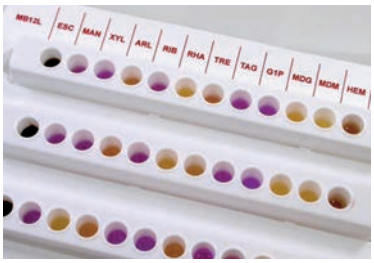
MICROBACT™ LISTERIA 12L

A self-contained, manual identification system for the rapid identification of *Listeria* species.



FAST

Accurate identifications in as little as 4 hours.

SIMPLE

No prior subculturing on blood agar, no CAMP test and no developing reagents required.

EASY TO READ AND INTERPRET

Distinct colour changes and settling pattern are read visually and interpreted easily using the Microbact™ Identification Package.

COMPREHENSIVE

Allows the definitive identification of all *Listeria* species, including *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*.

FLEXIBLE

Ideal for use with chromogenic or selective media, in clinical or food laboratory settings.

RELIABLE

Substrates include all those recommended in recognised international standard methods, including FDA BAM and ISO.

OXOID

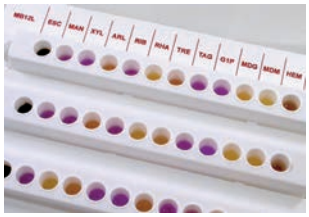
MICROBACT

IDENTIFICATION KITS

OXOID

MICROBACT

IDENTIFICATION KITS



TESTING FOR *LISTERIA*

Listeria spp. are widespread in the environment and have been isolated from many different foods and animals. *Listeria monocytogenes* is the principal causative agent of human listeriosis. In severe cases, it can cause septicaemia, meningitis, encephalitis and, in pregnant women, intrauterine infections that may lead to spontaneous abortion or stillbirth. Contaminated foods are the primary sources of *L. monocytogenes* transmission in both sporadic and outbreak cases[1,2,3]. Its ability to grow at low temperatures and its tolerance to freezing, drying and heat, make this a resilient bacterium.

PRINCIPLE

Microbact™ Listeria 12L is a complete, self-contained biochemical based identification system for the definitive identification of *Listeria* species. Each strip incorporates 12 analytes – 11 carbohydrate utilisation tests and 1 rapid micro-haemolysis test. Organism identification is based on pH change and substrate utilisation as established by published reference methodologies[4,5].

Suspect colonies (catalase-positive, oxidase-negative, motile at 25°C, non-motile at 37°C, short Gram-positive bacilli) are suspended in the Suspending Medium provided and incubated according to the size of the inoculum. The Carbohydrate Utilisation Test results are read as distinct colour changes. To read the Haemolysin Test result: if the cells settle in the bottom of the well, the test is negative. If lysis occurs, the test is positive. Results are interpreted using the Microbact™ Identification Package.

PROCEDURE

1. Pick 4 to 5 suspect colonies and suspend in Listeria Suspending Medium.
2. Place Test Strip in Holding Tray and remove lid.
3. Place 4 drops of bacterial suspension into each well.
4. Add 1 drop of Haemolysin Reagent to well 12.
5. Replace lid and incubate at 35°C ± 2ºC for 4 hours.
6. Record results on report forms and interpret using the Microbact™ Identification Package.

IMPORTANT

- Allow Haemolysin Reagent to reach room temperature before use.
- The test can be used with a single suspect colony and incubated for 18-24 hours.
- A purity check should be performed by inoculating a purity plate with 1 drop of bacterial suspension. This should be incubated at 35ºC ± 2ºC for 24 hours.
- If reactions cannot be interpreted with confidence after 4 hours, replace strip in incubator and read after further incubation.

MICROBACT™ LISTERIA 12L (MB1128A)

KIT CONTENTS:

Each kit contains sufficient materials to perform 20 identifications.

- 20 Microbact™ Listeria 12L Test Strips
- 20 Microbact™ Listeria 12L Suspending Medium Vials (3ml)
- Haemolysin Reagent
- Holding Tray
- Technical Product Insert
- Report Forms

ADDITIONAL ITEMS REQUIRED:

Microbact™ Identification Package (Windows®) MB1244A

References: 1. WHO Working Group. Foodborne Listeriosis. BullWHO (1988) 66: 421-428. 2. Brackett, R.E. Presence and persistence of Listeria *monocytogenes* in food and water. *Food Technol* (1988) **42**: 162. 3. Kerr, K.G., Dealler, S.F. and Lacey, R.W. *Listeria* in cook-chill food. *Lancet* (1988). **2**: 37-38 4. USDA, FSIS Method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. 5. AS 1766.1.15(INT)-1991, TC 34/SC5 N307, FDA Bacteriological Analytical Manual, 7th edition (1992), 141-162.

