



MicroScan

Rapid Anaerobe ID Procedural Manual

REF B1017-2

TABLE OF CONTENTS

English	2
Français (FR)	8
Deutsch (DE)	15
Italiano (IT)	22
Español (ES)	29
Português Portugal (PT-PT)	36
Norsk (NO)	43
Ελληνικά (EL)	49
中文 (ZH-CN)	57
Polski (PL)	63
한국어 (KO)	70
Türkçe (TR)	76
Русский (RU)	82
Português Brasil (PT-BR)	90
Tiếng Việt (VI)	97
REFERENCES	104



MicroScan

Rapid Anaerobe ID Procedural Manual

REF B1017-2

INTENDED USE

The MicroScan Rapid Anaerobe Identification panel is designed for rapid identification of anaerobic bacteria isolated from human clinical specimens.

SUMMARY AND PRINCIPLE

Modified conventional and chromogenic tests are used for identification of anaerobic bacteria.^{1,2,3,4,5,6,7} A McFarland 3 suspension of the organism to be tested is made in autoclaved deionized water. The MicroScan Rapid Anaerobe Identification Panel, consisting of 24 dehydrated substrates, is rehydrated and inoculated with the bacterial suspension and incubated aerobically for 4 hours at 35-37°C. Because the MicroScan Rapid Anaerobe Identification Panel detects preformed enzymes, growth of the organism in the panel is not necessary. After incubation, changes in pH, utilization of certain substrates or other biochemical reactions are interpreted for identification.

WARNING AND PRECAUTIONS

1. MicroScan Rapid Anaerobe Identification panels and reagents are for *in vitro* diagnostic use only.
2. Do not allow Peptidase Reagent, Ehrlich's Reagent, Xylene, or any of the Identification substrates to come in contact with eyes, skin, or clothing.
3. Observe aseptic techniques and established precautions against microbiological hazards throughout all procedures, with special awareness that inoculated panels contain potentially pathogenic organisms.
4. All materials should be autoclaved prior to disposal.

STORAGE

Store panels and reagents at 2-8°C.

GHS HAZARD CLASSIFICATION

Not classified as hazardous



Safety Data Sheet is available at techdocs.beckmancoulter.com

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Appropriate specimens, devoid of normal anaerobic flora, should be collected, transported, and placed on primary isolation media according to recommended procedures in the V.P.I., *Anaerobe Laboratory Manual*,² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual*,⁸ C.D.C.'s *Laboratory Methods in Bacteriology*,⁹ and the *Manual of Clinical Microbiology*.¹⁰

NOTE: Colonies from selective media that contain antibiotics, i.e., LKV (Kanamycin/Vancomycin), or *Bacteroides* Bile Esculin (BBE) agar, Phenylethyl Alcohol (PEA), etc., should not be used to prepare inoculum for panels.

MATERIALS PROVIDED

Rapid Anaerobe Identification Panel (B1017-2)

20 Worksheets

Procedural Manual

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

Mineral Oil (B1010-40)

Cover Tray (B1010-56B)

Peptidase Reagent (B1012-30B)

0.5% N, N-Dimethyl-Alpha-Naphthylamine (B1010-45A)

0.8% Sulfanilic Acid (B1010-44A)

Ehrlich's reagent (B1015-6)

Xylene (B1015-5)

50 µL pipettor with sterile tips

Hydrogen Peroxide, 3%

Inoculum Water, 3mL autoclaved deionized water (B1015-2)

Sterile cotton-tipped applicators or sterile inoculating loops

Wooden applicator sticks

3, 4 and 5 McFarland Barium Sulfate Turbidity Standard

Vortex mixer

Incubator, non-CO₂ (35°C)

Quality Control Organisms:

C. perfringens ATCC 13124*

C. sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

PROCEDURE

Panel Preparation

1. Remove panels from refrigeration. **Panels should not be used if the desiccant is not present or is broken or if the integrity of the packaging is compromised (unsealed, punctured or torn).**
2. Cut open the pouch and remove the panel. Remove the panel immediately from the foil pouch. Allow panels to equilibrate to room temperature prior to rehydration. Panels may be stacked with clean Cover Tray on top.

Inoculum Preparation

1. Prior to inoculation of panels, organisms to be tested should be observed for aerotolerance, purity, Gram stain reaction and colony morphology.
2. Using a sterile cotton applicator or inoculating loop, suspend enough colonies from a 24-48 hour culture on non-selective media in a tube of 3mL Inoculum Water (autoclaved deionized water) to make a turbid suspension equivalent to at least a McFarland 3 standard but not greater than a McFarland 5 standard. Vortex to emulsify if necessary. Once the suspension is prepared, the panel should be inoculated within 15 minutes.**

Panel Inoculation

1. Remove panel from foil pouch and label it with the specimen number.
2. Add 50 µL of bacterial suspension to each substrates-containing well plus the two control wells (BNAC, NPC). Use of a Pasteur pipette for inoculation is not recommended.
3. After the panel has been inoculated with the 50 µL inoculum, lightly tap each side of the panel to help ensure mixing with the substrate.

Biochemical Oil Overlay

Overlay the Urea (URE) and Indole (IND) wells with 2-3 drops of mineral oil.

Incubation

1. Stack panels in groups of 3 to 5 with a cover panel over the top panel to prevent evaporation.
2. Incubate the inoculated panels for 4 hours at 35-37°C in a non-CO₂ incubator.

Reading the Panels

1. Remove the Peptidase Reagent from the refrigerator at least 30 minutes prior to reading the panels. The Peptidase Reagent may precipitate at 4°C, but it will redissolve at room temperature. Do not expose the Peptidase Reagent to elevated temperatures to accelerate the redissolving of the crystalline precipitate because high temperatures will cause the reagent to degrade.
2. The panels should be read using reflected light from a white background.

Table 1, Substrates

Substrates	Abbr.	Substrates	Abbr.
p-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside	BGAL	L-Lysine-β-Naphthylamide (acid)	LYA
p-Nitrophenyl-α-D-Galactopyranoside	AGAL	Glycylglycine-β-Naphthylamide	GGLY
bis-p-Nitrophenyl-Phosphate	BPO ₄	Glycine-β-Naphthylamide	GLY
p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminide	NGLU	L-Proline-β-Naphthylamide	PRO
p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranoside	AGL	L-Arginine-β-Naphthylamide	ARG
o-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranoside	BGL	L-Pyrrolidonyl-β-Naphthylamide	PYR
p-Nitrophenyl-Phosphate	PO ₄	L-Tryptophan-β-Naphthylamide	TRY
p-Nitrophenyl-α-L-Fucopyranoside	AFU	3-Indoxyl Phosphate	IDX
p-Nitrophenyl-α-D-Mannopyranoside	MNP	Trehalose	TRE
L-Leucine-β-Naphthylamide	LEU	Urea	URE
DL-Methionine-β-Naphthylamide	MET	Indole	IND
L-Lysine-β-Naphthylamide (alkaline)	LYB	Nitrate	NIT

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** Non-selective media include TSA, Brucella, brain heart infusion or Columbia agar, all with 5% sheep blood.

3. After 4 hours of incubation, record the results for all the substrates not requiring additional reagents: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE, and TRE. Compare BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, and MNP to the Nitrophenyl Control (NPC) well. Any shade of yellow should be recorded as positive.
4. Add 1 drop of Peptidase Reagent to LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY, and BNAC wells.
 - A. Allow the color to develop for at least 30 seconds and then record the results. Do not wait longer than 3 minutes after adding the reagents before recording the results. The presence of any shade of pink or red should be interpreted as positive. The color on these wells will darken with time so that a negative yellow color may become a darker orange color, but this should still be interpreted as a negative reaction. Reactions should be recorded as positive **only** if there is a pink or red present. Some wells may be a darker orange compared to the control well (BNAC) but these should still be recorded as negative.
 - B. After addition of Peptidase Reagent to the β -Naphthylamide control well (BNAC), the well should be yellow in color. If there is any pink or red present, then the Peptidase Reagent should be discarded to prevent false positive interpretations.
5. Two control wells are provided to assist in interpreting the reactions.
 - A. BNAC = β -Naphthylamide control. After addition of Peptidase Reagent, this well should be yellow to orange in color.
 - B. NPC = Nitrophenyl control. This well should be colorless.
6. Add one drop of Xylene to the Indole (IND) well. With the wooden applicator stick, stir the contents of the IND well. Add 1 drop of Ehrlich's Reagent. Read after 2-3 minutes.
7. Add 1 drop each of Sulfanilic Acid to the Nitrate (NIT) well followed by 1 drop of N, N-Dimethyl- α -Naphthylamine. Read after 2-3 minutes.
8. Add 2-3 drops of 3% Hydrogen Peroxide to the BGAL well. Wait 2-5 minutes before recording the result. A positive reaction is indicated by the formation of large bubbles.

RESULTS

1. Biochemical Interpretation Chart

Substrate	Reagents	Positive	Negative
BGAL AGAL BPO ₄ NGLU AGL BGL PO ₄ ¹ AFU MNP	Compare to Nitrophenyl (NPC) control well	Any shade of yellow	Clear
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	Add 1 drop of Peptidase reagent. Allow color reactions to develop for at least 30 seconds, but no longer than 3 minutes.	Any shade of Pink to Magenta	Yellow to Orange
BNAC	The β -Naphthylamide (BNAC) control well should be yellow.		
IDX		Blue color/Blue precipitate	Clear
TRE		Yellow	Orange/Red
URE		Pink-Red	Yellow-Orange
IND	Add 1 drop of Xylene, stir, add 1 drop of Ehrlich's reagent. Read after 2-3 minutes.	Pink	Yellow/Clear

Substrate	Reagents	Positive	Negative
NIT	Add 1 drop each 0.8% Sulfanilic Acid and 0.5% N, N-Dimethyl-Alpha-Naphthylamine. Read after 2-3 minutes.	Red	Clear to Pale Pink
Catalase	Add 2-3 drops of 3% Hydrogen Peroxide to BGAL. Wait 2-3 min. for bubbles to form.	Large Bubbles	No bubbles (or few tiny bubbles/same amount in all wells.)

1. A negative PO₄ reaction may be clear to very light yellow.

2. Principles of Identification Reactions

Nitrophenyl substrates (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): The ortho or para-nitrophenyl substrates are colorless. If the appropriate enzyme is present, the substrate is cleaved releasing the free o-or p-nitrophenyl, which is yellow.

Amino acid β-naphthylamide substrates (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): When the substrate is hydrolyzed by the appropriate enzyme (usually an amino acid arylamidase), β-naphthylamide is released. The β-naphthylamide is detected by the addition of p-dimethylaminocinnamaldehyde (in the Peptidase Reagent) which creates a complex that is pink to purple in color.

NOTE: The enzyme which cleaves an amino acid β-naphthylamide is an amino acid arylamidase. The term “aminopeptidase” is frequently used as a synonym for arylamidase but actually represents an enzyme with a different specificity (an aminopeptidase cleaves the N-terminal amino acid from a peptide). An arylamidase and an aminopeptidase may hydrolyze the same amino acid β-naphthylamide substrate. Thus, the panel is not necessarily measuring different and unique enzymes. A single arylamidase may hydrolyze several amino acid β-naphthylamides.

Indoxyl Phosphate (IDX): Indoxyl phosphate is cleaved by a phosphatase to release indoxyl. The indoxyl combines with oxygen to form indigo blue which is an insoluble blue or blue-green precipitate.

Trehalose (TRE): The utilization of Trehalose results in acid formation with a subsequent drop in pH which is detected by the phenol red indicator changing from orange to yellow.

Urea (URE): Urea is split by urease to form ammonia and carbon dioxide. The ammonia (in the form of ammonium carbonate) causes a rise in pH which is detected by the phenol red indicator changing from yellow to pink.

