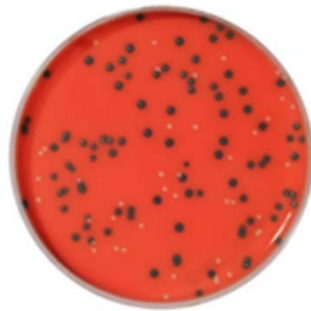
Referencia #3563964, placas preparadas, placas de 90 mm x 120

Referencia 3555294, kit listo para usar (para 200 ml), medio agar en frascos, suplementos

Referencia #3564293, deshidratado, 500 g

Referencia #3564294, Supplement 1, liofilizado, 10 viales

Referencia #3564746, Supplement 2, líquido, 10 viales



BIO-RAD

Tabla de contenidos

Section 1	Introducción	1
Section 2	Principio de RAPID' <i>L.mono</i>	1
Section 3	Fórmula teórica.....	1
Section 4	Vida útil y almacenamiento.....	2
Section 5	Instrumentos necesarios, no suministrados	2
	Equipamiento.....	2
Section 6	Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad	3
Section 7	Protocolo.....	4
	Preparación del medio deshidratado.....	4
	Preparación de medio embotellado.....	5
	Detección de <i>L.monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> género	5
	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	6
Section 8	Confirmación de resultados positivos.....	6
Section 9	Confirmación de otros métodos.....	7
Section 10	Desempeño de la prueba y validaciones.....	8
Section 11	Referencias.....	8
Section 12	Historial de revisiones.....	10

Section 1 Introducción

Graves brotes de *Listeria monocytogenes* siguen asolando la industria de la seguridad alimentaria. *Listeria* es peligrosa por la manera en que puede sobrevivir y crecer, aunque sea lentamente, a temperaturas de refrigeración en alimentos procesados listos para el consumo. *Listeria monocytogenes* es un patógeno especialmente preocupante, ya que puede causar graves problemas de salud y potencialmente la muerte, sobre todo en personas inmunodeprimidas, recién nacidos y ancianos. Además, se sabe que la infección provoca muerte perinatal y abortos espontáneos en mujeres embarazadas. La listeriosis se manifiesta con síntomas como fiebre, fatiga, náuseas, vómitos y diarrea, y tiene una tasa de mortalidad del 30 %, aunque puede ser mayor en personas vulnerables. Cerca del 90 % de los casos de listeriosis reportados resultan en hospitalización. Es necesario disponer de un método de cultivo rápido para reducir el tiempo empleado en la obtención de resultados y asegurarse de que estos sean precisos.

Section 2 Principio de RAPID'*L.mono*

El principio del medio RAPID'*L.mono* se basa en la detección de la actividad de la fosfolipasa C específica (PI-PLC) de *L. monocytogenes* y en la incapacidad de esta especie para metabolizar la xilosa. Tras 24 hr de incubación, *L. monocytogenes* forma colonias azules características (azul pálido, azul grisáceo a azul oscuro) sin halo amarillo. Las colonias formadas por otras especies de *Listeria* son blancas, con o sin halo amarillo. La *Listeria ivanovii* forma colonias de color verde azulado con un halo amarillo (característica de la xilosa). Este halo puede aparecer tras 24-48 hr de incubación. La solución selectiva del medio permite inhibir la mayoría de la flora interferente (bacterias gram-positivas y gram-negativas, levaduras y mohos). RAPID'*L.mono* permite una identificación rápida y específica de *L. monocytogenes* en 24 hr y de otras especies de *Listeria* en 24-48 horas después de preparar las muestras conforme a las normas.

Section 3 Fórmula teórica

Peptonas	30 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	1 g
Cloruro de litio	9g
Xilosa	10 g
Rojo de fenol	0,12 g
Activadores del crecimiento	2 g
Solución cromogénica	1 ml
Solución selectiva	20 ml
Agar B	13 g
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml

pH final a 25°C = 7,2 ±0,2

Section 4

Vida útil y almacenamiento

- Agar deshidratado: 2 - 8 °C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro
- Agar preparado: 2 - 8 °C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar oscuro
- Placa preparada a partir de agar deshidratado: 1 semana a 2 - 8 °C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro

Section 5

Instrumentos necesarios, no suministrados

Equipamiento

- Todo el instrumental habitual del laboratorio
- Placa calefactada
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubador o sala de incubación controlada termostáticamente, con una precisión de ± 1 °C
- Baño termostático

Fungibles• Confirmación:

- iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (referencia #3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (referencia #3578113)
- Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti (por ejemplo, referencia #3563695, placas preparadas 90 mm x 20; 3563965, placas preparadas 90 mm x 120; 3555200, 250 ml x 6 frascos; 3564043, deshidratado, 500 g; 3564041, suplemento AL 1, 10 v viales; 3564042, suplemento AL 2, 10 viales)
- PALCAM agar (por ejemplo referencia #3564754, deshidratado 500 g; 3564752, suplemento, 10 viales)
- Test de la ramnosa (referencia #3553669, 1 ml x 28 viales)
- Diluyente para recuento, Sal Triptona (referencia #3555754, 9 ml x 25 tubos; 3555756, 90 ml x 6 frascos; 3555796, 3 L x 4 bolsas; 3564544, 500 g)
- Medio de enriquecimiento, caldo Demi Fraser (referencia #3555797, 225 ml frascos x 6; 3555794, 3 L x 4 bolsas; 3564604, deshidratado, 500 g; 3564616, suplemento, 10 viales)
- Asas de siembra y asas de [Digralsky](#)