Referencia	Producto	Presentación
MB1128A	MICROBACT LISTERIA 12L KIT	20 Galerías
MB1249A	HAEMOLYSIN REAGENT	5 ML

OXOID

DEDICATED TO MICROBIOLOGY

www.oxoid.com

Oxoid Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, UK. Tel: +44 (0) 1256 841144 Fax: +44 (0) 1256 329728 Email: val.kane@oxoid.com

Folio 923/12/03

OXOID

SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN DE LISTERIA
MICROBACT™ 12L

FICHA TÉCNICA

EL SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN PARA LISTERIA MICROBACT™ 12L

INDICACIONES

El sistema **Microbact™ Listeria 12L** se halla indicado para la identificación de ***Listeria* spp.** aisladas de muestras clínicas, alimenticias y muestras relacionadas.

Microbact™ Listeria 12L representa un sistema de microsustrato estandarizado, diseñado para simular los sustratos bioquímicos convencionales utilizados para la identificación de ***Listeria* spp.**[1,2] Cada tira de identificación se compone de 12 tests (11 pruebas de utilización de azúcar y una prueba de hemólisis rápida). Las reacciones que se producen durante el periodo de incubación se demuestran mediante un cambio de color en las pruebas de utilización de azúcar, o bien por la lisis de eritrocitos de carnero en la prueba de hemólisis.

El sistema **Microbact™ Listeria 12L** puede utilizarse como test de incubación rápido de 4 horas, cuando se prepara un inoculo equivalente a un Patrón MacFarland 0,5, o como una prueba de incubación de 18-24 horas cuando se inocula a partir de una única colonia.

Tras la incubación, las reacciones se evalúan visualmente y se interpretan frente a tablas suministradas por la presente Ficha Técnica, o bien utilizando el Paquete de Identificación Informatizado **Microbact™**.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La identificación del microorganismo se basa en los cambios de pH y en la utilización de sustratos, sobre la base de las especificaciones de metodologías de referencia publicadas en la literatura.[1,2] Consulte la tabla de reacciones a continuación, para conocer los sustratos de cada pocillo, los principios de reacciones específicas y los cambios de color. Las pruebas pueden interpretarse a las 4 y 24 horas.

TABLA DE SUSTRATOS Y REACCIONES:

Nº pocillo	Designación	Principio reactivo	Reacción Negativo	Reacción Positivo	Comentarios
1	Esculina	Hidrólisis de la esculina	Amarillo	Negro	
2	Manitol	Utilización de azúcares específicos, con la generación de productos ácidos terminales	Púrpura	Amarillo	El indicador bromocresol púrpura cambia de color cuando se utiliza un azúcar apropiado, con generación de ácido IMPORTANTE: Tras 4 horas de incubación, las reacciones positivas pueden mostrar un color marrón/paja, indicando el viraje hacia un amarillo positivo
3	Xilosa		Púrpura	Amarillo	
4	Arabitol		Púrpura	Amarillo	
5	Ribosa		Púrpura	Amarillo	
6	Ramnosa		Púrpura	Amarillo	
7	Trealosa		Púrpura	Amarillo	
8	Tagatosa		Púrpura	Amarillo	
9	Glucosa-1-fosfato		Púrpura	Amarillo	
10	Metil-D-glucosa		Púrpura	Amarillo	
11	Metil-D-manosa		Púrpura	Amarillo	
12	Hemólisis	Hemólisis de hematíes	Depósito de eritrocitos	Marrón	En presencia de hemolisina, los eritrocitos experimentan lisis, dando un color marrón en todo el pocillo. En ausencia de hemolisinas, los hematíes intactos se depositan rápidamente en el fondo del pocillo de reacción, generando un depósito discretamente rojo

LAS SIGUIENTES ESPECIES PUEDEN IDENTIFICARSE MEDIANTE EL SISTEMA MICROBACT™ LISTERIA 12L:

L. monocytogenes
L. innocua
L. seeligeri
L. ivanovii
L. welshimeri
L. grayi

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Estas tiras sólo deben utilizarse *in vitro*, por personal de laboratorio cualificado y empleando técnicas asépticas, con la debida precaución contra riesgos microbiológicos.
2. Los materiales utilizados deberán pasar por autoclave, ser incinerados o inmersos en germicida, antes de desecharlos.
3. **NO** incubar las tiras **12L** en una incubadora CO_2, ya que podrían perjudicarse los sustratos y/o reacciones enzimáticas, con la generación de reacciones falsas.