Indole (IND): The metabolism of tryptophan results in the formation of indole. Xylene extracts the indole from the broth and concentrates it. The Ehrlich's Reagent reacts with the indole to form a pink color.

Nitrate (NIT): The ability of an organism to reduce nitrate to nitrite is detected by the addition of Sulfanilic Acid and then N, N-Dimethyl-Alpha-Naphthylamine, which produce a red color in the presence of nitrite.

Catalase breaks down hydrogen peroxide to water and oxygen gas, which is liberated as bubbles.

ORGANISM IDENTIFICATION

The MicroScan Rapid Anaerobe Biotype Codebook is used for the identification of unknown test organisms. This codebook has been generated from the Beckman Coulter data base for the tests included on the identification panel.

The MicroScan Rapid Anaerobe Codebook is based on a computer analysis of the 24 tests included on the Rapid Anaerobe identification panel. The test results are transformed into a 8 digit “biotype number” for which the codebook lists a species identification and a cumulative relative probability of identification. All possible identifications are printed in descending order of highest probability to a cumulative of 99.9%. Should a biotype number occur that cannot be found in the codebook, one should first suspect a procedural error. Usually the biotype number has been added incorrectly or a reaction has been erroneously recorded. If the biotype number is correct, then the possibility of a mixed culture should be checked and the organism should be re-tested, with special emphasis on using a sufficiently turbid cell suspension. If retesting yields the same results, consult the Biotype Lookup Service on the Beckman Coulter website or consult your local distributor.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

1. Organisms to be tested should be cultured on non-selective media such as TSA, Brucella, brain heart infusion, or Columbia agar, all with 5% sheep blood. Selective media that contain antibiotics, i.e., LKV (Kanamycin/Vancomycin), *Bacteroides* Bile Esculin (BBE) agar, Phenylethyl Alcohol (PEA) agar, etc., should not be used.
2. The turbidity of the organism suspension must be equal to at least a McFarland 3 standard but not greater than McFarland 5 standard. If the suspension of the organism to be tested is less turbid than a McFarland 3 standard, weak reactions or false negative reactions may occur.
3. The Rapid Anaerobe Identification panel is designed to identify only anaerobic bacteria. Prior to testing, each organism should be tested for aerotolerance, purity, Gram stain reaction and colonial morphology. Should more than one species identification be list for a particular biotype number, supplementary tests may be necessary for the correct identification.
4. Not all anaerobic species encountered in clinical situations are included in the Rapid Anaerobe database. The species identified on the Rapid Anaerobe panel are listed in the Rapid Anaerobe Biotype Codebook. Anaerobic identifications

should be correlated with gram stains and other supporting diagnostic tests. The user should consult current reference literature for these tests and also for current bacterial nomenclature.

5. The MicroScan Rapid Anaerobe Identification Panel has not been cleared by the FDA for use with the MicroScan Instrument Systems. This panel must be read manually.

QUALITY CONTROL

The acceptability of the MicroScan Rapid Anaerobe Identification media should be checked by testing organisms with known reactions. Negative reactions may be achieved by rehydrating a panel with 50 µL of autoclaved deionized water. All substrates should be negative as described in the interpretation chart. Culture purity should be checked by subculturing from the suspension used as the inoculum onto suitable agar media. Test results are invalid if a mixed culture is detected (See Table 2).*

Table 2
Quality Control Chart

Substrates	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	—
AGAL	+	—	+	—
BPO ₄	V	—	+	—
NGLU	+	—	+	—
AGL	+	V	+	—
BGL	—	—	+	—
PO ₄	+	V	+	—
AFU	—	V	+	—
MNP	V	—	+	—
LEU	V	—	+	+
MET	V	—	V	+
LYB	V	—	V	+
LYA	—	—	—	+
GGLY	—	—	V	+
GLY	—	—	—	+
PRO	—	+	—	—
ARG	+	—	V	+
PYR	+	—	—	+
TRY	—	V	V	V
IDX	V	—	+	—
TRE ²	V	—	—	—
URE	—	+	—	—
IND	—	+	—	—
NIT ²	V	—	—	—
CATALASE	—	—	+	—

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA.

2. For optimum results, the *C. perfringens* culture should be only 24 hours old.

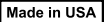
PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In clinical trials using anaerobic organisms representing a diverse set of recent clinical isolates, the Rapid Anaerobe Identification panel correctly identified 92% of the isolates.

Symbols Key

Symbols Key			
Symbol	Symbol Title	Description of Standard	Standard
Ⓢ	Do not re-use	Indicates a medical device that is intended for one use, or for use on a single patient during a single procedure.	ISO 15223-1; 5.4.2
🕒	Use-by-date	Indicates the date after which the medical device is not to be used.	ISO 15223-1; 5.1.4

*The results for each reaction for the recommended American Type Culture Collection (ATCC) control organisms are listed in the Quality Control Chart.

Symbols Key			
Symbol	Symbol Title	Description of Standard	Standard
	Batch Code	Indicates the manufacturer's batch code so that the batch or lot can be identified.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Catalogue Number	Indicates the manufacturer's catalogue number so that the medical device can be identified.	ISO 15223-1, clause 5.1.6
	Manufacturer	Indicates the medical device manufacturer, as defined in EU Directives 90/385/EEC, 93/42/EEC and 98/79/EC.	ISO 15223-1, clause 5.1.1
	Date of Manufacture	Indicates the date when the medical device was manufactured.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Authorized Representative in the European Community	Indicates the authorized representative in the European Community.	ISO 15223-1, clause 5.1.2
	Contains sufficient for <n> tests	Indicates the total number of IVD tests that can be performed with the IVD. (Typically included on reagent kits).	ISO 15223-1; 5.5.5
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device	Indicates a medical device that is intended to be used as an <i>in vitro</i> diagnostic medical device.	ISO 15223-1, clause 5.5.1
	Temperature Limitation	Indicates the temperature limits to which the medical device can be safely exposed.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Consult Instructions for Use	Indicates the need for the user to consult the instructions for use.	ISO 15223-1; 5.4.3
	CE Mark	European Conformity Regulatory Mark	n/a
	Contents	n/a	n/a
	Contents (package)	Antimicrobial Agent (abbreviation)	n/a
	Contents (package)	Identification Substrate (abbreviation)	n/a
	Safety Data Sheet	Indicates a safety data sheet.	n/a
	Made in USA	n/a	n/a
	For Export Use Only	n/a	n/a
	Reconstitution Volume	n/a	n/a
	Fragile, handle with care	Indicates a medical device that can be broken or damaged if not handled carefully.	ISO 15223-1; 5.3.1
	This way up	Indicates the correct upright position	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices - Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements.			

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

MicroScan

Manuel d'utilisation des plaques d'identification rapide des organismes anaérobies

REF B1017-2

UTILISATION

Les plaques d'identification rapide des organismes anaérobies MicroScan sont conçues pour l'identification rapide de bactéries anaérobies isolées d'échantillons cliniques humains.

RÉSUMÉ ET PRINCIPE

Des tests conventionnels modifiés et chromogéniques sont utilisés pour l'identification des bactéries anaérobies.^{1,2,3,4,5,6,7} Une suspension de l'organisme à analyser présentant une turbidité au moins équivalente à celle d'un standard de 3 McFarland est préparée dans de l'eau déionisée autoclavée. La plaque d'identification rapide des organismes anaérobies MicroScan, composée de 24 substrats déshydratés, est réhydratée et inoculée avec la suspension bactérienne puis incubée en aérobie pendant 4 heures entre 35 et 37 °C. La plaque d'identification rapide des organismes anaérobies MicroScan étant conçue pour détecter les enzymes préformées, aucune mise en culture de l'organisme de la plaque n'est nécessaire. Après l'incubation, les altérations du pH, l'utilisation de certains substrats ou d'autres réactions biochimiques sont interprétées pour l'identification.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Les plaques et réactifs d'identification rapide des organismes anaérobies MicroScan sont conçus pour un usage diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Ne pas laisser le réactif peptidase, le réactif d'Ehrlich, le xylène ou tout autre substrat d'identification entrer en contact avec les yeux, la peau ou les vêtements.
3. Observer les précautions et les techniques habituelles d'asepsie lors de toute manipulation et garder à l'esprit le fait que les plaques inoculées contiennent des germes potentiellement pathogènes.
4. Tous les matériels doivent être stérilisés en autoclave avant la mise au rebut.

CONSERVATION

Conserver les plaques et les réactifs à 2–8 °C.

CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

Non classifié comme dangereux

SDS La fiche technique santé-sécurité est disponible à l'adresse techdocs.beckmancoulter.com

RECUEIL ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Les échantillons appropriés (exempts de flore anaérobie normale) doivent être prélevés, transportés et mis en culture sur un milieu d'isolement primaire, en suivant les procédures recommandées dans les documents *Anaerobe Laboratory Manual* (Manuel d'analyse des organismes anaérobies, Virginia Polytechnic Institute),² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual* (Manuel d'analyse des bactéries anaérobies de Wadsworth),⁸ *Laboratory Methods in Bacteriology* (Méthodes de laboratoire en bactériologie, CDC),⁹ et *Manual of Clinical Microbiology* (Manuel de microbiologie clinique).¹⁰

REMARQUE : les colonies des milieux sélectifs contenant des antibiotiques, tels que LKV (Kanamycine/Vancomycine), *Bacteroides* la gélose bile-esculine (BE), l'alcool phényléthylique (PEA), etc. ne doivent pas être utilisées pour préparer l'inoculum des plaques.

MATÉRIEL FOURNI

Plaque d'identification rapide des organismes anaérobies (B1017-2)

20 feuilles de travail

Manuel d'utilisation

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Huile minérale (B1010-40)

Couvercle (B1010-56B)

Réactif Peptidase (B1012-30B)

N,N-Diméthyl-Alpha-Naphthylamine 0,5 % (B1010-45A)

Acide sulfanilique 0,8 % (B1010-44A)

Réactif d'Ehrlich (B1015-6)

Xylène (B1015-5)

Pipette de 50 µL avec embouts stériles

Peroxyde d'hydrogène, 3 %
Eau pour inoculum, 3 mL (eau désionisée autoclavée, B1015-2)
Applicateurs à embout en coton stérile ou anses d'inoculation stériles
Applicateurs en bois
Standard de turbidité de sulfate de baryum à 3, 4 et 5 McFarland
Agitateur vortex
Incubateur, sans CO₂ (35 °C)
Organismes de contrôle de qualité :
C. perfringens ATCC 13124*
C. sordellii ATCC 9714
B. fragilis ATCC 25285
P. magnus ATCC 29328

PROCÉDURE

Préparation des plaques

1. Sortir les plaques du réfrigérateur. **Les plaques ne doivent pas être utilisées si le déshydratant est absent ou rompu, ou si l'intégrité de l'emballage est compromise (non scellé, perforé ou déchiré).**
2. Ouvrir le sachet et retirer la plaque. Retirer immédiatement la plaque du sachet en aluminium. Laisser les plaques s'équilibrer à température ambiante avant la réhydratation. Les plaques peuvent être empilées en plaçant un couvercle propre au-dessus.

Préparation de l'inoculum

1. Avant de procéder à l'inoculation des plaques, il est nécessaire d'évaluer l'aérotolérance, la pureté, la réaction à une coloration de Gram et la morphologie coloniale des organismes à analyser.
2. À l'aide d'un applicateur en coton stérile ou d'une anse d'inoculation, mettre en suspension une quantité suffisante de colonies issues d'une culture de 24 à 48 heures sur un milieu non sélectif dans un tube contenant 3 mL d'eau pour inoculum (eau déionisée autoclavée), ceci afin d'obtenir une suspension présentant une turbidité au moins équivalente à celle d'un standard de 3 McFarland mais non supérieure à celle d'un standard de 5 McFarland. Si nécessaire, passer au vortex pour mettre en suspension. Une fois la suspension préparée, la plaque doit être inoculée dans les 15 minutes qui suivent.**

Inoculation de plaque

1. Retirer la plaque de son sachet en aluminium et l'étiqueter avec le numéro d'échantillon.
2. Ajouter 50 µL de suspension bactérienne dans chaque puits contenant du substrat, ainsi que dans les deux puits de contrôle (BNAC et NPC). Il est déconseillé d'utiliser une pipette Pasteur pour l'inoculation.
3. Une fois la plaque inoculée avec les 50 µL d'inoculum, taper légèrement sur chaque côté de la plaque pour bien mélanger avec le substrat.