Section 6 Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad

- Medio de resucitación, Agua de Peptona Tamponada (Buffer Peptone Water BPW), (referencia #3554179, 225 ml x 6 frascos; 3564684, deshidratado 500 g; 3555790, 2 x 5 L bolsas; 3555795, 4 x 3 L bolsas)
- Placas de Petri estériles
- Pipetas estériles
- Bolsas estériles para pesada

Section 6 Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad

Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Se debe usar una protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas como *L. monocytogenes*.
- Los medios que han estado en contacto con muestras de alimentos deben considerarse potencialmente contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales.
- Evitar el sobrecalentamiento prolongado del producto durante el fundido.
- Antes de utilizar RAPID'Lmono Agar, dejar secar las placas de Petri a 25 - 50 °C hasta que desaparezcan las gotas de la superficie del medio, de acuerdo con la norma EN ISO 7218. Evitar un secado prolongado, ya que esto podría alterar el rendimiento del medio.
- Cuando se utilice el método de recuento, se debe inocular el medio utilizando un asa de siembra. Después de distribuir, las placas pueden dejarse tal cual en la superficie de trabajo durante 15-30 min antes de la incubación para permitir que el inóculo sea absorbido correctamente por el agar.
- Si se utiliza RAPID'Lmono Agar en frasco, es normal que se produzca un depósito blanco en el fondo del frasco. Para garantizar una resuspensión y una homogeneidad satisfactoria, es importante agitar el frasco manualmente al sacarlo del baño de agua en ebullición y fundición y verterlo inmediatamente después de añadir los suplementos.
- Antes de su inoculación, el Agar RAPID'Lmono es de color rojo a rojo-anaranjado y opaco. Cabe observar alguna variación de color sin que ello repercuta en el rendimiento.

Limitaciones de uso

- En la leche de oveja se puede encontrar una cepa de *L. ivanovii* con una actividad lenta al metabolismo de xilosa. Esta cepa típica resulta difícil de diferenciar de una cepa de *L. monocytogenes*, incluso después de 48 hr en RAPID'Lmono Agar. Por lo tanto, no se aconseja la confirmación de Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti cuando se analizan productos lácteos de oveja.

Section 7 Protocolo

- Algunas cepas raras de *L. monocytogenes* se caracterizan por una actividad PI-PLC lenta, lo que podría a su vez ralentizar el desarrollo del color azul característico. Puede ser necesario ampliar el tiempo de incubación en 48 hr. Durante el estudio de validación NF Validation, se analizaron 200 cepas de *L. monocytogenes* y ninguna manifestó una actividad PI-PLC lenta.
- No se han analizado volúmenes de muestra superiores a 25 g como parte de la validación NF VALIDATION.

Control de calidad

- Todos los productos fabricados y comercializados por Bio-Rad están sujetos a un protocolo de garantía de calidad en todas las etapas, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos terminados. Cada lote de producto terminado se somete a un control de calidad según la norma EN ISO 11133 y solo se comercializa si cumple los criterios de aceptabilidad. La documentación relativa a la producción y el control de calidad de cada lote se guarda en un archivo.
- Para información de seguridad del producto SDS y del certificado de análisis, visite www.bio-rad.com

Section 7 Protocolo

Preparación del medio deshidratado

1. Agitar siempre el frasco antes de usar.
2. Disolver 68,1 g de polvo en 950 ml de agua destilada y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Calentar lentamente mientras se agita y llevar a ebullición (ebullición máxima 2 min). Evitar el sobrecalentamiento.
4. Enfriar el medio a 45-50 °C.
5. Añadir y homogeneizar asepticamente 2 viales de suplemento 1, cada uno reconstituido añadiendo 14 ml de agua esterilizada.
6. Añadir y homogeneizar asepticamente 2 viales de suplemento 2.
7. Si es necesario, mezclar en un agitador magnético hasta que se dispense.
8. Dispensar en placas de Petri.
9. Dejar que solidifique en una superficie fresca y nivelada.
10. No apilar las placas.
11. Un frasco de 500 g de polvo deshidratado permite obtener 7,4 L de medio.

Preparación de medio embotellado

1. En un baño de agua hirviendo, fundir el contenido del frasco de RAPID' *L.mono* Agar.
2. Retirar del calor y mezclar manualmente el contenido del frasco para resuspender el depósito blanco.
3. Enfriar el frasco a 47-50 °C en un baño de agua. Mezclar manualmente el contenido del frasco antes de añadir los suplementos.
4. Añadir asepticamente 1 vial de suplemento 1 reconstituido con 14 ml de agua esterilizada y 1 vial de suplemento 2.
5. Mezclar bien. Evitar la formación de espuma.
6. Verter inmediatamente el medio en placas de Petri.
7. Dejar que solidifique en una superficie fresca y nivelada.
8. No apilar las placas.
9. Con un kit se pueden preparar unas 13 placas.

