

Protocole d'utilisation Microgen Listeria-ID

Cat. No. – MID67

REF BT01408



DISTRIBUE PAR :
BIOKAR Diagnostics
ZAC de Ther - Allonne 60000 BEAUVAIS – France Tél.
+33(0)3 44 14 33 33 Fax +33 (0)3 44 14 33 34



www.biokar-diagnostics.com
For in vitro use only



MICROGEN
BIOPRODUCTS

MARS 2024



Sommaire

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPE	3
3	REACTIFS	3
4	CONSERVATION	6
5	MODE D'EMPLOI	6
6	FICHE DE RESULTATS	8
7	PRECAUTIONS	9
8	LIMITES DU TEST	10
9	CONTROLE QUALITE	10
10	TABLEAU DES COULEURS	11
11	ELIMINATION DES DECHETS	11
12	GARANTIES DES PRODUITS, GARANTIES DE SATISFACTION	11
13	REFERENCES	12

1 INTRODUCTION

Les galeries Microgen Listeria-ID sont destinées à être utilisées par du personnel de laboratoire qualifié dans des conditions aseptiques avec les précautions microbiologiques appropriées. Ce kit n'est pas destiné à des utilisations cliniques/médicales.

Les galeries Microgen Listeria-ID utilisent 12 substrats standardisés dans des micropuits combinés avec le logiciel pour identifier les espèces du genre *Listeria* :

- *Listeria monocytogenes*
- *Listeria welshimeri*
- *Listeria ivanovii*
- *Listeria innocua*
- *Listeria grayi*
- *Listeria seeligeri*

Les organismes ci-dessus peuvent être identifiés en utilisant une galerie Microgen Listeria-ID à partir d'un milieu sélectif ou non sélectif. L'identification est réalisée en utilisant tous les tests recommandés par les standards internationaux pour l'identification de *Listeria* spp. sans avoir besoin de tests de confirmation supplémentaires (1; 2; 3; 4)

2 PRINCIPE

Chaque galerie Microgen Listeria-ID contient 11 substrats déshydratés pour la réalisation des tests d'assimilation des sucres et un micropuits vide pour l'exécution d'une réaction d'hémolysine (5). La sélection de ces substrats est basée selon les recommandations des standards internationaux (1; 2; 3; 4) ainsi que des tests supplémentaires qui confirment que l'isolat testé appartient bien au genre *Listeria* (Hydrolyse de l'Esculine, fermentation du tréhalose et de l'arabitol (6 ;7)) et / ou permet la distinction d'une espèce composant le genre.

L'identification est réalisée par la visualisation d'un changement de couleur après 18-24 heures d'incubation (il n'y a pas de réactif à ajouter au 2^{ème} jour). Pour plus d'informations sur les changements de couleur, veuillez vous référer au tableau 1 ou à la section 10. Ces résultats sont ensuite analysés à l'aide du logiciel d'identification Microgen (MID60).

3 REACTIFS

Composition du kit (20 tests)

- Support pour galerie Microgen Listeria-ID
- Fiches de résultat
- 20 galeries Microgen Listeria-ID en pack individuel
- 20 flacons de milieu de suspension *Listeria* (*Listeria* Suspending Medium)



- 1 flacon de réactif d'hémolysine

Matériel nécessaire (non fourni dans le kit)

- Logiciel d'identification Microgen system (MID-60)
- Anses calibrées stériles
- Pipettes Pasteur stériles
- Milieu non sélectif (test de pureté de la souche)
- Incubateur (35-37 ° C), sans ventilation
- Réfrigérateur (2-8 ° C)
- Marqueur
- Bandes test oxidase (MID61G) – pour la caractérisation précédente des *Listeria*
- Peroxyde d'hydrogène à 3 % pour le test de la catalase (voir référence 2) - pour la caractérisation précédente des *Listeria*
- Réactifs de coloration de Gram - pour la caractérisation précédente des *Listeria*
- Microscope et lames - pour la caractérisation précédente des *Listeria*
- Incubateur à 25 ° C - pour la caractérisation précédente des *Listeria*

Tableau 1. Chaque galerie Microgen Listeria-ID se compose de douze puits contenant les substrats pour les 11 réactions biochimiques suivantes. Le puits numéro 12 est vide ; il est utilisé pour la réaction d'hémolyse lorsque le réactif d'hémolyse est ajouté à une suspension bactérienne.