Ajout d'huile biochimique

Recouvrir les puits d'urée (URE) et d'indole (IND) de 2 à 3 gouttes d'huile minérale.

Incubation

1. Empiler les plaques par groupes de 3 à 5, avec un couvercle sur la plaque du dessus pour éviter l'évaporation.
2. Incuber les plaques inoculées pendant 4 heures à une température de 35–37 °C dans un incubateur sans CO₂.

Lecture des plaques

1. Sortir le réactif peptidase du réfrigérateur au moins 30 minutes avant la lecture des plaques. Le réactif peptidase peut précipiter à 4 °C, mais il se redissout à température ambiante. Ne pas exposer le réactif peptidase à des températures élevées pour accélérer la dissolution du précipité cristallin, car des températures élevées entraînent la dégradation du réactif.
2. Les plaques doivent être analysées à l'aide de la lumière réfléchissante, sur fond blanc.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** Les milieux non sélectifs comprennent la gélose TSA, la gélose Brucella, le bouillon cœur-cerveille ou la gélose Columbia, chacun d'entre eux comprenant 5 % de sang de mouton.

Tableau 1 : Substrats

Substrats	Abr.	Substrats	Abr.
p-Nitrophényl-β-D-Galactopyranoside	BGAL	L-Lysine-β-Naphthylamide (acide)	LYA
p-Nitrophényl-α-D-Galactopyranoside	AGAL	Glycylglycine-β-Naphthylamide	GGLY
bis-p-Nitrophényl-Phosphate	BPO ₄	Glycine-β-Naphthylamide	GLY
p-Nitrophényl-N-Acétyle-β-D-Glucosaminide	NGLU	L-Proline-β-Naphthylamide	PRO
p-Nitrophényl-α-D-Glucopyranoside	AGL	L-Arginine-β-Naphthylamide	ARG
o-Nitrophényl-β-D-Glucopyranoside	BGL	L-Pyrrolidonyl-β-Naphthylamide	PYR
p-Nitrophényl-Phosphate	PO ₄	L-Tryptophan-β-Naphthylamide	TRY
p-Nitrophényl-α-L-Fucopyranoside	AFU	3-Indoxyl Phosphate	IDX
p-Nitrophényl-α-D-Mannopyranoside	MNP	Tréhalose	TRE
L-Leucine-β-Naphthylamide	LEU	Urée	URE
DL-Méthionine-β-Naphthylamide	MET	Indole	IND
L-Lysine-β-Naphthylamide (alcalin)	LYB	Nitrate	NIT

3. Après 4 heures d'incubation, enregistrer les résultats pour tous les substrats qui ne nécessitent pas de réactifs supplémentaires : BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE et TRE. Comparer BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU et MNP au puits de contrôle nitrophényl (NPC). Toute teinte jaune doit être enregistrée comme résultat positif.
4. Ajouter 1 goutte de réactif peptidase aux puits LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY et BNAC.
 - A. Laisser la couleur se développer pendant au moins 30 secondes avant d'enregistrer les résultats. Ne pas attendre plus de 3 minutes entre l'ajout des réactifs et l'enregistrement des résultats. La présence de toute teinte de rose ou de rouge doit être considérée comme un résultat positif. Les couleurs de ces puits deviennent plus foncées avec le temps, si bien qu'une couleur jaune négative peut prendre une teinte orange plus foncée ; toutefois, une telle couleur correspond également à une réaction négative. Une réaction doit **uniquement** être considérée comme positive si une teinte rose ou rouge est visible. Certains puits peuvent apparaître d'une teinte orange plus foncée que celle du puits de contrôle (BNAC), mais ceux-ci doivent malgré tout être considérés comme négatifs.
 - B. Une fois le réactif peptidase ajouté au puits de contrôle β-Naphthylamide (BNAC), le puits doit prendre une couleur jaune. En présence de rose ou de rouge, le réactif peptidase doit être éliminé pour éviter tout risque de faux positif.
5. Deux puits de contrôle sont proposés pour aider à l'interprétation des réactions.
 - A. BNAC = contrôle β-Naphthylamide. Après l'ajout du réactif peptidase, ce puits doit présenter une couleur jaune à orange.
 - B. NPC = contrôle nitrophényl. Ce puits doit être incolore.
6. Ajouter 1 goutte de xylène au puits Indole (IND). À l'aide de l'applicateur en bois, remuer le contenu du puits IND. Ajouter 1 goutte de réactif d'Ehrlich. Lire les résultats après 2 à 3 minutes.
7. Ajouter 1 goutte d'acide sulfanilique puis 1 goutte de N,N-Diméthyl-Alpha-Naphthylamine dans le puits Nitrate (NIT). Lire les résultats après 2 à 3 minutes.
8. Ajouter 2 à 3 gouttes de peroxyde d'hydrogène 3 % au puits BGAL. Patienter 2 à 5 minutes avant de mesurer le résultat. Une réaction positive est caractérisée par la formation de grosses bulles.

RÉSULTATS

1. Tableau d'interprétation biochimique

Substrat	Réactifs	Positif	Négatif
BGAL	Comparer au puits de contrôle Nitrophényl (NPC)	Toute teinte de jaune	Clair
AGAL			
BPO ₄			
NGLU			
AGL			
BGL			
PO ₄ ¹			
AFU			
MNP			

Substrat	Réactifs	Positif	Négatif
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	Ajouter 1 goutte de réactif peptidase. Laisser la réaction de couleur se développer pendant au moins 30 secondes, mais pas plus de 3 minutes. Le puits de contrôle β -Naphthylamide (BNAC) doit être jaune.	Toute nuance de rose à magenta	Jaune à orange
IDX		Couleur bleue/précipité bleu	Clair
TRE		Jaune	Orange/rouge
URE		Rose/rouge	Jaune/orange
IND	Ajouter 1 goutte de xylène, mélanger, puis ajouter 1 goutte de réactif d'Ehrlich. Lire les résultats après 2 à 3 minutes.	Rose	Jaune/transparent
NIT	Ajouter 1 goutte d'acide sulfanilique 0,8 %, puis 1 goutte de N,N-Diméthyl-Alpha-Naphthylamine 0,5 %. Lire les résultats après 2 à 3 minutes.	Rouge	Transparent à rose pâle
Catalase	Ajouter 2 à 3 gouttes de peroxyde d'hydrogène 3 % au puits BGAL. Patienter 2 à 3 minutes jusqu'à l'apparition de bulles.	Grosses bulles	Aucune bulle (ou quelques très petites bulles, même quantité dans tous les puits).

1. Une réaction négative avec PO_4 peut se caractériser par une teinte transparente ou jaune très pâle.

2. Principes des réactions d'identification

Substrats de nitrophényl (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP) : les substrats d'ortho-nitrophényl ou de para-nitrophényl sont incolores. Si l'enzyme appropriée est présente, le substrat est clivé, ce qui entraîne la libération d'o-nitrophényl ou de p-nitrophényl libre de couleur jaune.

Substrats d'acide aminé β -naphthylamide (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY) : une fois le substrat hydrolysé par l'enzyme adaptée (généralement un acide aminé arylamidase), de la β -naphthylamine est libérée. Le β -naphthylamide est détecté par l'ajout du p-diméthylaminocinnamaldéhyde (dans le réactif peptidase), qui crée un complexe de couleur rose à violette.

REMARQUE : l'enzyme qui permet de fendre un acide aminé β -naphthylamide est un acide aminé arylamidase. Le terme « aminopeptidase » est fréquemment utilisé comme synonyme d'arylamidase, mais il s'agit en réalité d'une enzyme aux spécificités différentes (un aminopeptidase fend l'acide aminé N-terminal d'un peptide). Un arylamidase et un aminopeptidase peuvent hydrolyser le même substrat d'acide aminé β -naphthylamide. Ainsi, la plaque ne mesure pas nécessairement des enzymes différentes et uniques. Un seul arylamidase peut hydrolyser plusieurs acides aminés β -naphthylamides.

Indoxyl phosphate (IDX) : l'indoxyl phosphate est fendu par une phosphatase, entraînant alors la libération d'indoxyl. Ce dernier se combine à l'oxygène pour former un bleu indigo, qui est un précipité insoluble bleu ou bleu-vert.

Tréhalose (TRE) : l'utilisation de tréhalose entraîne la formation d'acide puis une baisse du pH, qui est détectée par le passage du rouge de phénol de la couleur orange à la couleur jaune.

Urée (URE) : l'urée est décomposée par l'uréase, entraînant la formation d'ammoniaque et de dioxyde de carbone. L'ammoniaque (sous forme de carbonate d'ammonium) entraîne une augmentation du pH, qui est détectée par le passage du rouge de phénol de la couleur jaune à la couleur rose.

Indole (IND) : le métabolisme du tryptophane conduit à la formation d'indole. Le xylène extrait l'indole du bouillon et le concentre. Le réactif d'Ehrlich réagit avec l'indole, entraînant l'apparition d'une couleur rose.

Nitrate (NIT) : la capacité d'un organisme à réduire le nitrate en nitrite est détectée par l'ajout d'acide sulfanilique puis de N,N-Diméthyl-Alpha-Naphthylamine, qui produisent une couleur rouge en présence de nitrite.

La **catalase** décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, ce qui entraîne alors la formation de bulles.

IDENTIFICATION DE L'ORGANISME

Le livre de code d'identification rapide des biotypes d'organismes anaérobies MicroScan est utilisé pour identifier les organismes de test inconnus. Ce livre de code a été généré à partir de la base de données de Beckman Coulter pour les tests inclus sur la plaque d'identification.

Le livre de code d'identification rapide des organismes anaérobies MicroScan se base sur une analyse informatique des 24 tests de la plaque d'identification rapide des organismes anaérobies. Les résultats des tests sont traduits en un numéro de biotype à 8 chiffres, pour lequel le livre de code indique une identification d'espèce et une probabilité relative cumulée d'identification. Toutes les identifications possibles sont présentées, en ordre de probabilité décroissant, avec un total cumulé de 99,9 %. Si un numéro de biotype ne figurant pas dans le livre de codes est obtenu, il convient d'abord d'envisager une erreur de procédure. Généralement, cela signifie que le numéro de biotype a été incorrectement ajouté ou qu'une réaction a été enregistrée par erreur. Si le numéro de biotype est correct, la possibilité d'une culture mixte doit être vérifiée et l'organisme doit être testé de nouveau, en veillant notamment à utiliser une suspension de cellules présentant une turbidité suffisante. Si les résultats sont identiques après répétition du test, consulter l'outil Biotype Lookup (Recherche de biotype) sur le site internet de Beckman Coulter ou contacter votre revendeur local.