Detección de *L.monocytogenes* y *Listeria* género

1. Diluya n g o n ml de muestra en $9 \times n$ ml de caldo Demi Fraser Homogeneice con agitador/homogeneizador.
2. Incube la placa a 30 ± 1 °C durante 24 ± 2 hr.
3. Después de la etapa de enriquecimiento, el caldo se puede conservar a $2 - 8$ °C durante 72 hr.
4. Usando una pipeta estéril, recoja 0,1 ml de muestra y coloque gotas en el borde exterior de la mitad de la superficie del agar.
5. Utilizando una pipeta Pasteur estéril o un asa de siembra, distribuya la muestra sobre la mitad de la superficie de agar en un movimiento de ida y vuelta.
6. En la otra mitad de la superficie de agar, aísle esparciendo el depósito en estrías relativamente cercanas sobre toda la placa desde el borde del esparcido anterior.
7. Incube las placas invertidas a 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 hr.
8. *L. monocytogenes* forma colonias redondas y uniformes de color azul pálido, azul grisáceo a azul oscuro, sin halo amarillo, con un diámetro medio de 1-2 mm. Dependiendo de la matriz alimentaria, la profundidad del color azul de la colonia puede variar.
9. Otras colonias de *Listeria* spp. suelen ser de color blanco o amarillo pálido, con o sin halo amarillo, con forma redonda y aspecto liso y convexo, con un diámetro medio de 1-2 mm. *L. ivanovii* forma colonias de color verde azulado con un halo amarillo.
10. En el caso de un objetivo "no detectado" de *Listeria* género (excepto *L. monocytogenes*), se requieren 48 hr de incubación para proporcionar un resultado negativo.

Section 8 Confirmación de resultados positivos

11. Tras la etapa de incubación, las placas pueden almacenarse a 2 - 8 °C durante 72 hr.

Recuento de *L. monocytogenes*

1. Diluya n g o ml de muestra en $9 \times n$ ml de APT.
2. Incube a 20 ± 1 °C durante $1 \text{ hr} \pm 5 \text{ min}$. Este paso es opcional; el paso de reanimación no se aplicó durante el estudio de renovación de la VALIDACIÓN NF EN 2018.
3. Distribuya 0,1 ml en una placa.
4. Si es necesario, prepare una dilución de 1:10 (o más) en diluyente de Sal Triptona o Agua de Peptona Tamponada según la norma ISO 6887 y distribuya 0,1 ml de cada dilución en una placa.
5. Para la estimación de cantidades pequeñas, distribuya 1 ml de muestra en tres placas de 90 mm de diámetro (~0,33 ml/placa) o en una placa de 140 mm de diámetro (protocolo certificado NF VALIDATION). También se puede distribuir 1 ml en dos placas de 90 mm de diámetro (sin certificado NF VALIDATION).
6. Incuba las placas invertidas a 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 hr.
7. Lea la placa y haga un recuento de colonias típicas. Cuente solo las placas que contengan un máximo de 150 colonias características y un máximo de 300 colonias en total.
8. Consulte en la norma EN ISO 7218 la inoculación, el recuento de colonias, el cálculo y la expresión de los resultados.

Section 8

Confirmación de resultados positivos

1. En el contexto de la validación AOAC, confirme colonias sospechosas aisladas siguiendo el procedimiento clásico de prueba de confirmación indicado en los métodos de referencia normalizados.
2. En el contexto de la validación NF VALIDATION, la confirmación de *L. monocytogenes* realizada en una sola colonia es suficiente y tiene que hacerse siguiendo uno de los siguientes métodos:
 - a. Empleando las pruebas convencionales descritas en los métodos normalizados CEN o ISO (incluida la fase de purificación)
 - b. Utilizando sondas nucleicas como se describe en la norma ISO 7218 (por ejemplo, iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, referencia #3578124) utilizando colonias aisladas (con o sin fase de purificación)
 - c. Confirme usando un Rhamnose Test (referencia #3553669)
 - d. Usando cualquier otro método certificado NF VALIDATION basado en un principio diferente al de RAPID'*L.mono*. El protocolo validado de este segundo método debe ser respetado en su totalidad. Todos los pasos que preceden al paso de detección utilizado como punto de partida para la confirmación deben ser comunes para ambos métodos