Puits	Substrat	Réaction	Positif	Négatif
1	Esculine	Hydrolyse de l'Esculine	Noir	Couleur jaune
2	Mannitol	La fermentation des sucres spécifiques produit des produits acides qui changent la couleur de l'indicateur le pourpre de bromocrésol passe du violet au jaune	Jaune	Violet
3	Xylose			
4	Arabitol			
5	Ribose			
6	Rhamnose			
7	Tréhalose			
8	Tagatose			
9	Glucose-1-Phosphate			
10	Methyl-D-Glucose			
11	Methyl-D-Mannose			
12	Hémolysine	Hémolyse des globules rouges de mouton	Jaune pâle – Liquide homogène marron. Sans bouton de globule rouge au fond du puits. Pour plus d'informations, consulter la section Interprétation (4.3).	Bouton de globule rouge au fond du puit

4 CONSERVATION

Les galeries Microgen Listeria-ID sont stables dans leurs sachets en aluminium non ouverts à 2 - 8 ° C jusqu'à la date de péremption indiquée.

Le bouillon de suspension *Listeria* et le réactif d'hémolysine doivent être conservés à 2 - 8 ° C. Le réactif d'hémolysine doit être immédiatement conservé à 2 - 8 ° C après usage.

5 MODE D'EMPLOI

Avant d'utiliser ce produit, consultez les Précautions et les Limitations.

1. Sélection des colonies pour l'identification

- 1.1. Les colonies isolées peuvent provenir d'un milieu sélectif ou non sélectif de *Listeria*.
- 1.2. Avant l'inoculation dans la galerie Microgen Listeria-ID, la pureté des colonies isolées doit être vérifiée pour s'assurer du genre *Listeria* - bacille court, Gram positif, oxydase négative, catalase positive, mobile à 25 ° C, mais non mobile à 37°C.

2. Préparation de l'inoculum

- 2.1. Porter le milieu de suspension *Listeria* à température ambiante avant l'inoculation dans les micropuits de la galerie Microgen Listeria-ID.
- 2.2. Sélectionner une seule colonie bien isolée à partir d'une culture de 18-24 heures et émulsionner dans un flacon de milieu de suspension *Listeria* (2,5 mL). La suspension doit être légèrement trouble.
- 2.3. Bien mélanger (éventuellement au vortex) pour obtenir une suspension homogène.

3. Inoculation et Incubation

- 3.1. Retirer la galerie Microgen Listeria-ID du sachet en aluminium, la placer dans le cadre de maintien et retirer le couvercle.
- 3.2. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile transférer 4 gouttes (environ 100 µl) de la suspension bactérienne dans chaque puits de la galerie Microgen Listeria-ID.
- 3.3. Pour vérifier la pureté, transférer 1 goutte de la suspension sur une gélose non sélective appropriée. Incuber la boîte en aérobiose à 35-37 ° C pendant 18-24 heures.
- 3.4. Ajouter 1 goutte de réactif d'hémolysine dans le puits n° 12.

- 3.5. Remettre le couvercle sur la galerie Microgen Listeria-ID et incuber à 35-37 °C pendant 18 à 24 heures.

4. Interprétation

- 4.1. Après l'incubation, retirer le couvercle de la galerie et consigner les résultats sur les formulaires de rapport fournis.
- 4.2. Reportez-vous à la table de test (tableau 1) pour obtenir les consignes d'interprétation des résultats.

- 4.3. La réaction d'hémolyse doit être interprétée comme il suit :

- 4.3.1. Examiner l'inoculum dans le puits.

- 4.3.2. La présence d'une solution rose pâle clair avec un gros bouton de globules rouges intacts dans le fond de la cupule, doit être interprétée comme une réaction d'hémolyse négative.



Figure 1.: Exemple d'hémolyse négative

- 4.3.3. La présence d'une solution trouble brune soit en l'absence d'un bouton de globules rouges (hémolyse totale) ou soit en présence d'un bouton très réduit de globules rouges intacts (hémolyse partielle) doit être interprétée comme une réaction d'hémolyse positive.