LIMITATIONS DE LA MÉTHODE

1. Les organismes à analyser doivent être mis en culture dans des milieux non sélectifs tels que la gélose TSA, la gélose Brucella, le bouillon cœur-cerveau ou la gélose Columbia, chacun d'entre eux comprenant 5 % de sang de mouton. Les milieux sélectifs contenant des antibiotiques, tels que LKV (Kanamycine/Vancomycine), *Bacteroides* la gélose bile-esculine (BE), l'alcool phényléthylique (PEA), etc. ne doivent pas être utilisés.
2. La suspension d'organisme doit présenter une turbidité au moins équivalente à celle d'un standard de 3 McFarland mais non supérieure à celle d'un standard de 5 McFarland. Si la suspension de l'organisme à analyser présente une turbidité inférieure à celle d'un standard de 3 McFarland, de faibles réactions positives ou de faux négatifs peuvent se produire.
3. La plaque d'identification rapide des organismes anaérobies est uniquement conçue pour l'identification des bactéries anaérobies. Avant de procéder à l'analyse, il est nécessaire d'évaluer l'aérotolérance, la pureté, la réaction à une coloration de Gram et la morphologie coloniale des organismes à analyser. Si plusieurs identifications d'espèce sont indiquées pour un numéro de biotype particulier, des tests supplémentaires peuvent être nécessaires pour garantir l'exactitude de l'identification.
4. Toutes les espèces anaérobies rencontrées en milieu clinique ne font pas partie de la base de données d'identification rapide des organismes anaérobies. Les espèces identifiées sur la plaque d'identification rapide des organismes anaérobies sont énumérées dans le livre de code des biotypes d'organismes anaérobies. Les identifications d'organisme anaérobie doivent être mises en corrélation avec les résultats des colorations de Gram et ceux d'autres tests diagnostiques. L'utilisateur doit se référer aux publications de référence actuelles relatives à ces tests ainsi qu'à la nomenclature bactérienne la plus récente.
5. Les plaques d'identification rapide des organismes anaérobies MicroScan n'ont pas été approuvées par la FDA pour une utilisation avec les instruments MicroScan. Ces plaques doivent être analysées manuellement.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

La validité du milieu d'identification rapide des organismes anaérobies MicroScan doit être contrôlée en testant des organismes ayant des réactions connues. Une réaction négative peut être obtenue en réhydratant une plaque à l'aide de 50 µL d'eau déionisée autoclavée. Tous les substrats doivent être négatifs, comme indiqué dans le tableau d'interprétation. La pureté de la culture doit être contrôlée en préparant une sous-culture à partir de la suspension utilisée comme inoculum sur un milieu gélosé adéquat. Les résultats d'analyse ne sont pas valides si une culture mixte est détectée (voir le tableau 2).*

Tableau 2

Graphique de contrôle de qualité

Substrats	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+

*Les résultats de chaque réaction pour les organismes de contrôle recommandés par l'American Type Culture Collection (ATCC) sont répertoriés dans le graphique de contrôle de qualité.

Tableau 2
Graphique de contrôle de qualité

Substrats	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
CATALASE	–	–	+	–

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA États-Unis.

2. Pour des résultats optimaux, la culture de *C. perfringens* doit dater 24 heures seulement.

PERFORMANCES DU DOSAGE

Au cours d'essais cliniques réalisés à l'aide d'organismes anaérobies représentant un ensemble varié d'isolats cliniques récents, les plaques d'identification rapide des organismes anaérobies ont permis une identification correcte de 92 % des isolats.

Légende des symboles

Légende des symboles			
Symbole	Titre du symbole	Description de la norme	Étalon
	Ne pas réutiliser	Indique qu'un dispositif médical est destiné à une seule utilisation ou à une utilisation sur un seul patient au cours d'une seule procédure.	ISO 15223-1 ; 5.4.2
	Date de péremption	Indique la date à partir de laquelle le dispositif médical ne doit plus être utilisé.	ISO 15223-1 ; 5.1.4
	Numéro de lot	Indique le numéro de lot du fabricant afin que le lot puisse être identifié.	ISO 15223-1 ; 5.1.5
	Numéro de catalogue	Indique la référence catalogue du fabricant afin que le dispositif médical puisse être identifié.	ISO 15223-1, clause 5.1.6
	Fabricant	Indique le fabricant du dispositif médical, tel que défini dans les directives européennes 90/385/CEE, 93/42/CEE et 98/79/CE.	ISO 15223-1, clause 5.1.1
	Date de fabrication	Indique la date à laquelle le dispositif médical a été fabriqué.	ISO 15223-1 ; 5.3.1
	Représentant autorisé dans l'Union européenne	Indique le représentant autorisé dans l'Union européenne.	ISO 15223-1, clause 5.1.2
	Contenance suffisante pour <n> tests	Indique le nombre total de tests de DIV pouvant être effectués avec le DIV. (Généralement inclus dans les coffrets de réactifs).	ISO 15223-1 ; 5.5.5

Légende des symboles			
Symbole	Titre du symbole	Description de la norme	Étalon
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	Indique un dispositif médical qui est destiné à une utilisation en tant que dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, clause 5.5.1
	Limites de température	Indique les limites de température auxquelles le dispositif médical peut être exposé en toute sécurité.	ISO 15223-1 ; 5.3.7
	Consulter le mode d'emploi	Indique que l'utilisateur doit consulter le mode d'emploi.	ISO 15223-1 ; 5.4.3
	Marquage CE	Marque réglementaire de conformité européenne	S/O
	Contenu	S/O	S/O
	Contenu (emballage)	Agent antimicrobien (abréviation)	S/O
	Contenu (emballage)	Substrat pour l'identification (abréviation)	S/O
	Fiche technique santé-sécurité	Indique une fiche de données de sécurité.	S/O
	Made in USA	S/O	S/O
	Réservé à l'export uniquement	S/O	S/O
	Volume de reconstitution	S/O	S/O
	Fragile, manipuler avec précautions	Indique un dispositif médical pouvant être cassé ou endommagé s'il n'est pas manipulé avec soin.	ISO 15223-1 ; 5.3.1
	Sens indiqué vers le haut	Indique le sens d'orientation adéquat	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical devices — Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied. Part 1: General Requirements. (ISO 15223-1 : dispositifs médicaux — Symboles à utiliser avec les étiquettes, l'étiquetage et les informations à fournir relatifs aux dispositifs médicaux. Partie 1 : exigences générales.)			

Beckman Coulter, le logo stylisé et les marques des produits et des services Beckman Coulter mentionnées ici sont des marques ou des marques déposées de Beckman Coulter, Inc. aux États-Unis et dans d'autres pays.

MicroScan

Rapid-Anaerob-ID-Verfahrensanleitung

REF B1017-2

VERWENDUNGSZWECK

Das MicroScan-Rapid-Anaerob-Identifikationspanel dient zur schnellen Identifikation von anaeroben Bakterien aus humanen klinischen Proben.

ZUSAMMENFASSUNG UND PRINZIP

Modifizierte konventionelle und chromogene Tests werden für die Identifikation von anaeroben Bakterien verwendet.^{1,2,3,4,5,6,7} Eine McFarland-Suspension von 3 des zu testenden Organismus wird in autoklaviertem deionisiertem Wasser erzeugt. Das MicroScan-Rapid-Anaerob-Identifikationspanel, das aus 24 dehydrierten Substraten besteht, wird rehydriert und mit der Bakteriensuspension beimpft und aerob für 4 Stunden bei 35–37 °C inkubiert. Da das MicroScan-Rapid-Anaerob-Identifikationspanel vorgeformte Enzyme nachweist, ist kein Wachstum des Organismus in dem Panel notwendig. Nach der Inkubation werden pH-Veränderungen, die Verwendung bestimmter Substrate oder andere biochemische Reaktionen für die Identifizierung interpretiert.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. MicroScan-Rapid-Anaerob-Identifikationspanels und -Reagenzien sind nur zur Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum.
2. Nicht zulassen, dass Peptidase-Reagenz, Ehrlich-Reagenz, Xylol oder irgendwelche der Identifikationssubstrate in Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung kommen.
3. Während der gesamten Handhabung ist steril vorzugehen. Außerdem sind Vorsichtsmaßnahmen im Hinblick auf mikrobiologische Gefahren zu ergreifen. Besondere Vorsicht ist geboten, da beimpfte Panels potenziell pathogene Organismen enthalten.
4. Alle Materialien sind vor der Entsorgung zu autoklavieren.

LAGERUNG

Panels und Reagenzien bei 2–8 °C lagern.

GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Nicht als gefährlich eingestuft

SDS

Das Sicherheitsdatenblatt ist auf techdocs.beckmancoulter.com verfügbar.

GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DES PROBENMATERIALS

Bei der Gewinnung geeigneter Proben, frei von normaler anaerober Flora, deren Transport und der Übertragung auf primäre Isolationsmedien sollte so vorgegangen werden wie in empfohlenen Verfahren in der V.P.I., *Anaerobe Laboratory Manual* (Anaerobes Laborhandbuch),² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual* (Wadsworth anaerobes bakterielles Handbuch),⁸ *Laboratory Methods in Bacteriology* (Laborverfahren der Bakteriologie) der C.D.C.,⁹ und dem *Manual of Clinical Microbiology* (Handbuch der klinischen Mikrobiologie).¹⁰

HINWEIS: Kolonien von selektiven Medien, die Antibiotika enthalten, d. h. LKV (Kanamycin/Vancomycin) oder *Bacteroides*-Gallen-Aeskulin(BBE)-Agar, Phenylethylalkohol (PEA) usw. dürfen nicht verwendet werden, um Inokulum für Panels herzustellen.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Rapid-Anaerob-Identifikationspanel (B1017-2)

20 Arbeitsblätter

Verfahrensanleitung

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Mineralöl (B1010-40)

Abdeckplatte (B1010-56B)

Peptidase-Reagenz (B1012-30B)

0,5%ige N, N-Dimethyl- α -Naphthylaminlösung (B1010-45A)

0,8%ige Sulfanilsäure (B1010-44A)

Ehrlich-Reagenz (B1015-6)

Xylol (B1015-5)

50 μ L-Pipettierhilfe mit sterilen Spitzen

Wasserstoffperoxid, 3 %

Inokulumwasser, 3 mL autoklaviertes deionisiertes Wasser (B1015-2)

Sterile Applikatoren mit Baumwollspitze oder sterile Impfösen

Holzapplikatorstäbchen

McFarland-Bariumsulfat-Trübungsstandard 3, 4 und 5

Vortexmischer

Inkubator, CO₂-frei (35 °C)

Qualitätskontrollorganismen:

C. perfringens ATCC 13124*

C. sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

DURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Panels

1. Panels aus Kühlung entfernen. **Die Panels sollten nicht verwendet werden, wenn das Trockenmittel fehlt oder zerbrochen ist oder wenn die Unversehrtheit der Verpackung nicht mehr gegeben ist (geöffnet, eingerissen oder beschädigt).**
2. Den Beutel aufschneiden und das Panel entnehmen. Das Panel unverzüglich aus dem Folienbeutel entnehmen. Die Panels vor der Rehydrierung Raumtemperatur annehmen lassen. Die Panels können mit sauberen Abdeckplatten aufeinander gestapelt werden.

Inokulum-Vorbereitung

1. Vor dem Beimpfen von Panels sollten die zu testenden Organismen auf Aerotoleranz, Reinheit, Gramfärbungsreaktion und koloniale Morphologie beobachtet werden.
2. Mit einem sterilen Baumwollapplikator oder einer Impföse ausreichend Kolonien einer 24–48 Stunden lang inkubierten Kultur auf nichtselektiven Medien in einem Röhrchen mit 3 mL Inokulumwasser (autoklaviertes deionisiertes Wasser) suspendieren, um eine trübe Suspension an mindestens einen McFarland-Standard von 3, aber nicht höher als einen McFarland-Standard von 5 anzupassen. Bei Bedarf zum Emulgieren mittels Vortex mischen. Sobald die Suspension vorbereitet ist, sollte das Panel innerhalb von 15 Minuten beimpft werden.**

Inokulation des Panels

1. Panel aus Folienbeutel entfernen und mit der Probennummer etikettieren.
2. Zu jeder Substrate enthaltenden Vertiefung sowie den zwei Kontrollvertiefungen (BNAC, NPC) 50 µL Bakteriensuspension hinzufügen. Der Gebrauch einer Pasteur-Pipette für die Inokulation wird nicht empfohlen.
3. Nachdem das Panel mit dem 50 µL-Inokulum beimpft wurde, jede Seite des Panels leicht antippen, um die Mischung mit dem Substrat sicherzustellen.