Section 9 Confirmación de otros métodos

3. En el contexto de la validación NF VALIDATION, la confirmación de *Listeria* spp. que no sea *L. monocytogenes* realizada en una sola colonia es suficiente y tiene que hacerse siguiendo uno de los siguientes métodos:
 - a. Empleando las pruebas convencionales descritas en los métodos normalizados CEN o ISO (incluida la fase de purificación)
 - b. Utilizando sondas nucleicas como se describe en la norma ISO 7218 (por ejemplo, iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, referencia #3578113) utilizando colonias aisladas (con o sin fase de purificación)
 - c. Subcultivando por técnica de spot al menos una colonia aislada en una placa de agar PALCAM o AL. Se pueden confirmar hasta 15 colonias en una sola placa de agar AL o PALCAM
 - e. Usando cualquier otro método certificado NF VALIDATION basado en un principio diferente al de RAPID'*L.mono* Agar. El protocolo validado de este segundo método debe ser respetado en su totalidad. Todos los pasos que preceden al paso de detección utilizado como punto de partida para la confirmación deben ser comunes para ambos métodos
4. Las colonias sospechosas pueden ser confirmadas empleando el ensayo MALDI Biotyper (el Sistema Biotyper de Bruker incluye un espectrofotómetro de masa MALDI time-of-flight y el Software MBT Compass, versión 4) directamente a partir de una colonia aislada o tras un paso de purificación. Esta opción está certificada por Microval de acuerdo a la ISO 16140-6 (2017LR75).
5. En caso de producirse resultados discordantes (supuestos positivos con RAPD'*L.mono*, negativos con el método de confirmación), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.
6. En caso de un resultado positivo confirmado para *L. monocytogenes* con el método de enumeración RAPID'*L.mono*, no es necesario duplicar el paso de confirmación de *L. monocytogenes* para la misma muestra analizada con el método de detección RAPID'*L.mono*.
7. Si se utiliza el protocolo de recuento, la confirmación de menos de cinco colonias implica el riesgo de realizar una sobreestimación debido a la presencia de colonias típicas que podrían no ser *L. monocytogenes*.

Section 9 Confirmación de otros métodos




Confirmación de los resultados positivos con los kits iQ-Check *Listeria* spp. y iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kits (protocolo certificado NF VALIDATION)

1. Con un asa estéril, distribuya 100 ul de caldo de enriquecimiento (caldo LSB o Demi Fraser) en RAPID'*L.mono* Agar.
2. Incube las placas a 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 hr.

Section 10 Desempeño de la prueba y validaciones

3. *L. monocytogenes* forma colonias de color azul pálido, azul grisáceo a azul oscuro y otras *Listeria* spp. forman colonias blancas o amarillo pálido con o sin halo amarillo en RAPID'*L.mono* Agar.

Section 10 Desempeño de la prueba y validaciones

Certificación	Alcance	Protocolo de validación	Protocolo de referencia	Referencia de certificado
AOAC-RI	Queso Brie, surimi, ensalada mixta, fiambre de pavo	Métodos con desempeño comprobado	FDA BAM Cap. 10 USDAMLG8.11	 Licencia* 030406
NORDVAL	Todos los productos alimenticios humanos y muestras ambientales de producción	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) NF EN ISO 11290-2 (2017)	 NordVal #022
NF VALIDATION	Todos los productos alimenticios humanos y muestras ambientales de producción	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 (2017) EN ISO 11290-2 (2017)	 BRD: 07/04-09/98 BRD: 07/05-09/01 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado por AFNOR Certificación http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 Referencias

Amilli A, Goldfine H, and Portnoy DA. (1991). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 173, 751-754.

Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis D.W, Holzapfel W. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *Int J Food Microbiol* 109, 127-131.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. (1990). Enhanced haemolysis agar (EHA)—an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* *Food Microbiol* 8, 37-49.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. 1990: Performance of enhanced haemolysis agar compared to Oxford medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food enrichment broths. *Food Microbiol* 8, 51-62.

Foret J and Dorey F (1997). Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru. *Sciences des Aliments* 17, 219-225.

Section 11 Referencias

Heisick JE, Rosas-Marty LI and Tatini SR. (1995). Enumeration of Viable *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* in Foods. *J Food Prot* 58, 733-736.

ISO 6887-1:2017 – Microbiología de la cadena alimentaria – Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico – Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling.

ISO 11290-1:2017 - Microbiología de la cadena alimenticia — Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. — Parte 1: Método de detección.

ISO 11290-2:2017 - Microbiología de la cadena alimenticia — Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. - Parte 2: Método de recuento.

Karpiskova R., Pejchalova M., Mokrosova J, Vytrasova J, Smuharova P, Ruprich J. (2000). Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. *J Microbiol Methods* 41, 267-271.

Leclercq A (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'Lmono and ALOA solid media. *J Microbiol Methods* 57, 251-258.

Manafi M (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol* 60,205-218.

Mengaud J, Braun-Breton C, and Cossart P. (1991). Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol Microbiol*, 5, 367-372.

Notermans SH, Dufrenne J. et al. (1991). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl Envir Microbiol* 57, 2666-2670.

