

MICROGEN™ LISTERIA-ID SYSTEMSystem identyfikacyjny dla *Listeria sp.***Instrukcja obsługi**

MID-67 paski testowe 20 testów

Skrócona procedura

KROK 1	Wybrać pojedynczą, dobrze wyizolowaną kolonię
KROK 2	Wykonać zawiesinę w bulionie dla <i>Listeria</i>
KROK 3	Przenieść po 4 krople do każdej studzienki
KROK 4	Dodać 1 kroplę odczynnika hemolitycznego (studzienka 12)
KROK 5	Przewodź inkubację w temperaturze 35 - 37°C przez 18 - 24 godz.
KROK 6	Odczytać i zanotować wyniki
KROK 7	Wyniki zinterpretować za pomocą Oprogramowania Microgen

Przeznaczenie testu

System Microgen *Listeria-ID* przeznaczony jest do użytku profesjonalnego przez wykwalifikowany personel laboratoryjny z użyciem techniki aseptycznej i za pomocą odpowiednich środków ostrożności.

System Microgen *Listeria-ID* składa się z 12 standaryzowanych studzienek zawierających substraty i powiązany jest z Oprogramowaniem Microgen, co umożliwia identyfikację następujących gatunków z rodzaju *Listeria*:

<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria grayi</i>
<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria seeligeri</i>

Powyższe organizmy mogą zostać zidentyfikowane poprzez system *Listeria-ID* po pobraniu kolonii z podłoża selektywnego, jak również z podłoża nieselektywnego. Identyfikacja dokonywana jest na podstawie wszystkich rekomendowanych międzynarodowych metod służących do identyfikacji *Listeria spp.* bez konieczności wykonywania testów potwierdzających (1, 2, 3).

Zasada działania testu

W skład systemu Microgen *Listeria-ID* wchodzi pojedynczy pasek ze studzienkami zawierającymi 11 standardowych substratów służących do wykrywania zdolności dekarboksylacji węglowodanów i 1 pusta studzienka do wykrywania reakcji hemolizy (4). Wybór substratów znajdujących się w studzienkach oparty został na kombinacji substratów zalecanych w międzynarodowych metodach standardowych (1, 2, 3) i dodatkowych testach, które służą do potwierdzania obecności gatunków z rodzaju *Listeria* (hydroliza eskuliny, fermentacja trehalozy i arabitolu (5, 6)) i/lub dalszego różnicowania gatunków w obrębie rodzaju.

Jeżeli badany szczep metabolizuje pojedyncze substraty, zachodzi zmiana barwy podczas inkubacji (nie dodaje się żadnych odczynników drugiego dnia). Zmianę metabolizowanych substratów można interpretować używając do identyfikacji badanego szczepu oprogramowanie Microgen Identification System Software (MID-60).

Każdy pasek Microgen *Listeria-ID* składa się z dwunastu studzienek zawierających substraty dla 11 reakcji biochemicznych opisanych poniżej:

		Reakcja	Dodatnia	Ujemna
1	Eskulina	Hydroliza eskuliny	Kolor czarny	Kolor słonkowy
2	Mannitol	Fermentacja specyficznych cukrów powoduje powstanie kwasu, który zmienia pH a tym samym kolor purpury bromokrzemowej z purpurowego na żółty	Kolor żółty	Kolor purpurowy
3	Ksyloza			
4	Arabitol			
5	Ryboza			
6	Ramnoza			
7	Trehaloza			
8	Tagatoza			
9	Glukozo-1-fosforan			
10	Metylo-D-glukoza			
11	Metylo-D-mannoza			
12	Hemolizyna	Hemoliza krwinek owczych	Homogeny słonkowy płyn, brak warstwy krwinek na dnie studzienki	Warstwa czerwonych krwinek na dnie studzienki. Komórki mają kolor czerwono-brązowy.

Studzienka nr 12 jest pusta i należy ją użyć do przeprowadzenia reakcji hemolizy, kiedy odczynnik hemolityczny dodawany jest do zawiesiny bakteryjnej.

Zawartość testu

- Ramka do pasków testowych
- Formularze wyników
- Instrukcja użycia
- 20 pasków testowych zapakowanych indywidualnie
- 20 buteleczek z podłożem do przygotowania zawiesin
- 1 butelka Odczynnika Hemolitycznego

Materiały wymagane, ale niedostarczone

- Oprogramowanie Microgen Identification System Software (MID-60).
- Sterylne czy bakteriologiczne.
- Sterylne pipety pasterowskie.
- Ciepłarka (35 - 37°C), bez wentylatora.
- Lodówka (2 - 8°C).