Ölüberschichtung bestimmter biochemischer Substrate

Die Harnstoff (URE)- und Indol(IND)-Vertiefungen mit 2–3 Tropfen Mineralöl überschichten.

Inkubation

1. Panels in Gruppen von 3 bis 5 mit einem Abdeckpanel über dem obersten Panel stapeln, um Verdunstung zu vermeiden.
2. Die beimpften Panels 4 Stunden lang bei 35–37 °C in einem CO₂-freien Inkubator inkubieren.

AbleSEN der Panels

1. Das Peptidase-Reagenz mindestens 30 Minuten vor dem AbleSEN der Panels aus dem Kühlschrank nehmen. Das Peptidase-Reagenz fällt möglicherweise bei 4 °C aus, aber es wird sich bei Raumtemperatur wieder neu auflösen. Das Peptidase-Reagenz keinen erhöhten Temperaturen aussetzen, um die Neuauflösung der kristallinen Ausfällung zu beschleunigen, da hohe Temperaturen dazu führen, dass sich das Reagenz zersetzt.
2. Die Panels sollten unter Verwendung von Licht, das von einem weißen Hintergrund reflektiert wurde, abgelesen werden.

Tabelle 1, Substrate

Substrate	Abk.	Substrate	Abk.
p-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid	BGAL	L-Lysin-β-Naphthylamid (Säure)	LYA
p-Nitrophenyl-α-D-Galactopyranosid	AGAL	Glycylglycin-β-Naphthylamid	GGLY

*American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

** Nichtselektive Medien umfassen TSA, Brucella, Hirn-Herz-Bouillon oder Columbia-Agar, alle mit 5 % Schafsblut.

Substrate	Abk.	Substrate	Abk.
bis-p-Nitrophenylphosphat	BPO ₄	Glycin-β-Naphthylamid	GLY
p-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminid	NGLU	L-Prolin-β-Naphthylamid	PRO
p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranosid	AGL	L-Arginin-β-Naphthylamid	ARG
o-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid	BGL	L-Pyrrolidonyl-β-Naphthylamid	PYR
p-Nitrophenylphosphat	PO ₄	L-Tryptophan-β-Naphthylamid	TRY
p-Nitrophenyl-α-L-Fucopyranosid	AFU	3-Indoxylphosphat	IDX
p-Nitrophenyl-α-D-Mannopyranosid	MNP	Trehalose	TRE
L-Leucin-β-Naphthylamid	LEU	Harnstoff	URE
DL-Methionin-β-Naphthylamid	MET	Indol	IND
L-Lysin-β-Naphthylamid (alkalisch)	LYB	Nitrat	NIT

- Nach 4-stündiger Inkubation Ergebnisse für alle Substrate ablesen, die keine zusätzlichen Reagenzien benötigen: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE und TRE. BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU und MNP mit der Nitrophenyl-Kontroll(NPC)-Vertiefung vergleichen. Jeder Gelbton ist als positiv abzulesen.
- 1 Tropfen des Peptidase-Reagenzes zu den Vertiefungen von LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY und BNAC hinzufügen.
 - Zulassen, dass die Farbe sich mindestens 30 Sekunden lang entwickelt, und dann die Ergebnisse ablesen. Nach dem Hinzufügen der Reagenzien bis zum Ablesen der Ergebnisse nicht länger als 3 Minuten warten. Das Vorhandensein aller Rosa- oder Rottöne sollte als positiv interpretiert werden. Die Farbe dieser Vertiefungen wird sich mit der Zeit verdunkeln, sodass eine negative gelbe Farbe womöglich zu einer dunkleren orangen Farbe werden kann. Dies sollte jedoch noch immer als eine negative Reaktion interpretiert werden. Reaktionen sollten **nur** als positiv abgelesen werden, wenn Rosa oder Rot vorliegt. Einige Vertiefungen können im Vergleich zu der Kontrollvertiefung (BNAC) ein dunkleres Orange haben, sollten aber noch immer als negativ abgelesen werden.
 - Nach Hinzufügen des Peptidase-Reagenzes zu der β-Naphthylamid-Kontroll(BNAC)-Vertiefung sollte die Vertiefung eine gelbe Farbe haben. Beim jedem Vorliegen von Rosa oder Rot sollte das Peptidase-Reagenz zur Vermeidung falsch-positiver Interpretationen verworfen werden.
- Zwei Kontrollvertiefungen werden mitgeliefert, um bei der Interpretation der Reaktionen zu helfen.
 - BNAC = β-Naphthylamide control (β-Naphthylamid-Kontrolle). Nach Hinzufügung des Peptidase-Reagenzes sollte diese Vertiefung gelb bis orange werden.
 - NPC = Nitrophenyl control (Nitrophenyl-Kontrolle). Diese Vertiefung sollte farblos sein.
- Einen Tropfen Xylol zu der Indol (IND)-Vertiefung hinzufügen. Mit dem Holzapplikatorstäbchen den Inhalt der IND-Vertiefung rühren. 1 Tropfen des Ehrlich-Reagenzes hinzufügen. Ergebnis nach 2–3 Minuten ablesen.
- Je 1 Tropfen Sulfanilsäure, gefolgt von 1 Tropfen N, N-Dimethyl-α-Naphthylamin zu der Nitrat(NIT)-Vertiefung hinzufügen. Ergebnis nach 2–3 Minuten ablesen.
- 2–3 Tropfen 3%iges Wasserstoffperoxid zu der BGAL-Vertiefung hinzufügen. 2–5 Minuten warten, bevor das Ergebnis abgelesen wird. Eine positive Reaktion wird durch die Bildung von großen Blasen angezeigt.

ERGEBNISSE

1. Tabelle zur biochemischen Interpretation

Substrat	Reagenzien	Positiv	Negativ
BGAL AGAL BPO ₄ NGLU AGL BGL PO ₄ ¹ AFU MNP	Mit Nitrophenyl-Kontroll(NPC)-Vertiefung vergleichen.	Jeder Gelbton	Klar
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	1 Tropfen Peptidase-Reagenz hinzufügen. Zulassen, dass die Farbreaktionen sich mindestens 30 Sekunden lang, aber nicht länger als 3 Minuten, entfalten. Die β-Naphthylamid(BNAC)-Kontrollvertiefung sollte gelb sein.	Jeder Rosa- bis Purpurrotton	Gelb bis orangefarben

Substrat	Reagenzien	Positiv	Negativ
IDX		Blaue Farbe/Blaue Ausfällung	Klar
TRE		Gelb	Orangerot
URE		Rosarot	Gelborange
IND	1 Tropfen Xylol hinzufügen, rühren, 1 Tropfen Ehrlich-Reagenz hinzufügen. Ergebnis nach 2–3 Minuten ablesen.	Pink	Gelb/Klar
NIT	Je 1 Tropfen 0,8%ige Sulfanilsäure und 0,5%ige N,N-Dimethyl- α -Naphthylaminlösung hinzufügen. Ergebnis nach 2–3 Minuten ablesen.	Rot	Klar bis blassrosa
Katalase	2–3 Tropfen 3%iges Wasserstoffperoxid zu BGAL hinzufügen. 2–3 Minuten warten, bis sich Blasen bilden.	Große Blasen	Keine Blasen (oder wenige kleine Blasen/gleiche Menge in allen Vertiefungen.)

1. Eine negative PO₄-Reaktion kann klar bis schwach hellgelb sein.

2. Grundlagen der Identifikationsreaktionen

Nitrophenyl-Substrate (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): Die ortho- oder para-Nitrophenol-Substrate sind farblos. Wenn das entsprechende Enzym vorhanden ist, wird das Substrat gespalten und gibt das freie o- oder p-Nitrophenyl frei, das gelb ist.

Aminosäure- β -Naphthylamid-Substrate (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): Wenn das Substrat durch das entsprechende Enzym (üblicherweise eine Aminosäure-Arylamidase) hydrolysiert ist, wird β -Naphthylamid freigegeben. Das β -Naphthylamid wird durch die Hinzufügung von p-Dimethyl-Aminocinnamaldehyd (in dem Peptidase-Reagenz) erkannt, wodurch ein Komplex entsteht, dessen Farbe zwischen Rosa und Violett ist.

HINWEIS: Das Enzym, welches ein Aminosäure- β -Naphthylamid spaltet, ist eine Aminosäure-Arylamidase. Der Begriff „Aminopeptidase“ wird häufig als Synonym für Arylamidase verwendet, stellt aber eigentlich ein Enzym mit einer anderen Spezifität dar (eine Aminopeptidase spaltet die N-terminale Aminosäure von einem Peptid). Eine Arylamidase und eine Aminopeptidase hydrolysieren möglicherweise das gleiche Aminosäure- β -Naphthylamid-Substrat. Deshalb misst das Panel nicht zwangsläufig verschiedene und eindeutige Enzyme. Eine einzelne Arylamidase hydrolysiert möglicherweise mehrere Aminosäure- β -Naphthylamide.

Indoxylphosphat (IDX): Indoxylphosphat wird durch eine Phosphatase gespalten, um Indoxyl freizugeben. Das Indoxyl verbindet sich mit Sauerstoff, um Indigoblau zu bilden, welches eine unlösliche blaue oder blaugüne Ausfällung ist.

Trehalose (TRE): Die Verwendung von Trehalose führt zur Säurebildung mit einem folgenden Abfall des pH-Werts, der durch den Phenolrot-Indikator angezeigt wird, der sich von orange zu gelb ändert.

Harnstoff (URE): Harnstoff wird durch Urease gespalten, um Ammoniak und Kohlendioxid zu bilden. Das Ammoniak (in der Form von Ammoniumkarbonat) verursacht einen Anstieg des pH-Werts, der durch den Phenolrot-Indikator erkannt wird, welcher sich von Gelb zu Rosa ändert.

Indol (IND): Der Stoffwechsel von Tryptophan führt zur Bildung von Indol. Xylol extrahiert das Indol von der Bouillon und konzentriert es. Das Ehrlich-Reagenz reagiert mit dem Indol und bildet eine rosa Farbe.

Nitrat (NIT): Die Fähigkeit eines Organismus, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, wird bei Vorhandensein von Nitrit durch eine Rotfärbung nach Zugabe von Sulfanilsäure und dann N, N-Dimethyl- α -Naphthylamin nachgewiesen.

Katalase zerspaltet Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoffgas, das als Blasen freigegeben wird.

ORGANISMUSIDENTIFIKATION

Das MicroScan-Rapid-Anaerob-Biotyp-Codebuch wird für die Identifikation unbekannter Testorganismen verwendet. Dieses Codebuch wurde durch die Datenbank von Beckman Coulter für die Tests erstellt, die in dem Identifikationspanel enthalten sind.