Polivka C (2001). Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium RAPID'..mono. *Arch Lebensmittelhygiene* 52, 22-23.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* horn Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online at <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlq-8.pdf?MOD=AJPERES>

United States Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 10 *Listeria monocytogenes*. Online at <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>

Section 12 Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento	Cambio
Marzo 2020	10000127436 Ver A	- Cambio significativo - Nuevo diseño del documento - Cambio en el número de documento - versión anterior RAPIDL.mono V14 01 julio 2019
Junio 2021	10000127436 Ver B	- Modificación menor - Renovación de NF VALIDATION
Mayo 2023	10000127436 Ver C	- Modificación menor - Aclaración de la confirmación con MALDI Biotyper - Aclaración de la confirmación de <i>L. monocytogenes</i> - Renovación de VALODACIÓN NF - Actualización de referencias

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para más información sobre nuestra completa gama de medios cromogénicos RAPID.

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc. IQ-CHECK es una marca registrada de Bio-Rad Europe GmbH en diversos países. Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

RAPID'*L.mono* Agar

用户指南

用于对供人类食用的食品和环境样品中的**单增李斯特菌和其他李斯特菌属**进行检测和计数的选择性显色培养基

目录 #3563694, 即用型平板, 90 mm x 20 个培养皿

目录 #3563964, 即用型平板, 90 mm x 120 个培养皿

目录 #3555294, 即用型试剂盒 (用于 200 ml), 包括瓶装培养基和添加剂

目录 #3564293, 干粉, 500 g

目录 #3564294, 添加剂 1, 冻干, 10 小瓶

目录 #3564746, 添加剂 2, 液体, 10 小瓶



BIO-RAD

目录

第 1 部分 简介.....	1
第 2 部分 RAPID' <i>L.mono</i> 原理.....	1
第 3 部分 理论配方.....	1
第 4 部分 保质期及储存条件.....	2
第 5 部分 其他仪器、试剂与耗材.....	2
仪器.....	2
试剂和耗材.....	2
第 6 部分 预防措施、使用限制和质量控制.....	3
第 7 部分 操作流程.....	4
干粉培养基的制备.....	4
瓶装培养基的准备.....	4
检测单核细胞增生李斯特菌和李斯特菌属.....	5
单核细胞增生李斯特菌计数.....	5
第 8 部分 阳性结果的确认.....	6
第 9 部分 其他方法的确认.....	7
第 10 部分 测试性能和验证.....	7
第 11 部分 参考资料.....	8
第 12 部分 修订记录.....	10

第 1 部分 简介

第 1 部分

简介

*单核细胞增生李斯特菌*的严重爆发持续困扰着食品安全行业。*李斯特菌*的危险性在于，它可以在冷藏温度下，在即食加工食品中存活和生长，但生长缓慢。*单核细胞增生李斯特菌*是一种极易造成问题的病原菌，因为它可能导致严重的健康问题甚至死亡，特别是在免疫抑制的个体、新生儿和老年人中。众所周知，感染会导致孕妇死胎和流产。*李斯特菌*病发病时出现发烧、疲倦、恶心、呕吐和腹泻等症状，死亡率为 30%，但易感人群的死亡率可能更高。在所有报告的*李斯特菌*病病例中，约 90% 患者需要住院治疗。为缩短得出结果的时间并确保这些结果的准确性，有必要采用快速培养方法。

第 2 部分

RAPID'*L.mono* 原理

RAPID'*L.mono* 培养基的原理依赖于对*单核细胞增生李斯特菌*的磷脂酶 C (PIPLC) 活性的特异性检测以及该菌种无法代谢木糖。培养 24 小时后，*单核细胞增生李斯特菌*形成特征性的蓝色（淡蓝色、灰蓝色到深蓝色）菌落，无黄色的光晕。其他种类的*李斯特菌*形成的菌落是白色，有或无黄色的光晕。*伊氏李斯特菌*形成蓝绿色的菌落，带有黄色的光晕（木糖阳性特征）。这种光晕可以在培养 24-48 小时后出现。该培养基中的选择性溶液可以抑制大多数干扰菌群（革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、酵母菌和霉菌）。RAPID'*L.mono* 可以在 24 小时内快速且特异性地鉴定出*单核细胞增生李斯特菌*，并在按照标准制备样品后的 24-48 小时内快速且特异性地鉴定出其他*李斯特菌*属。

第 3 部分

理论配方

蛋白胨	30 g
肉提取物	5 g
酵母抽提物	1 g
氯化锂	9 g
木糖	10 g
酚红	0.12 g
生长活化剂	2 g
显色溶液	1 ml
选择性溶液	20 ml

第 4 部分 保质期及储存条件

琼脂 B	13 g
蒸馏水	qsp 1,000 ml

25°C 时的最终 pH 值 = 7.2 ± 0.2

第 4 部分

保质期及储存条件

- 干粉培养基：在 2–8° C 下妥善密封包装，置于干燥避光处
- 预备培养基：在 2–8° C 下妥善密封包装，置于避光处
- 干粉平板的制备：在 2–8° C 下妥善密封包装，干燥避光处储存 1 周

第 5 部分

其他仪器、试剂与耗材

仪器

- 所有常用的实验室仪器
- 热平板
- 天平，灵敏度为 0.1 g
- 搅拌器/均质器
- 恒温控制的孵化器或孵化室，精确到 $\pm 1^\circ \text{C}$
- 水浴