ALMACENAMIENTO

Almacenar a una temperatura de 2–8° C. Las tiras reactivas son estables hasta la fecha de caducidad especificada, a condición de que permanezcan selladas en el interior de los sobres de aluminio a dicha temperatura.

PRESENTACIÓN

Cada kit contiene:

- 1 bandeja de sujeción
- Ficha técnica
- Formularios de resultados
- 20 tiras reactivas **Microbact™ Listeria 12L** con 12 pocillos cada una que contienen un sustrato deshidratado diferente, según se especifica en la tabla de sustratos.
- 20 x 3 ml viales de **Microbact™ Listeria 12L** medio de suspensión compuesto por agentes Tampón y peptonas para preparación del inóculo.
- 1 diluyente de prueba de hemolisina.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

El siguiente material puede resultar necesario, si bien no se suministra con el kit:

- Paquete de Identificación Informatizado **Microbact™**
- Asa de inoculación
- Incubadora (35°C ± 2°C)
- Pipetas estériles

MONTAJE

Esta prueba puede realizarse con colonias aisladas a partir de una amplia gama de medios selectivos y no selectivos.

PREPARACIÓN DEL INOCULO

Antes de realizar la prueba, debe confirmarse que los aislados corresponden al género ***Listeria*** (Kit de prueba para Listeria de Oxoid O.B.I.S. mono, mostrando motilidad a 25°C, ausencia de motilidad a 37°C, catalasa-positivo, oxidasa-negativo, bacilos cortos gram-positivos).

1. **PRUEBA DE 4 HORAS**
   Seleccionar 4-5 colonias de un cultivo de 18-24 horas, emulsionando en 2,5 ml de medio de suspensión para Listeria. Mezclar bien para producir una suspensión homogénea.
2. **PRUEBA DE 18 - 24 HORAS**
   Seleccionar una sola colonia de un cultivo de 18-24 horas, emulsionando en 2,5 ml de medio de suspensión para Listeria. Mezclar bien para producir una suspensión homogénea.

INOCULACIÓN

1. Extraer una tira reactiva de su sobre y colocar en la bandeja de sujeción suministrada
2. Llevar el reactivo hemolisina a temperatura ambiente
3. Retirar la tapa de la tira reactiva
4. Con una pipeta Pasteur estéril, colocar 4 gotas (aprox. 100 µl) de la suspensión bacteriana en cada pocillo
5. Añadir 1 gota de reactivo hemolisina al pocillo número 12
6. Volver a colocar la tapa
7. Colocar 1 gota del inoculo sobre un medio no selectivo apropiado, para realizar una confirmación de pureza. Incubar a 35°C ± 2°C durante 24 horas. Comprobar la pureza.

INCUBACIÓN

Incubar la(s) tiras(s) inoculada(s) a 35°C ± 2°C durante 4 horas ó 18-24 horas, dependiendo del inoculo preparado. (Ver: Preparación del inoculo).

Nota: Si las reacciones no se pueden interpretar con seguridad tras 4 horas de incubación, recolocar la(s) tira(s) en la incubadora. Las reacciones podrán interpretarse tras la incubación adicional.

LECTURA DE LA(S) TIRA(S) REACTIVA(S)

- Retirar la(s) tira(s) de la incubadora
- Retirar la tapa
- Registrar todos los resultados de prueba en el formulario de resultados correspondiente. La Tabla de reacciones ofrece ayuda para la interpretación de los resultados.

INTERPRETACIÓN

Comparar las reacciones de prueba obtenidas con los resultados esperados en la Tabla de datos que se suministra.

Ejemplo:

Reacción	Oxidasa	Catalasa	Aglutinación látex	Esculina	Manitol	Xilosa	Arabitol	Ribosa	Ramnosa	Trealosa	Tagatosa	Glucosa-1-fosfato	M-D-Glucosa	M-D-Manosa	Hemólisis
Resultado	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Índice reacción				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Suma de reacciones positivas					5			6			5			7	

Microbact™ código = **5657**

PAQUETE DE IDENTIFICACIÓN INFORMATIZADO

Se ha aplicado un código octal de cuatro dígitos para el sistema **Microbact™ Listeria 12L**, generando cada grupo de 3 reacciones un único dígito del código de cuatro dígitos. En base a los resultados obtenidos, se marca con un círculo los índices de reacciones positivas. La suma de estos índices en cada grupo de tres reacciones proporciona el número de código.

El Paquete de Identificación Informatizado **Microbact™**, o bien el Registro de Perfil de Listeria podrá consultarse a continuación para comprobar las opciones de identificación.