Das MicroScan-Rapid-Anaerob-Codebuch basiert auf einer Computeranalyse der 24 Tests des Rapid-Anaerob-Identifikationspanels. Die Testergebnisse werden in eine 8-stellige „Biotypnummer“ umgewandelt, für die das Codebuch eine Speziesidentifikation und eine kumulative relative Wahrscheinlichkeit der Identifikation auflistet. Alle möglichen Identifikationen werden in absteigender Reihenfolge der höchsten Wahrscheinlichkeit bis zu einer Gesamtwahrscheinlichkeit von 99,9 % ausgedruckt. Falls eine Biotypnummer auftritt, die nicht im Codebuch gefunden werden kann, so besteht zunächst einmal der Verdacht auf einen Verfahrensfehler. Meist wurde die Biotypnummer inkorrekt hinzugefügt oder eine Reaktion wurde falsch abgelesen. Wenn die Biotypnummer korrekt ist, dann sollte die Möglichkeit einer gemischten Kultur überprüft und der Organismus mit einem besonderen Fokus auf den Gebrauch einer ausreichend

trüben Zellsuspension erneut getestet werden. Wenn eine Testwiederholung zu den gleichen Ergebnissen führt, den Biotyp-Suchservice auf der Beckman Coulter-Website nutzen oder an den Händler vor Ort wenden.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Zu testende Organismen sollten auf nichtselektiven Medien wie TSA, Brucella, Hirn-Herz-Bouillon oder Columbia-Agar, alle mit 5 % Schafsblut, kultiviert werden. Selektive Medien, die Antibiotika enthalten, d. h. LKV (Kanamycin/Vancomycin), *Bacteroides*-Gallen-Aeskulin(BBE)-Agar, Phenylethylalkohol(PEA)-Agar usw. dürfen nicht verwendet werden.
2. Die Trübung der Organismussuspension muss mindestens dem McFarland-Standard von 3, aber nicht höher als McFarland-Standard von 5 entsprechen. Wenn die Suspension des zu testenden Organismus weniger trüb als ein McFarland-Standard von 3 ist, können schwache Reaktionen oder falsch-negative Reaktionen auftreten.
3. Das Rapid-Anaerob-Identifikationspanel dient nur zur Identifikation von anaeroben Bakterien. Jeder Organismus sollte vor dem Testen auf Aerotoleranz, Reinheit, Gramfärbungsreaktion und koloniale Morphologie getestet werden. Sollte mehr als eine Speziesidentifikation für eine bestimmte Biotypnummer aufgelistet werden, sind möglicherweise Zusatztests für die korrekte Identifizierung erforderlich.
4. Nicht alle anaeroben Spezies, die in klinischen Fällen auftreten, sind in der Rapid-Anaerob-Datenbank eingeschlossen. Die auf dem Rapid-Anaerob-Panel identifizierten Spezies sind in dem Rapid-Anaerob-Biotyp-Codebuch aufgeführt. Anaerobe Identifikationen sollten mit Gramfärbungen und anderen unterstützenden Diagnosetests korreliert werden. Der Benutzer sollte aktuelle Referenzliteratur für diese Tests und auch für aktuelle Bakteriennomenklatur konsultieren.
5. Das MicroScan-Rapid-Anaerob-Identifikationspanel wurde durch die FDA für die Verwendung mit den MicroScan-Gerätesystemen nicht zugelassen. Dieses Panel muss manuell abgelesen werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Eignung der MicroScan-Rapid-Anaerob-Identifikationsmedien sollte durch die Testung von Organismen mit bekanntem Reaktionsverhalten überprüft werden. Negative Reaktionen können durch Rehydrierung eines Panels mit 50 µL autoklaviertem deionisiertem Wasser erzielt werden. Alle Substrate sollten, wie in der Tabelle zur Interpretation beschrieben, negativ sein. Die Reinheit der Kultur sollte durch Subkultivierung von der als Inokulum verwendeten Suspension auf geeignete Agar-Medien geprüft werden. Testergebnisse sind ungültig, wenn eine gemischte Kultur angezeigt wird (siehe Tabelle 2).*

Tabelle 2
Qualitätskontrolltabelle

Substrate	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
KATALASE	–	–	+	–

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.

*Die Ergebnisse für jede Reaktion der empfohlenen Kontrollorganismen nach American Type Culture Collection (ATCC) sind in der Qualitätskontrolltabelle aufgeführt.

2. Für optimale Ergebnisse sollte die *C. perfringens*-Kultur nur 24 Stunden alt sein.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

In klinischen Vorstudien mit anaeroben Organismen, die einen anderen Satz von aktuellen klinischen Isolaten darstellen, identifizierte das Rapid-Anaerob-Identifikationspanel korrekt 92 % der Isolate.

Liste der Symbole

Liste der Symbole			
Symbol	Symbolbezeichnung	Beschreibung der Norm	Standard
	Nicht wiederverwenden	Weist auf ein medizinisches Gerät hin, das für eine einmalige Anwendung oder für einen einzelnen Patienten während eines einzigen Eingriffs bestimmt ist.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Verfallsdatum	Gibt das Datum an, nach dem das medizinische Gerät nicht mehr verwendet werden soll.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Seriencode	Gibt den Seriencode des Herstellers an, damit die Serie oder die Charge identifiziert werden kann.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Katalognummer	Gibt die Katalognummer des Herstellers an, damit das medizinische Gerät identifiziert werden kann.	ISO 15223-1, Abschnitt 5.1.6
	Hersteller	Gibt den Hersteller von medizinischen Geräten im Sinne der EU-Richtlinien 90/385/EWG, 93/42/EWG und 98/79/EG an.	ISO 15223-1, Abschnitt 5.1.1
	Herstellungsdatum	Gibt das Datum an, an dem das medizinische Gerät hergestellt wurde.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft	Gibt die autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft an.	ISO 15223-1, Abschnitt 5.1.2
	Enthält ausreichend für <n>-Tests	Gibt die Gesamtzahl der IVD-Tests an, die mit der IVD durchgeführt werden können. (In der Regel in Reagenzkits enthalten).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Medizinisches Gerät für die In-Vitro-Diagnostik	Gibt ein medizinisches Gerät an, das als medizinisches Gerät für die In-vitro-Diagnostik eingesetzt werden soll.	ISO 15223-1, Abschnitt 5.5.1
	Temperaturgrenzen	Gibt die Temperaturgrenzwerte an, denen das medizinische Gerät sicher ausgesetzt werden kann.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Siehe Gebrauchsanweisung	Zeigt an, dass der Benutzer die Gebrauchsanweisung beachten muss.	ISO 15223-1; 5.4.3
	CE-Kennzeichnung	Europäische Konformitätskennzeichnung	n. Z.
	Inhalt	n. Z.	n. Z.
	Inhalt (Packung)	Antibiotikum (Abkürzung)	n. Z.

Liste der Symbole

Symbol	Symbolbezeichnung	Beschreibung der Norm	Standard
	Inhalt (Packung)	Identifikationssubstrat (Abkürzung)	n. Z.
	Sicherheitsdatenblatt	Weist auf ein Sicherheitsdatenblatt hin.	n. Z.
	Made in USA	n. Z.	n. Z.
	Nur für den Export bestimmt	n. Z.	n. Z.
	Rekonstitutionsvolumen	n. Z.	n. Z.
	Zerbrechlich, mit Sorgfalt behandeln	Weist auf ein medizinisches Gerät hin, das bei nicht sachgemäßer Behandlung kaputtgehen oder beschädigt werden kann.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Diese Seite nach oben	Zeigt die richtige aufrechte Position an	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices – Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements. (ISO 15223-1: Medizinprodukte – Bei Aufschriften von Medizinprodukten zu verwendende Symbole, Kennzeichnung und zu liefernde Informationen. Teil 1: Allgemeine Anforderungen).			

Beckman Coulter, das stilisierte Logo und die in diesem Dokument erwähnten Beckman Coulter-Produkt- und -Dienstleistungsmarken sind in den USA und anderen Ländern eingetragene Marken von Beckman Coulter, Inc.

MicroScan

Manuale delle procedure per i pannelli rapidi ID anaerobi

REF B1017-2

USO PREVISTO

Il pannello rapido di identificazione degli anaerobi MicroScan è progettato per l'identificazione rapida di batteri anaerobici isolati da campioni clinici umani.

RIEPILOGO E PRINCIPIO

I test cromogeni e convenzionali modificati sono utilizzati per l'identificazione dei batteri anaerobici.^{1,2,3,4,5,6,7} Una sospensione di McFarland 3 dell'organismo da testare è eseguita in acqua deionizzata autoclavata. Il pannello di identificazione rapida degli anaerobi MicroScan, che comprende 24 substrati deidratati, è reidratato e inoculato con la sospensione batterica e incubato aerobicamente per 4 ore a 35-37 °C. Poiché il pannello di identificazione rapida degli anaerobi MicroScan rileva gli enzimi preformati, la crescita dell'organismo nel pannello non è necessaria. Dopo l'incubazione le modifiche nel pH, l'utilizzo di determinati substrati o altre reazioni chimiche sono interpretati per l'identificazione.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. I reagenti e i pannelli rapidi di identificazione degli anaerobi MicroScan sono solo per uso diagnostico *in vitro*.
2. Evitare il contatto del reagente peptidasi, del reagente di Ehrlich, dello xilene o di qualsiasi altro substrato di identificazione con gli occhi, la pelle o gli indumenti.
3. Durante l'esecuzione di tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e attenersi a tutte le precauzioni contro i rischi microbiologici, ricordando sempre che i pannelli inoculati contengono organismi potenzialmente patogeni.
4. Tutti i materiali devono essere sterilizzati in autoclave prima di essere eliminati.

CONSERVAZIONE

Conservare pannelli e reagenti a 2-8 °C.

CLASSIFICAZIONE PERICOLI GHS

Classificato non pericoloso



La scheda tecnica sulla sicurezza è disponibile su techdocs.beckmancoulter.com

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni appropriati, privati della normale flora anaerobica, vanno raccolti, trasportati e collocati su terreni per l'isolamento primario in base alle procedure consigliate nel V.P.I., *Anaerobe Laboratory Manual (Manuale del laboratorio per gli anaerobi)*,² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual (Manuale Wadsworth dei batteri anaerobici)*,⁸ i *Laboratory Methods in Bacteriology (Metodi di laboratorio per la batteriologia)* del C.D.C.,⁹ e il *Manual of Clinical Microbiology (Manuale di microbiologia clinica)*.¹⁰

NOTA: le colonie di terreni selettivi che contengono antibiotici, cioè LKV (kanamicina/vancomicina), oppure i *Bacterioidi* Bile Esculina (BBE) agar, fenilettil alcool (PEA), ecc., non vanno utilizzati per preparare un inoculo per i pannelli.

MATERIALI FORNITI

Pannello rapido di identificazione degli anaerobi (B1017-2)

20 fogli di lavoro

Manuale delle procedure

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Olio minerale (B1010-40)

Coperchio (B1010-56B)

Reagente peptidasi (B1012-30B)

0,5% N, N-dimetil-alfa-naftilamina (B1010-45A)

Acido sulfanilico 0,8% (B1010-44A)

Reagente di Ehrlich (B1015-6)

Xilene (B1015-5)

Pipettatrice da 50 µL con puntali sterili

Perossido d'idrogeno, 3%

Acqua per inoculo, 3 mL di acqua deionizzata autoclavata (B1015-2)

Applicatori sterili con punta in cotone o anse sterili per l'inoculazione

Bastoncini in legno

Standard di torbidità McFarland 3, 4 e 5 al solfato di bario

Miscelatore vortex

Incubatore, non CO₂ (35 °C)

Organismi del controllo di qualità:

C. perfringens ATCC 13124*

C. sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

PROCEDURA

Preparazione dei pannelli

1. Rimuovere i pannelli dalla refrigerazione. **Non usare i pannelli se l'essiccante non è presente o risulta danneggiato oppure se l'imballaggio non è perfettamente integro (non sigillato, forato o lacerato).**
2. Aprire l'involucro ed estrarre il pannello. Estrarre immediatamente il pannello dall'involucro in alluminio. Lasciare equilibrare i pannelli a temperatura ambiente prima della reidratazione. I pannelli possono essere impilati e coperti con un coperchio pulito.