试剂和耗材

- 确认：
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (目录 #3578124)、iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (目录 #3578113)
 - 根据 Ottaviani 和 Agosti 的 *李斯特菌* 培养基 (例如，目录 #3563695，即用型平板 90 mm x 20；3563965，即用型平板 90 mm x 120；3555200，250 ml x 6 瓶；3564043，干粉，500 g；3564041，AL 添加剂 1，10 小瓶；3564042，AL 添加剂 2，10 小瓶)
 - PALCAM 培养基 (例如，目录 #3564754，干粉 500 g；3564752，添加剂，10 小瓶)
 - 鼠李糖试验 (目录 #3553669，1 ml x 28 小瓶)
- 计数用稀释剂，胰蛋白胍盐 (目录 #3555754，9 ml x 25 管；3555756，900 ml x 6 瓶；

第 6 部分 预防措施、使用限制和质量控制

- 3555796, 3 L x 4 袋 ; 3564544, 500 g)
- 增菌培养基, 半弗雷泽培养基 (目录 #3555797, 225 ml 瓶 x 6 ; 3555794, 3 L x 4 袋 ; 3564604, 干粉, 500 g ; 3564616, 添加剂, 10 小瓶)
- 接种环和涂布器
- 复苏培养基, 缓冲蛋白胍水 (BPW), (目录 #3554179, 225 ml x 6 瓶 ; 3564684, 干粉 500 g ; 3555790, 2 x 5 L 袋 ; 3555795, 4 x 3 L 袋)
- 无菌培养皿
- 无菌移液管
- 无菌称重袋

第 6 部分

预防措施、使用限制和质量控制

预防措施

- 遵守良好实验室规范 (EN ISO 7218)。在处理 *单核细胞增生李斯特菌* 等具有潜在传染性的活细菌时, 应穿戴适当的防护装置, 如手套和实验室外套
- 与食品样品接触过的培养基应被视为潜在传染性材料处理, 并根据当地法规和规定进行废弃物处理
- 避免产品在融化过程中长时间过热
- 在使用 RAPID' *L.mono* 培养基之前, 请将培养皿在 25–50°C 下烘干, 直到培养基表面的液滴消失, 符合 EN ISO 7218 标准。避免长时间的干燥, 因为这可能改变培养基的性能
- 使用计数法时, 用涂布器接种培养基。铺开, 培养皿可以在培养前在工作台上原样放置 15–30 分钟, 以使接种物被培养基正确吸收
- 当使用瓶装的 RAPID' *L.mono* 培养基时, 瓶底有白色沉淀物是正常的。为了确保再悬浮和令人满意的均匀性, 当将瓶子从沸水浴和融化水浴中取出时, 必须手动搅拌, 并在加入添加剂后立即倒出
- 接种前, RAPID' *L.mono* 培养基是红色至橙红色的, 不透明。可以观察到一些颜色的变化, 但对性能没有任何影响

使用限制

- 在羊奶中可以发现具有缓慢木糖活性的 *伊氏李斯特菌*。即使在 RAPID' *L.mono* 培养基上培养 48 小时后, 这种典型菌株也难以与 *单核细胞增生李斯特菌* 菌株区分开来。因此, 根据 Ottaviani 和 Agosti 的确认, 在对羊奶产品进行检测时, 不建议使用 *李斯特菌* 培养基。
- 一些罕见的 *单核细胞增生李斯特菌* 菌株的特点是 PIPLC 活性缓慢, 这可能导致典型的蓝色菌落发育较慢。可能需要将培养时间延长 48 小时。在 NF 验证研究中, 测试了 200 株 *单核细胞增生李斯特菌*, 没有一株显示出缓慢的 PIPLC 活性

第 7 部分 操作流程

- 超过 25 g 的样品量尚未作为 NF 验证的一部分进行测试

质量控制

- Bio-Rad 公司生产和销售的每一种产品，从接收原材料到销售成品的各个阶段都要受到质量保证程序的约束。每批成品都根据 EN ISO 11133 进行质量控制，只有满足验收标准才能上市。与每批次的生产和质量控制有关的文件均进行存档
- 有关 SDS 产品安全信息和分析证书，请访问 www.bio-rad.com。

第 7 部分 操作流程

干粉培养基的制备

1. 使用前请摇晃瓶子。
2. 将 68.1 g 粉末溶解在 950 ml 蒸馏水中，并进行搅拌，直到得到均匀的悬浮液。
3. 边搅拌边缓慢加热，并煮沸（最长煮沸 2 分钟）。避免过热。
4. 在水浴中将培养基冷却到 45-50°C。
5. 在无菌条件下加入 2 小瓶添加剂 1 并进行均质化，每瓶加入 14 ml 无菌水进行重新调制。
6. 在无菌条件下加入 2 小瓶添加剂 2 并进行均质化。
7. 如有必要，可在磁力搅拌器上搅拌，直到分装为止。
8. 分装在培养皿中。
9. 在阴凉的平面上静置。
10. 请勿堆放培养皿。
11. 一瓶 500 g 粉末可制成 7.4 L 培养基。