CONTROL DE CALIDAD

Las prestaciones globales del sistema deberán controlarse mediante el ensayo de cepas control apropiadas. Se recomiendan los siguientes organismos para la evaluación por un laboratorio independiente.

	ESC	MAN	XIL	ARL	RIB	RA	TRE	TAG	G1P	MDG	MDM	HEM
L. monocytogenes ATCC15313	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
L. grayi ATCC25400	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-

LIMITACIONES

1. El sistema de identificación **Microbact™ Listeria 12L** está diseñado para identificar bacterias pertenecientes al género ***Listeria***. No puede utilizarse para identificar organismos de otros géneros.
2. Los especímenes o muestras pueden contener una mezcla de especies, lo cual podrá llevar a la utilización de cultivos mixtos para preparar el inoculo cuando se realizan identificaciones con incubaciones de 4 horas. Si los resultados obtenidos con este inoculo pesado no reflejan un patrón reactivo claramente representativo de una única especie:

    i. Comprobar la placa de pureza. Una placa de agar sangre de caballo podrá ser de ayuda.
    ii. Comprobar la condición catalasa (+), oxidasa (-) y la morfología gram (bacilo gram-positivo).
    iii. Repetir la prueba utilizando una sola colonia.

Nota: Todas las especies de ***Listeria*** deberán dar positivo para esculina, arabitol y trealosa.

PRESTACIONES

Estudios propios han demostrado que la identificación hasta el nivel de especie puede lograrse en el 92% de los aislados tras 4 horas de incubación y en el 100% tras 24 horas de incubación, al interpretarse los resultados con el Paquete de Identificación Informatizado. (Ver a continuación)

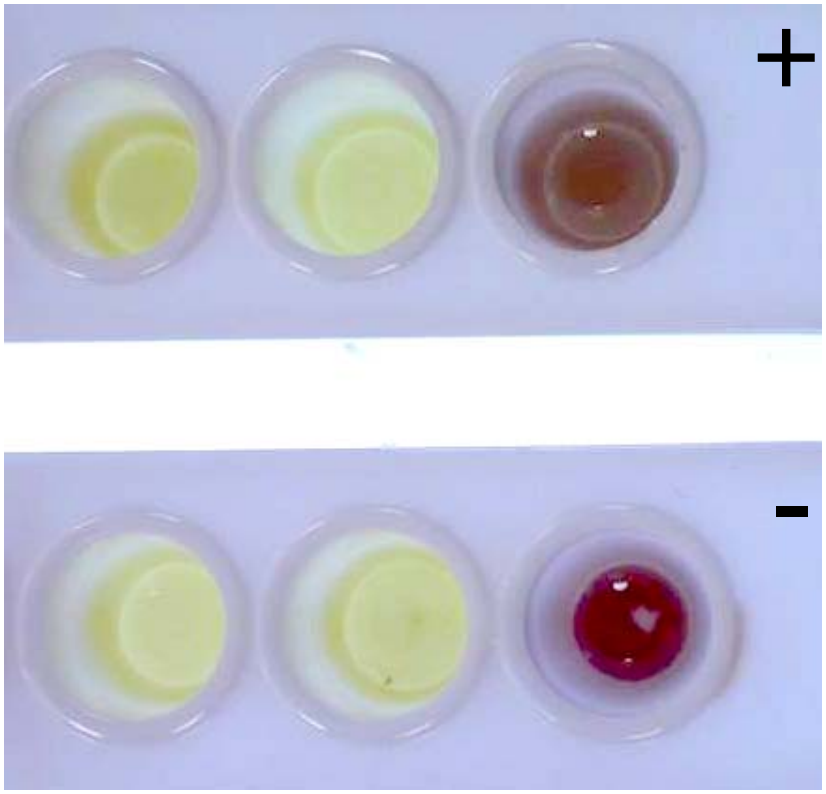
	Aislados ensayados	4 Horas	24 Horas
L. monocytogenes	45	40	45
L. innocua	27	27	27
L. welshimeri	2	2	2
L. grayi	1	1	1
TOTALES	75	70	75
% ACUERDO		92%	100%

BIBLIOGRAFÍA

1. USDA, FSIS Method for the isolation and identification of ***Listeria monocytogenes***, from processed meat and poultry products.

2. AS 1766.1.15(INT)-1991, TC 34/SC5 N307, FDA Bacteriological Analytical Manual, 7th Edn (1992) 141 - 162.

SISTEMAS AVANZADOS DE ANÁLISIS, S.L.
CIF: B-47700026
C/. Cardenal Torquemada, 24
Tel. 983 251 143 • 637 596 017
47010 VALLADOLID
www.analisisavanzados.com

Microbact 12L

with Highlighted Haemolysis Reaction in Well 12