- Pisak.
- Paski na oksydazę (MID61G).
- Woda utleniona, używać w stężeniu 3% (w/w), do testu na katalazę, patrz Literatura, poz. 1.
- Odczynniki do barwienia metodą Grama.
- Mikroskop, szkiełka do mikroskopu.
- Ciężarówka (25°C), bez wentylatora.

Przechowywanie i termin ważności

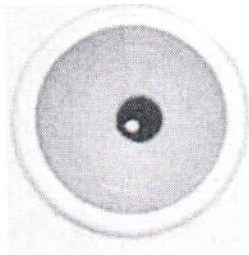
Paski ze studzienkami Microgen *Listeria*-ID System są stabilne w zamkniętych firmowo opakowaniach foliowych, przechowywane w temperaturze 2 - 8°C do czasu upływu terminu ważności oznaczonego na naklejce. Otwarte opakowania z paskami testowymi można przechowywać do 14 dni w temperaturze 2 - 8°C upewniwszy się, że opakowanie jest ponownie szczelnie zamknięte i zawiera saszetkę ze środkiem suszącym. Podłoże do przygotowywania zawiesin powinno być przechowywane w temperaturze 2 - 8°C.

Odczynnik hemolityczny powinien być przechowywany w temperaturze 2 - 8°C i po użyciu należy natychmiast umieścić go ponownie w temperaturze 2 - 8°C.

Instrukcja użycia

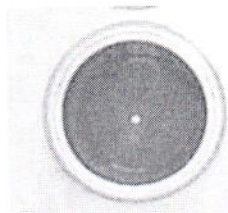
(Przed użyciem produktu należy zapoznać się ze środkami ostrożności i ograniczeniem testu)

1. Selekcja kolonii do identyfikacji
 - 1.1. Wyizolowane kolonie można pobrać z każdego podłoża selektywnego bądź nieselektywnego.
 - 1.2. Przed inkubacją w bulionie Microgen *Listeria*-ID, wyizolowane kolonie powinny być sprawdzone czy dany mikroorganizm należy do rodzaju *Listeria*. (krótkie pałeczki Gram-dodatnie, oksydazoujemne, katalazo-dodatnie, ruchliwe w temp. 25°C, ale nieruchliwe w temp. 37°C (zalecane jest sprawdzenie ruchliwości pod mikroskopem metodą opisaną w literaturze, poz. 1)). Alternatywnie użyć można testu lateksowego Microgen *Listeria* (F48).
2. Przygotowanie zawiesiny
 - 2.1. Przed użyciem, bulion należy doprowadzić do temperatury pokojowej.
 - 2.2. Wybrać pojedynczą wyizolowaną kolonię z 18-24 godzinnej hodowli i rozprzestrzenić we fiolce zawierającej bulion dla *Listeria* (2,5 ml).
 - 2.3. Dobrze wymieszać.
3. Posiew i inkubacja
 - 3.1. Wyjąć pasek testowy z opakowania foliowego, umieścić go w ramce i zdjąć plastikową pokrywkę.
 - 3.2. Używając jałową pipetkę pasterowską lub automatyczną pipetę, przenieść 3 - 4 krople (ok. 100 µl) zawiesiny bakteryjnej do każdej studzienki na pasku.
 - 3.3. Jako sprawdzian czystości zawiesiny, nanieść 1 kroplę na płytkę z odpowiednim podłożem nieselektywnym. Inkubować płytkę tlenowo w temp. 35 - 37°C przez 18 - 24 godz.
 - 3.4. Dodać 1 kroplę odczynnika hemolitycznego (dobrze wymieszać zawartość buteleczki) do 12. studzienki.
 - 3.5. Przykryć pasek plastikową pokrywką i inkubować w temp. 35 - 37°C przez 18 - 24 godz.
4. Interpretacja
 - 4.1. Po okresie inkubacji zdjąć plastikową pokrywkę z paska, zapisać wszystkie wyniki w dostarczonym formularzu.
 - 4.2. W trakcie interpretacji wyników należy odnieść się do tabeli umieszczonej w punkcie „Zasada działania testu” na stronie 2.
 - 4.3. Wynik reakcji hemolizy powinien być określany jak następuje:
 - 4.3.1. Sprawdzić dno studzienki.
 - 4.3.2. Obecność klarownego/słomkowego/ bardzo jasnoróżowego roztworu powyżej odrębnej warstwy dużej ilości nietkniętych czerwonych krwinek na dnie studzienki świadczy o UJEMNEJ reakcji hemolizy. Sprawdzić dno studzienki w celu wykrycia obecności odrębnej warstwy czerwonych.