瓶装培养基的准备

1. 在沸水浴中，融化 RAPID' *L.mono* 培养基瓶中的内容物。
2. 从水浴中取出，手动搅拌瓶子里的内容物，使白色沉淀物重新悬浮起来。
3. 在水浴中将培养基瓶冷却到 47-50°C。在加入添加剂之前，手动搅拌瓶中的内容物。
4. 在无菌条件下加入 1 小瓶添加剂 1，用 14 ml 无菌水重新调制，然后再加入 1 小瓶添加剂 2。
5. 充分搅拌。避免起泡。
6. 立即将培养基倒入培养皿中。
7. 在阴凉的平面上静置。
8. 请勿堆放培养皿。

第 7 部分 操作流程

9. 一个试剂盒可以制备大约 13 个平板。

检测单核细胞增生李斯特菌和李斯特菌属

1. 在 $9 \times n$ ml 半弗雷泽肉汤中稀释 n g 或 n ml 样品。用搅拌器/均质器进行均质处理。
2. 在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 环境下培养 24 ± 2 小时。
3. 增菌步骤后，增菌液可在 $2-8^\circ\text{C}$ 下储存 72 小时。
4. 用无菌移液管取出 0.1 ml 的样品，滴在一半培养基表面的外缘。
5. 使用无菌巴斯德吸管或接种环，以来回移动的方式将样品铺满半个培养基表面。
6. 在另一半的培养基表面上，通过将沉积物以相对紧密的条纹从上一次铺开的边缘铺满整个培养皿来进行分离。
7. 将翻转的培养皿在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养 24 ± 2 小时。
8. 单核细胞增生李斯特菌形成淡蓝色、灰蓝色到深蓝色的圆形光滑菌落，没有黄色光晕，平均直径为 1-2 mm。根据食物基质的不同，菌落的蓝色深度也可能不同。
9. 其他李斯特菌属的菌落通常是白色或淡黄色，有或无黄色光晕，呈圆形，外观光滑、凸起，平均直径 1-2 mm。伊氏李斯特菌形成带有黄色光晕的蓝绿色菌落。
10. 在“未检测到”目标李斯特菌属的情况下（除单增李斯特菌外），需要培养 48 小时才能提供阴性结果。
11. 培养结束后，平板可以在 $2-8^\circ\text{C}$ 下储存 72 小时。

单核细胞增生李斯特菌计数

1. 在 $9 \times n$ ml 的 BPW 中稀释 n g 或 ml 样品。
2. 在 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养 1 小时 \pm 5 分钟。这一步是可选的；在 2018 年 NF 验证更新研究中未使用复苏这一步骤。
3. 将 0.1 ml 涂抹在一个平板上。
4. 如有必要，根据 ISO 6887 标准，在胰蛋白胨盐稀释液或 BPW 中制备 1:10 的稀释液（或更多），并将每份稀释液的 0.1 ml 涂抹在平板上。
5. 如果估计数量较少，请将 1 ml 样品涂抹在三个直径为 90 mm 的平板上（ ~ 0.33 ml/板）或一个直径为 140 mm 的平板上（NF 验证认证方案）。也可以将 1 ml 涂抹在两个直径为 90 mm 的平板上（未经 NF 验证认证）。
6. 将翻转的培养皿在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养 24 ± 2 小时。
7. 读取平板并对典型菌落进行计数。只计算含有最多 150 个特征菌落和总共最多 300 个菌落的培养皿。
8. 关于接种、菌落计数、计算和结果表达，请参考 EN ISO 7218 标准。

第 8 部分

阳性结果的确认

1. 在 AOAC 验证的背景下，根据标准参考方法中描述的经典确认测试程序确认可疑的分离菌落。
2. 在 NF 验证的背景下，仅对一个菌落进行 *单核细胞增生李斯特菌* 的确认就足够了，并且必须通过以下方式之一进行：
 - a. 使用 CEN 或 ISO 标准方法中描述的常规测试（包括纯化步骤）。
 - b. 使用 ISO 7218 标准中描述的核酸探针（例如 iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, 目录 #3578124）、使用分离的菌落（有或无纯化步骤）。
 - c. 采用鼠李糖试验（目录 #3553669）进行确认。
 - d. 使用任何其他与 RAPID'*L.mono* 不同原理的 NF 验证认证的方法。必须完全遵循第二种方法的验证方案。用作确认起点的检测步骤之前的所有步骤必须对两种方法通用。
3. 在 NF 验证的背景下，只对一个菌落进行除 *单核细胞增生李斯特菌* 以外的 *李斯特菌属* 确认就足够了，并且必须通过以下方式之一进行：
 - a. 使用 CEN 或 ISO 标准方法中描述的常规测试（包括纯化步骤）。
 - b. 使用 ISO 7218 标准中描述的核探针（例如 iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, 目录 #3578113）、使用分离的菌落（有或无纯化步骤）。
 - c. 在 AL 或 PALCAM 平板上重新挑选至少一个分离的菌落并定点接种。一个 AL 或 PALCAM 平板上最多可以确认 15 个菌落。
 - d. 使用任何其他与 RAPID'*L.mono* 培养基不同原理的 NF 验证认证的方法。必须完全遵循第二种方法的验证方案。用作确认起点的检测步骤之前的所有步骤必须对两种方法通用。
4. 可疑菌落可通过使用 MALDI 生物型测试(布鲁克的生物型系统包括基质辅助激光解吸飞行时间质谱和 MBT Compass 软件,版本 4)直接从分离的菌落或纯化步骤后进行确认。根据 ISO 16140-6 (2017LR75) 该选项已获得 MicroVal 认证。
5. 如果出现不一致的结果（用 RAPID'*L.mono* 法推定为阳性，用确认法推定为阴性），实验室必须遵循必要的步骤，以确保所获结果的有效性。
6. 如果使用 RAPID'*L.mono* 计数方法确认单增李斯特菌呈阳性结果，则无需对同一样品使用 RAPID'*L.mono* 检测方法进行单增李斯特菌的确认步骤。
7. 使用计数方案时，确认少于 5 个菌落存在高估的风险，因为存在非 *单核细胞增生李斯特菌* 的典型菌落。