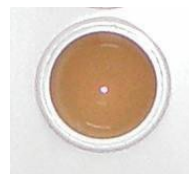


Figure 2.: Exemple d'hémolyse totale (score positif)

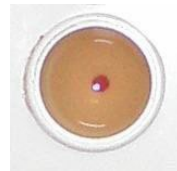




Figure 3.: Exemple d'hémolyse partielle (score positif)

- 4.4. Examiner la boîte de Pétri pour vérifier la pureté de la souche utilisée pour le test.
- 4.5. La fiche de résultat a été organisée en triplets (ensembles de 3 réactions), avec l'attribution pour chaque essai d'une valeur numérique (1,2 ou 4). La somme des réactions positives pour chaque triplet forme un seul chiffre du Code octal qui est utilisé pour déterminer l'identité de *Listeria* spp. Le code octal est entré dans le logiciel d'identification Microgen system, qui génère un rapport des cinq organismes les plus probables en fonction de la base de données sélectionnée (8).

6 FICHE DE RESULTATS

 				Microgen Listeria ID REPORT FORM											
Lab. No.				Specimen Type:											
				Date:											
Reactions	Oxidase	Catalase	Latex Agglut.	Esculin	Mannitol	Xylose	Arabitol	Ribose	Rhamnose	Trehalose	Tagatose	Gluc-1-Phos	M-D-Gluc	M-D-Man	Haemolysis
Results															
Reaction Index															
Sum of Positive Reactions															
Octal Code: _____				Final Identification: _____											
RF_MID67				Ver.: 02				Issue date: 19 APR 2023							



7 PRECAUTIONS

1. Les galeries Microgen Listeria-ID sont destinées à être utilisées par du personnel de laboratoire qualifié (seulement pour des utilisations professionnelles) dans des conditions aseptiques et avec les précautions microbiologiques appropriées. De plus, ce kit n'est pas destiné à des fins cliniques/médicales
2. Les matières utilisées doivent être éliminées en toute sécurité par autoclavage, incinération ou immersion dans un désinfectant approprié avant élimination.
3. Les couvercles des galeries ne scellent pas les micropuits complètement, c'est pour cette raison que les galeries **ne doivent pas** être incubées dans un incubateur à CO₂ (en raison des effets de pH erronés) ou d'un incubateur assisté d'un ventilateur (risque d'évaporation excessive).
4. Le réactif d'hémolysine contient des globules rouges de moutons vivants qui peuvent se détériorer en cas de manipulation incorrecte.
5. Conserver toujours entre 2 - 8 ° C. L'exposition du réactif d'hémolysine à des températures inférieures à 0 ° C entraîne une hémolyse immédiate des globules rouges. L'exposition à des températures élevées à savoir supérieure à 37°C pendant des périodes prolongées réduit de manière significative la durée de conservation du réactif d'hémolysine.
6. En outre, la contamination du réactif hémolysine se traduira par une hémolyse des globules rouges. Eviter le contact du compte-gouttes avec la galerie, la peau ou d'autres surfaces qui peuvent être responsable de contamination.
7. Le réactif hémolysine peut ne pas fonctionner correctement s'il est détérioré. Les indications les plus courantes de la détérioration du réactif d'hémolysine sont une hémolyse importante ou un changement de couleur du réactif qui prend une teinte brun-vin.
8. Si le résultat du test d'hémolyse n'est pas clair, la colonie isolée doit être ensemencée sur une gélose au sang de mouton, après incubation à 35-37 ° C pendant 18-24 heures pour observer l'hémolyse ou effectuer un test de CAMP.

9. Dans de rares occasions des *L. monocytogenes* non-hémolytiques peuvent être isolées. La pathogénicité de ces souches est actuellement incertaine. Si des colonies typiques de *L. monocytogenes* sont isolées sur une gélose chromogène, mais produisent une réaction d'hémolyse négative dans la galerie Microgen Listeria-ID, d'autres investigations doivent être entreprises par exemple le test de CAMP.