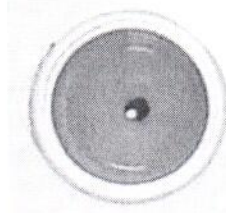


PRZYKŁAD BRAKU HEMOLIZY (WYNIK UJEMNY)

- 4.3.3. Obecność MĘTNEGO słomkowo-brązowego roztworu, przy braku obecności warstwy nietkniętych czerwonych krwinek na dnie studzienki (CAŁKOWITA HEMOLIZA) lub obecność bardzo zredukowanej ilości nietkniętych czerwonych krwinek (CZĘŚCIOWA HEMOLIZA) należy interpretować jako wynik DODATNI hemolizy.



PRZYKŁAD CAŁKOWITEJ HEMOLIZY (WYNIK DODATNI)



PRZYKŁAD CZĘŚCIOWEJ HEMOLIZY (WYNIK DODATNI)

- 4.4. Należy sprawdzić wzrost uzyskany na płytce z podłożem nieselektywnym (ad. 3.3.).
- 4.5. W formularzu wynikowym Microgen *Listeria*-ID substraty są pogrupowane w triplety (zestawy 3 reakcji), a każdemu substratowi przypisano wartość numeryczną (1, 2 lub 4). Suma dodatnich reakcji dla każdego tripletu tworzy pojedynczą cyfrę kodu ósemkowego, który używa się do oznaczenia szczepu. Kod ósemkowy wprowadza się do oprogramowania Microgen Identification System (MID-60), który generuje w wyniku 5 najbardziej prawdopodobnych organizmów w wybranej bazie danych (7).

Przykładowy formularz wyniku:

MICROGEN LISTERIA – ID REPORT FORM															
Lab. No. 2894	Specimen Type: GREEN SALAD														
	Date: 28 TH JANUARY 2002														
	Oxidase	Catalase	Lact. Aggl.	Esculin	Mannitol	Xylose	Arabitol	Ribose	Pharmrose	Trehalose	Tagatose	Gluc-1-Phos	MD-Gluc	MD-Man	Haemolysis
Reaction															
Result				+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Reaction Index				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				4			5			4					7
Profile No.	4547														
	Final Identification: <i>L. monocytogenes</i>														

Środki ostrożności

1. Test Microgen *Listeria* ID System powinien być wykonywany przez wykwalifikowany personel laboratoryjny z zachowaniem zasad aseptyki.
2. Należy podjąć odpowiednie środki ostrożności podczas pracy z organizmami potencjalnie patogennymi. Po użyciu należy zniszczyć cały zanieczyszczony materiał przez autoklawowanie, spalenie lub zalanie odpowiednim środkiem dezynfekcyjnym, np. podchlorynem sodowym w końcowym rozcieńczeniu 3% przez 30 min. Ścieki płynne zawierające kwas muszą zostać zneutralizowane przed dalszą obróbką.
3. Pokrywy plastikowe przykrywające paski ze studzienkami reakcyjnymi nie izolują studzienek w sposób całkowity, dlatego pasków nie wolno inkubować w atmosferze wzbogaconej w CO₂ (ze względu na nieprawidłowy wpływ zmienionego pH) ani w cieplarni z wentylatorem (wykluczanie nadmiernego wysuszenia).
4. Odczynnik hemolityczny powinien być używany w sposób uniemożliwiający jego zanieczyszczenie:
 - Zawsze przechowywać w temperaturze 2-8°C
 - Unikać kontaktu zakraplacza z paskami testowymi i innymi powierzchniami w trakcie używania i zawsze natychmiast zakręcać buteleczkę z zakraplaczem.
 - Nie odczytywać wyniku hemolizy po upływie 48 godzin inkubacji ze względu na samoistną hemolizę krwinek.

Odczynnik hemolityczny może dawać mylne wyniki jeżeli został zanieczyszczony. Takiego odczynnika nie należy używać. Znaki pogorszenia jakości odczynnika widoczne są poprzez znaczącą hemolizę zawartości fiolki lub pojawienie się koloru bordowo-brązowego. Jeżeli test hemolizy daje niejasne wyniki, należy wyizolowaną kolonię posiać na płytkę z podłożem zawierającym krew baranią. Po okresie inkubacji w temperaturze 35 - 37°C przez 18 - 25 godzin należy sprawdzić wzrost i wystąpienie reakcji hemolizy wokół kolonii.