第 9 部分

其他方法的确认

用 iQ-Check *Listeria* spp. 和 iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kits 确认阳性结果 (NF 验证认证方案)

1. 使用无菌环, 在 RAPID'*L.mono* 培养基上滴加 100 µl 增菌液 (LSB 或半弗雷泽液)。
2. 在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养平板 24 ± 2 小时。
3. 单核细胞增生李斯特菌在 RAPID'*L.mono* 培养基上形成淡蓝色、灰蓝色至深蓝色的菌落, 其他李斯特菌属则形成白色或淡黄色的菌落, 带有或不带有黄色光晕。

第 10 部分

测试性能和验证

证书	范围	验证方案	参考方案	证书参考
AOAC-RI	布里奶酪、鱼糜、混合沙拉、 熟食火鸡	性能测试方法	FDA BAM 第 10 章 USDA MLG 8.11	 许可 # 030406
NORDVAL	所有人类食品及生产环境样品	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290 - 1 (2017) NF EN ISO 11290 - 2 (2017)	 NordVal #022

第 11 部分 参考资料

NF 验证	所有人类食品及生产环境样品	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290 - 1 (2017) EN ISO 11290 - 2 (2017)	 BRD : 07/04-09/98 BRD : 07/05-09/01 农业企业的替代分析方法 通过 AFNOR 认证 http://nf-validation.afnor.org/en
-------	---------------	----------------	--	--

第 11 部分

参考资料

Amilli A, Goldfine H, and Portnoy DA. (1991). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 173, 751–754.

Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis D.W, Holzapfel W. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *Int J Food Microbiol* 109, 127–131.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. (1990). Enhanced haemolysis agar (EHA)—an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* *Food Microbiol* 8, 37–49.

Cox LJ, Siebenga A, Pedrazzini C, and Moreton J. 1990: Performance of enhanced haemolysis agar compared to Oxford medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food enrichment broths. *Food Microbiol* 8, 51-62.

Foret J and Dorey F (1997). Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru. *Sciences des Aliments* 17, 219–225.

Heisick JE, Rosas-Marty LI and Tatini SR. (1995). Enumeration of Viable *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* in Foods. *J Food Prot* 58, 733–736.

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

ISO 11290-1:2017 - Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -- Part 1: Detection method.

ISO 11290-2:2017 - Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -- Part 2: Enumeration method.

Karpiskova R., Pejchalova M., Mokrosova J, Vytrasova J, Smuharova P, Ruprich J. (2000). Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. J Microbiol Methods 41, 267-271.

Leclercq A (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'*L.mono* and ALOA solid media. J Microbiol Methods 57, 251–258.

Manafi M (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. Int J Food Microbiol 60, 205-218.

Mengaud J, Braun-Breton C, and Cossart P. (1991). Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? Mol Microbiol, 5, 367–372.

Notermans SH, Dufrenne J. et al. (1991). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. Appl Envir Microbiol 57, 2666–2670.

Polivka C (2001). Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium RAPID'*L.mono*. Arch Lebensmittelhygiene 52, 22–23.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online at <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>

United States Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 10 *Listeria monocytogenes*. Online at <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>

第 12 部分 修订记录

发布日期	文件编号	变更
2020 年 3 月	10000127436 Ver A	- 主要变更 - 新的文档设计 - 文件编号变更 – 先前版本 RAPID_L.mono_V14_01 2019 年 7 月
2021 年 6 月	10000127436 Ver B	- 次要变更 - NF 验证更新
2023 年 5 月	10000127436 Ver C	- 微小变化 - MALDI 生物型的确认阐明 - 单增李斯特菌的确认阐明 - NF 验证的更新

请访问 www.bio-rad.com/rapidmedia, 了解有关我们全系列 RAPID 显色培养基的更多信息。

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。IQ-CHECK 是 Bio-Rad Europe GmbH 在某些司法管辖区的商标。此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

10000127436 Ver C US/EG

Sig 0123