8 LIMITES DU TEST

1. Bien que les milieux sélectifs pour l'isolement de *Listeria* spp. soient formulés pour inhiber la croissance de la flore contaminante, certaines souches qui ressemblent à des *Listeria* spp. peuvent se développer sur ces milieux (*Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. et *Staphylococcus* spp.).
2. Les galeries Microgen Listeria-ID ont été conçues pour identifier des organismes appartenant au genre *Listeria* uniquement. Si la souche isolée identifiée n'hydrolyse pas l'Esculine ou ne fermente pas le Tréhalose ou l'Arabitol, la coloration de Gram, la motilité, l'oxydase et la catalase doivent être revérifiées.
3. Les échantillons peuvent contenir un mélange d'espèces donc la sélection d'une seule colonie bien isolée est essentielle pour obtenir le résultat le plus précis.
4. L'inoculation d'une boîte de Petri est recommandée car elle confirmera qu'une seule espèce a été inoculée dans la galerie Microgen Listeria-ID

9 CONTROLE QUALITE

La performance des galeries Microgen Listeria-ID doit être contrôlée en utilisant des souches de contrôle appropriées. Les éléments suivants sont recommandés pour une évaluation par un laboratoire indépendant. Il incombe à l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est effectué conformément à la réglementation locale applicable :

Tableau 2 Tests de contrôle qualité







Souche	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 13932)	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>L. innocua</i> (ATCC 33090)	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>L. seeligeri</i> (ATCC 35967)	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+

Note: Profils obtenus après culture sur gélose au sang de mouton Columbia. Veuillez vous référer aux codes taxonomiques officiels pour les dernières mises à jour des noms de souches.

10 TABLEAU DES COULEURS

Lecture des puits après 24 heures.

Tableau 3 Couleurs des réactions pour les résultats positifs/négatifs

PUITS	1	2 à 11	12
Réaction	Hydrolyse de l'Esculine	Fermentation des glucides	Hémolysine
Négatif			
Positif			

11 ELIMINATION DES DECHETS

L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales, nationales ou régionales.

12 GARANTIES DES PRODUITS, GARANTIES DE SATISFACTION

Gold Standard Diagnostics Budapest ("GSDB") garantit que les produits fabriqués sont exempts de défauts de matériaux et de fabrication, lorsqu'ils sont utilisés conformément aux instructions applicables avant la date de péremption indiquée sur l'emballage du produit et lorsqu'ils sont conservés dans les conditions de stockage recommandées dans les instructions et/ou sur l'emballage.

GSDB n'offre aucune autre garantie, explicite ou implicite.

La seule obligation de GSDB est, à son choix, de remplacer ou de rembourser le prix d'achat du (des) produit(s) ou de la partie du (des) produit(s) qui s'avère(nt) défectueux sur le plan des matériaux ou de la fabrication pendant la période de garantie, à condition que le client notifie rapidement à GSDB ce défaut dans un délai raisonnable et en apportant des preuves solides du défaut.

GSDB examinera le défaut sur place et justifiera l'approbation ou la non-approbation de la réclamation. GSDB n'est pas responsable des dommages directs, indirects ou consécutifs résultant d'une perte économique ou des dommages matériels subis par l'acheteur ou tout autre client du fait de l'utilisation du ou des produits.

Une copie des conditions générales peut être obtenue sur demande et figure également dans nos listes de prix.

13 REFERENCES

1. 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. .
2. Online Bacteriological Analytical - BAM Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. [Online] 22 04 2022.
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>.
3. Confirmation of *Listeria* species Method 11.3:1995 CCRFA Microbiological Methods Manual.
4. AS/NZS 1766.2.15:1998 - Examination for specific organisms – *Listeria monocytogenes* in dairy products.
5. A Microplate Technique to Determine Hemolytic Activity for Routine Typing of *Listeria* Strains. 24:99-103. Rodriguez 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.
6. Identification of species of the genus *Listeria* by fermentation of carbohydrates and enzymatic patterns. *Acta Microbiologica Hungarica* 37:123 – 129. 1990., Mira-Gutierrez J. and C.Perz De Lara and M.A. Rodriguez-Igesias.
7. A Numerical Taxonomic Survey of *Listeria* and Related Bacteria. *J.Gen. Microbiol.* 98: 399 – 421. 1977., Wilkinson B.J. and D.Jones.
8. Identification of Bacteria by Computer: General Apects and Perspectives *J.Gen. Microbiol.* 77: 273 -290. Lapage S.P, S.Bascombe, W.R. Willcox and M.A.Curtis.