Ograniczenia testu

1. Pomimo użycia podłoża selektywnego do izolacji *Listeria* spp., które hamuje wzrost szerokiego spektrum mikroorganizmów, mogą urosnąć również organizmy podobne do *Listeria* spp., takie jak: *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. i *Staphylococcus* spp.
2. System Microgen *Listeria*-ID jest przeznaczony tylko do identyfikacji drobnoustrojów należących do rodzaju *Listeria*. Jeżeli wyizolowany mikroorganizm nie hydrolizuje eskuliny lub nie fermentuje trehalozy bądź arabitolu, należy ponownie wykonać barwienie metoda Grama, testy na ruchliwość, oksydazę i katalazę.
3. Sprawdzać tylko czyste, pojedyncze kolonie, ponieważ mieszane kolonie mogą dawać błędne wyniki.
4. Zalecany jest posiew na płytkę nieselektywną w celu potwierdzenia, że do testu został użyty tylko jeden gatunek mikroorganizmu.

Kontrola jakości

Poprawność działania systemu Microgen *Listeria*-ID powinna być monitorowana z użyciem odpowiednich szczepów kontrolnych. Do niezależnej kontroli laboratoryjnej użytkownika poleca się następujące szczepy wzorcowe:

	E S C	M A N	X Y L	A R L	R I B	R H A	T R E	T A G	G I P	M D G	M D M	H E M
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 35152, NCTC 7973)	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>L. innocua</i> (ATCC 33090, NCTC 11288)	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>L. grayi</i> (ATCC 19120, NCTC 10815)	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-

Baza danych

System Microgen *Listeria*-ID jest oparty na standardowych metodach biochemicznych. Dane na temat interpretacji profili reakcyjnych są zgodne ze źródłami literaturowymi.

	ESC	MAN	XYL	ARL	RIB	RHA	TRE	TAG	GIP	MDG	MDM	HEM
<i>L. monocytogenes</i>	100	0	0	97	0	98	97	0	2	99	98	99
<i>Linocua</i>	100	0	1	100	0	70	100	0	0	100	100	0
<i>L. welshimeri</i>	100	0	95	100	0	87	100	94	0	98	94	0
<i>L. seeligeri</i>	100	0	100	100	0	0	97	0	0	100	5	93
<i>L. ivanovii</i>	100	0	97	100	42	5	86	0	92	95	0	90
<i>L. grayi</i>	100	97	0	100	100	0	98	0	0	30	94	0



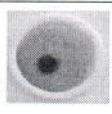



Liczby wskazują na procent szczepów pozytywnych. Zaznaczone reakcje są reakcjami potwierdzającymi dla *Listeria* spp.

Literatura

1. On Line Bacteriological Analytical Manual - Online, Chapter 10 - Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods.
2. Confirmation of *Listeria* species Method 11.3:1995 CCRFA Microbiological Methods Manual
3. ASzNZS 1766.2.15:1998 Examination for specific organisms – *Listeria monocytogenes* in dairy products.
4. Rodríguez L.D., J.A. Vazquez Boland, J.F. Fernandez Garayzabal, P. Echalecu Tranchant, E. Gomez- Lucia, E.F. Rodriguez Ferri and G. Suarez Fernandez. 1986 A Microplate Technique to Determine Hemolytic Activity for Routine Typing of *Listeria* Strains. 24:99 – 103.
5. Mira-Gutierrez J. and C.Perz De Lara and M.A. Rodriguez-Igesias. 1990. Identification of species of the genus *Listeria* by fermentation of carbohydrates and enzymatic patterns. Acta Microbiologica Hungarica 37:123 – 129.
6. Wilkinson B.J. and D.Jones. 1977. A Numerical Taxonomic Survey of *Listeria* and Related Bacteria. J.Gen. Microbiol. 98: 399 – 421.
7. Lapage S.P, S.Bascombe, W.R. Wilcox and M.A.Curtis. 1973 Identification of Bacteria by Computer: General Aspects and Perspectives J.Gen. Microbiol. 77: 273 -290

Kolorowa tabela wyników

Microgen™ *Listeria*-ID MID-67
Odczyt pasków po 24 godzinach.

WELL	1	2 to 11	12
Reaction	Esculin Hydrolysis	Carbohydrate Fermentation	Haemolysin
Negative			
Positive			



Microgen Bioproducts Ltd
1 Admiralty Way, Camberley
Surrey, GU15 3DT