Preparazione dell'inoculo

1. Prima dell'inoculazione dei pannelli, gli organismi da testare vanno osservati per verificare aerotolleranza, purezza, reazione alla colorazione Gram e morfologia della colonia.
2. Utilizzando un bastoncino di colore sterile o un'ansa per inoculazione, sospendere un numero sufficiente di colonie da una coltura da 24-48 su terreni non selettivi in una provetta di a tube 3 mL di acqua per inoculo (acqua deionizzata autoclavata) per realizzare una sospensione torbida equivalente almeno a uno standard McFarland 3 ma non maggiore di uno standard McFarland 5. Agitare per emulsificare se necessario. Una volta preparata la sospensione, il pannello va inoculato entro 15 minuti.**

Inoculo del pannello

1. Rimuovere il pannello dalla bustina di alluminio ed etichettarlo con il numero di campione.
2. Aggiungere 50 µL di sospensione batterica a ciascun pozzetto contenente substrati e nei due pozzetti di controllo (BNAC, NPC). Si sconsiglia l'uso di una pipetta Pasteur per l'inoculo.
3. Dopo aver inoculato il pannello con l'inoculo di 50 µL, picchiare lievemente tutti i lati del pannello per favorire la miscelazione con il substrato.

Copertura dei substrati con olio minerale

Ricoprire i pozzetti di urea (URE) e indolo (IND) con 2-3 gocce di olio minerale.

Incubazione

1. Impilare i pannelli in gruppi di 3-5 e collocare un coperchio sul pannello superiore per evitare l'evaporazione.
2. Incubare i pannelli inoculati per 4 ore a 35-37 °C in un incubatore non a CO₂.

Lettura dei pannelli

1. Estrarre il reagente peptidasi dal frigorifero almeno 30 minuti prima della lettura dei pannelli. Il reagente peptidasi può precipitare a 4 °C ma si dissolve nuovamente a temperatura ambiente. Non esporre il reagente peptidasi a temperature elevate per accelerare la ridissoluzione del precipitato cristallino in quanto le alte temperature causano la degradazione del reagente.
2. I pannelli vanno letti utilizzando luce riflessa da uno sfondo bianco.

Tabella 1, Substrati

Substrati	Abbr.	Substrati	Abbr.
p-nitrofenil-β-D-galattopiranoside	BGAL	L-lisina-β-naftilamide (acido)	LYA
p-nitrofenil-α-D-galattopiranoside	AGAL	Glicilglicina-β-naftilamide	GGLY
bis-p-nitrofenil-fosfato	BPO ₄	Glicina-β-naftilamide	GLY
p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminide	NGLU	L-prolina-β-naftilamide	PRO
p-nitrofenil-α-D-glucopiranoside	AGL	L-arginina-β-naftilamide	ARG
o-nitrofenil-β-D-glucopiranoside	BGL	L-pirrolidonil-β-naftilamide	PYR
p-nitrofenil-fosfato	PO ₄	L-triptofano-β-naftilamide	TRY

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** I terreni non selettivi comprendono TSA, Brucella, infusione cuore-cervello o Columbia agar, tutti con 5% di sangue di pecora.

Substrati	Abbr.	Substrati	Abbr.
p-nitrofenil- α -L-fucopiranoside	AFU	Fosfato 3-indossile	IDX
p-nitrofenil- α -D-mannopiranoside	MNP	Trealosio	TRE
L-leucina- β -naftilamide	LEU	Urea	URE
DL-metionina- β -naftilamide	MET	Indolo	IND
L-lisina- β -naftilamide (alcalino)	LYB	Nitrati	NIT

- Dopo 4 ore di incubazione registrare i risultati per tutti i substrati che non richiedono altri reagenti: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE e TRE. Confrontare BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, e MNP al pozzetto di controllo nitrofenile (NPC). Tutte le sfumature di giallo devono essere registrate come positive.
- Aggiungere 1 goccia di reagente peptidasi nei pozzetti LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY e BNAC.
 - Attendere almeno per 30 secondi lo sviluppo del colore e quindi registrare i risultati. Non attendere più di 3 minuti dopo l'aggiunta dei reagenti prima di registrare i risultati. La presenza di qualsiasi sfumatura di rosa o rosso va interpretata come positiva. Il colore in questi pozzetti si scurisce con il tempo, quindi un colore negativo giallo potrebbe diventare un colore arancione più scuro, ma questa va ancora interpretata come reazione negativa. Le reazioni vanno registrate come positive **solo** se è presente un colore rosa o rosso. Alcuni pozzetti potrebbero avere un colore arancione più scuro rispetto al pozzetto di controllo (BNAC), ma questi vanno ancora registrati come negativi.
 - Dopo l'aggiunta del reagente peptidasi al pozzetto di controllo β -naftilamide (BNAC), il pozzetto dovrebbe essere di colore giallo. In presenza di colorazione rosa o rossa, il reagente peptidasi va scartato per prevenire false interpretazioni positive.
- Sono forniti due pozzetti di controllo per agevolare l'interpretazione delle reazioni.
 - BNAC = controllo β -naftilamide. Dopo l'aggiunta del reagente peptidasi, questo pozzetto dovrebbe essere di colore da giallo ad arancione.
 - NPC = controllo nitrofenil. Questo pozzetto dovrebbe essere incolore.
- Aggiungere una goccia di xilene nel pozzetto Indolo (IND). Agitare il contenuto del pozzetto IND con il bastoncino di legno. Aggiungere 1 goccia di reagente di Ehrlich. Leggere dopo 2-3 minuti.
- Aggiungere 1 goccia di acido sulfanilico al pozzetto di nitrato (NIT), seguito da 1 goccia di N, N-dimetil-alfa-naftilamina. Leggere dopo 2-3 minuti.
- Aggiungere 2-3 gocce di perossido di idrogeno al 3% al pozzetto BGAL. Attendere 2-5 minuti prima di registrare il risultato. Una reazione positiva è indicata dalla formazione di grandi bolle.

RISULTATI

1. Grafico delle interpretazioni biochimiche

Substrato	Reattivi	Positivo	Negativo
BGAL AGAL BPO ₄ NGLU AGL BGL PO ₄ ¹ AFU MNP	Confrontare con il pozzetto di controllo di nitrofenile (NPC)	Tutte le sfumature di giallo	Chiaro
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	Aggiungere 1 goccia di reagente peptidasi. Attendere lo sviluppo delle reazioni cromatiche per almeno 30 secondi e non più di 3 minuti. Il pozzetto del controllo β -naftilamide (BNAC) dovrebbe essere giallo.	Tutte le sfumature da rosa a magenta	Da giallo ad arancione
IDX		Colore blu/Precipitato blu	Chiaro
TRE		Giallo	Arancione/Rosso
URE		Rosa-Rosso	Giallo-arancione

Substrato	Reattivi	Positivo	Negativo
IND	Aggiungere 1 goccia di xilene, agitare, aggiungere 1 goccia di reagente di Ehrlich. Leggere dopo 2-3 minuti.	Rosa	Giallo/Trasparente
NIT	Aggiungere 1 goccia di acido sulfanilico allo 0,8% e N, N-dimetil-alfa-naftilamina allo 0,5%. Leggere dopo 2-3 minuti.	Rosso	Da trasparente a rosa pallido
Catalasi	Aggiungere 2-3 gocce di perossido di idrogeno al 3% a BGAL. Attendere 2-3 min. che si formino bolle.	Grandi bolle	Assenza di bolle (o poche bolle di piccole dimensioni/stessa quantità in tutti i pozzetti).

1. Una reazione negativa a PO₄ può essere di colore da trasparente a giallo molto chiaro.

2. Principi delle reazioni di identificazione

Substrati di nitrofenile (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): i substrati orto o para-nitrofenile sono incolori. Se è presente l'enzima appropriato, il substrato viene scisso rilasciando o- o p-nitrofenile libero, che è giallo.

Substrati di amminoacido β-naftilamide (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): quando i substrati sono idrolizzati con l'enzima adeguato (di solito un amminoacido-arilamidasi), si assiste al rilascio di β-naftilamide. La β-naftilamide è rilevata mediante l'aggiunta di p-dimetilaminocinnamaldehyde (nel reagente peptidasi), che crea un complesso dal colore che varia dal rosa al viola.

NOTA: l'enzima che scinde un amminoacido-β-naftilamide è un amminoacido-arilamidasi. Il termine "aminopeptidasi" viene spesso utilizzato come sinonimo di arilamidasi, ma in realtà rappresenta un enzima con una specificità diversa (un'aminopeptidasi scinde l'amminoacido N-terminale da un peptide). Un'arilamidasi e un'aminopeptidasi possono idrolizzare lo stesso substrato di amminoacido β-naftilamide. Il pannello, pertanto, non misura necessariamente enzimi diversi e unici. Una sola arilamidasi può idrolizzare più amminoacido-β-naftilamidi.

Fosfato indossile (IDX): il fosfato indossile è scisso da una fosfatasi per rilasciare indossile. L'indossile si combina con l'ossigeno producendo un color indaco corrispondente a precipitato insolubile blu o verde-blu.

Trealosio (TRE): l'utilizzo di trealosio comporta la formazione di acido, con una seguente riduzione del pH che è rilevata dall'indicatore rosso fenolo che passa da arancione a giallo.

Urea (URE): l'ureasi idrolizza l'urea in modo da formare ammoniaca e il biossido di carbonio. L'ammoniaca (sotto forma di carbonato di ammonio) causa un innalzamento del pH rilevato dall'indicatore rosso fenolo, che passa da giallo a rosa.

Indolo (IND): il metabolismo del triptofano comporta la formazione di indolo. Lo xilene estrae l'indolo dal brodo e lo concentra. Il reagente di Ehrlich reagisce con l'indolo per formare un colore rosa.

Nitrato (NIT): la capacità di un organismo a ridurre nitrato in nitrito viene rilevata dall'aggiunta di acido sulfanilico e quindi N, N-Dimetil-Alfa-Naftilamina, che producono un colore rosso in presenza di nitrito.

La **catalasi** scompone il perossido di idrogeno in acqua e gas ossigeno, che è liberato come bolle.

IDENTIFICAZIONE DELL'ORGANISMO

Per identificare gli organismi di test ignoti, si utilizza l'elenco rapido dei codici dei biotipi di anaerobi MicroScan. Questo elenco è stato generato dal database di Beckman Coulter per i test inclusi nel pannello di identificazione.

L'elenco rapido degli anaerobi MicroScan si basa su un'analisi computerizzata dei 24 test inclusi nel pannello rapido di identificazione degli anaerobi. I risultati dei test vengono convertiti in un "numero di biotipo" di 8 cifre per il quale l'elenco dei codici indica un'identificazione della specie e una probabilità relativa cumulativa di identificazione. Tutte le possibili identificazioni vengono stampate in ordine decrescente di probabilità, fino a un cumulativo del 99,9%. Qualora si presenti un numero di biotipo non rilevabile nell'elenco dei codici, la prima ipotesi deve essere quella di un errore procedurale. Di solito il numero di biotipo è stato aggiunto in maniera errata o la reazione non è stata registrata correttamente. Se il numero di biotipo è esatto, è necessario considerare l'eventualità di una coltura mista e ripetere il test dell'organismo avendo cura di utilizzare una sospensione cellulare sufficientemente torbida. Se ripetendo il test si ottengono gli stessi risultati, consultare il servizio di ricerca biotipi sul sito Web di Beckman Coulter o rivolgersi al distributore di zona.

LIMITI DEL METODO

1. Gli organismi da testare vanno sottoposti a coltura su terreni non selettivi quali TSA, Brucella, infusione cuore-cervello o Columbia agar, tutti con 5% di sangue di pecora. I terreni selettivi che contengono antibiotici, cioè LKV (kanamicina/vancomicina), *Batterioidi* Bile Esculina (BBE) agar, fenilettil alcool (PEA) agar, ecc., non vanno utilizzati.
2. La torbidità della sospensione degli organismi deve essere almeno uguale a uno standard McFarland 3 ma non maggiore di uno standard McFarland 5. Se la sospensione dell'organismo da testare è meno torbida di uno standard McFarland 3, potrebbero verificarsi reazioni deboli o reazioni false negative.

3. Il pannello rapido di identificazione degli anaerobi è progettato per identificare solo i batteri anaerobici. Prima dei test, ciascun organismo va testato per verificare aerotolleranza, purezza, reazione alla colorazione Gram e morfologia della colonia. Se per un particolare numero di biotipo vengono elencate più identificazioni di specie, possono essere necessari ulteriori test per l'identificazione corretta.
4. Non tutte le specie anaerobiche riscontrate nelle situazioni cliniche sono incluse nel database degli anaerobi rapidi. Le specie identificate nel pannello degli anaerobi rapidi sono elencate nell'elenco rapido dei codici dei biotipi di anaerobi. Le identificazioni anaerobiche vanno correlate alle colorazioni gram e ad altri test diagnostici di supporto. L'utente dovrà anche consultare la letteratura di riferimento attuale per questi test e anche per l'attuale nomenclatura batterica.
5. Il pannello rapido di identificazione degli anaerobi MicroScan non è stato approvato dalla FDA per l'utilizzo con la strumentazione MicroScan. Questo pannello deve essere letto manualmente.

CONTROLLO DI QUALITÀ

L'accettabilità dei mezzi rapidi di identificazione degli anaerobi MicroScan va controllata sottoponendo a test organismi con reazioni note. Possono essere ottenute reazioni negative reidratando un pannello con 50 µL di acqua deionizzata autoclavata. Tutti i substrati dovranno essere negativi come descritto nel grafico di interpretazione. La purezza della coltura va controllata con una sottocoltura dalla sospensione utilizzata come inoculo su terreni agar adatti. I risultati del test non sono validi se è rilevata una coltura mista (vedere Tabella 2).*

Tabella 2

Grafico del controllo di qualità

Substrati	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
CATALASI	–	–	+	–

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA.

2. Per risultati ottimali, la coltura di *C. perfringens* dovrà essere di appena 24 ore prima.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Negli studi clinici che utilizzano organismi anaerobici in rappresentanza di un set diversificato di isolati clinici recenti, il pannello Identificazione rapida degli anaerobi ha identificato correttamente il 92% degli isolati.

*Nel grafico del controllo di qualità sono riportati i risultati per ogni reazione per gli organismi di controllo raccomandati dall'ATCC (Raccolta colture di tipo americano).

Elenco descrizioni simboli

Elenco descrizioni simboli			
Simbolo	Titolo del simbolo	Descrizione dello standard	Standard
	Non riutilizzare	Indica che un'apparecchiatura medica è monouso oppure intesa per l'uso da parte di un solo paziente durante un'unica procedura.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Data di scadenza	Indica la data oltre la quale non è più possibile utilizzare l'apparecchiatura medica.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Codice batch	Indica il codice lotto del produttore per la corretta identificazione del batch o del lotto.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Numero di catalogo	Indica il numero di catalogo del produttore per la corretta identificazione dell'apparecchiatura medica.	ISO 15223-1, disposizione 5.1.6
	Produttore	Indica il produttore dell'apparecchiatura medica come specificato nelle Direttive UE 90/385/CEE, 93/42/CEE e 98/79/CE.	ISO 15223-1, disposizione 5.1.1
	Data di produzione	Indica la data di produzione dell'apparecchiatura medica.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea	Indica il rappresentante autorizzato per la Comunità Europea.	ISO 15223-1, disposizione 5.1.2
	Contenuto sufficiente per <n> test	Indica il numero totale di test IVD che possono essere eseguiti con IVD. (In genere incluso nei kit reagenti).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Apparecchiatura medica per la diagnosi <i>in vitro</i>	Indica un'apparecchiatura medica intesa per l'uso come apparecchiatura medica per la diagnosi <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, disposizione 5.5.1
	Limiti di temperatura	Indica i limiti di temperatura a cui l'apparecchiatura medica può essere esposta in sicurezza.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Consultare le istruzioni per l'uso	Indica la necessità da parte dell'utente di consultare le istruzioni per l'uso.	ISO 15223-1; 5.4.3
	Marchio CE	Marchio normativo europeo di conformità	N/D
	Contenuto	N/D	N/D
	Contenuto (confezione)	Agente antimicrobico (abbreviazione)	N/D
	Contenuto (confezione)	Substrato di identificazione (abbreviazione)	N/D
	Scheda tecnica sulla sicurezza	Indica la presenza di una scheda tecnica sulla sicurezza.	N/D
	Made in USA	N/D	N/D
	Destinato unicamente all'esportazione	N/D	N/D

Elenco descrizioni simboli			
Simbolo	Titolo del simbolo	Descrizione dello standard	Standard
	Volume di ricostituzione	N/D	N/D
	Fragile, maneggiare con cura	Indica un'apparecchiatura medica che si potrebbe rompere o danneggiare se non maneggiata con cura.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Lato verso l'alto	Indica la direzione della posizione corretta	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical devices - Symbols to be used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements (ISO 15223-1: Apparecchiature medicali - Simboli da utilizzare con etichette dei dispositivi medicali e informazioni da fornire. Parte 1: Requisiti generali).			

Beckman Coulter, il logo stilizzato ed i marchi commerciali dei prodotti e servizi di Beckman Coulter menzionati qui, sono marchi commerciali o marchi commerciali registrati di Beckman Coulter, Inc., negli Stati Uniti e in altri paesi.



MicroScan

Manual de procedimientos de los paneles rápidos de identificación de anaerobios

REF B1017-2

INDICACIONES

El panel de identificación rápida de anaerobios de MicroScan está diseñado para una rápida identificación de bacterias anaeróbicas aisladas de muestras clínicas humanas.

RESUMEN Y PRINCIPIOS

Se usan pruebas convencionales y cromogénicas modificadas para la identificación de bacterias anaeróbicas.^{1,2,3,4,5,6,7} Se crea una suspensión McFarland 3 del organismo sobre el que se realizarán las pruebas en agua desionizada esterilizada en autoclave. El panel de identificación rápida de anaerobios de MicroScan, que comprende 24 sustratos deshidratados, se vuelve a hidratar e se le inocula la suspensión bacteriana e incuba aeróbicamente durante 4 horas a 35-37 °C. Dado que el panel de identificación rápida de anaerobios de MicroScan detecta enzimas preformadas, el crecimiento del organismo en el panel no es necesario. Después de la incubación, los cambios en el pH, el uso de determinados sustratos u otras reacciones bioquímicas se interpretan para su identificación.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Los paneles rápidos de identificación de anaerobios y reactivos de MicroScan son exclusivamente para uso de diagnóstico *in vitro*.
2. No permita que el reactivo de peptidasa, reactivo de Ehrlich, xileno o cualquiera de los sustratos de identificación entren en contacto con los ojos, la piel o la ropa.
3. Siga las técnicas asépticas y las precauciones establecidas contra los peligros microbiológicos a lo largo de todos los procedimientos, teniendo especial cuidado con los paneles inoculados, que contienen microorganismos potencialmente patógenos.
4. Todos los materiales deben esterilizarse en autoclave antes de desecharse.

ALMACENAMIENTO

Almacene los paneles y los reactivos a 2-8 °C.

CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

No clasificado como tóxico

SDS

La hoja de datos de seguridad está disponible en techdocs.beckmancoulter.com

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se deben recopilar muestras adecuadas, sin la flora anaeróbica normal, transportarse y colocarse en medios de aislamiento primarios de conformidad con los procedimientos recomendados en V.P.I., *Manual de laboratorio de anaerobios*,² *Manual bacteriano anaeróbico de Wadsworth*,⁸ C.D.C.'s *Métodos de laboratorio en bacteriología*,⁹ y el *Manual de microbiología clínica*.¹⁰

NOTA: las colonias de medios selectivos que contienen antibióticos; es decir, LKV (Kanamicina/Vancomicina), o agar de *Bacteroides* Bile Esculin (BBE) agar, alcohol feniletil (PEA), etc., no deben usarse para preparar inóculo para paneles.

MATERIALES PROPORCIONADOS

Panel rápido de identificación de anaerobios (B1017-2)

20 hojas de trabajo

Manual de procedimiento

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

Aceite mineral (B1010-40)

Panel cubridor (B1010-56B)

Reactivo de peptidasa (B1012-30B)

N, N-dimetil-alfa-naftilamina a 0,5 % (B1010-45A)

Ácido sulfanílico al 0,8 % (B1010-44A)

Reactivo de Ehrlich (B1015-6)

Xileno (B1015-5)

Pipeta de 50 µL con puntas esterilizadas

Peróxido de hidrógeno, 3 %

Agua inócua, 3 mL de agua desionizada esterilizada en autoclave (B1015-2)

Aplicadores con punta de algodón estériles o asas de inoculación estériles

Aplicadores de madera

Estándar de turbidez de sulfato de bario 3, 4 y 5 de McFarland

Mezclador de tipo vortex

Incubadora, sin CO₂ (35 °C)

Microorganismo para control de calidad:

C. perfringens ATCC 13124*

C. sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

PROCEDIMIENTO

Preparación del panel

1. Retire los paneles del refrigerador. **Los paneles no deben utilizarse si no tienen desecador, si está roto, o si la integridad de la envoltura está afectada (abierta, perforada o desgarrada).**
2. Corte la bolsa para abrirla y retire el panel. Extraiga inmediatamente el panel de la bolsa de aluminio. Deje que los paneles se atemperen a temperatura ambiente antes de rehidratarlos. Los paneles se pueden apilar con un panel cubridor encima.

Preparación del inóculo

1. Antes de la inoculación de los paneles, se deben observar los organismos en los que se realizarán las pruebas en función de la aerotolerancia, pureza, reacción de cepas Gram y morfología de las colonias.
2. Con un aplicador de algodón esterilizado o asa de inoculación, suspenda colonias suficientes de un cultivo de 24 a 48 horas en medio no selectivo de un tubo de agua inócua de 3 mL (agua desionizada esterilizada en autoclave) para crear una suspensión turbia equivalente a, al menos, un estándar McFarland 3, pero no superior a un estándar McFarland 5. De ser necesario, agite en vórtice para emulsionar. Una vez preparada la suspensión, el panel debe inocularse en un período de 15 minutos.**

Inoculación del panel

1. Retire el panel de la bolsa de aluminio y rotúlela con el número de muestra.
2. Añada 50 µL de suspensión bacteriana a cada uno de los pocillos que contienen los sustratos más los dos pocillos de control (BNAC, NPC). No se recomienda el uso de una pipeta Pasteur para la inoculación.
3. Una vez que el panel se haya inoculado con el inóculo de 50 µL, golpee ligeramente cada lado del panel para facilitar la mezcla con el sustrato.

Superposición de aceite bioquímico

Superponga los pocillos de urea (URE) e indol (IND) con 2 a 3 gotas de aceite mineral.

Incubación

1. Apile los paneles en grupos de 3 a 5 con un panel cubridor sobre el panel superior para evitar la evaporación.
2. Incube los paneles inoculados durante 4 horas a 35-37 °C en un incubador sin CO₂.

Lectura de los paneles

1. Retire el reactivo de peptidasa del refrigerador al menos 30 minutos antes de leer los paneles. El reactivo de peptidasa puede precipitarse a 4 °C, pero se volverá a disolver a temperatura ambiente. No exponga el reactivo de peptidasa a temperaturas elevadas para acelerar la redisolución del precipitado cristalino, ya que las temperaturas altas harán que el reactivo se degrade.
2. Se deben leer los paneles utilizando luz reflejada por un fondo blanco.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.

** Los medios no selectivos incluyen TSA, Brucella, infusión de cerebro corazón o agar de Columbia, todos con sangre de oveja al 5 %.

Tabla 1, Sustratos

Sustratos	Abrev.	Sustratos	Abrev.
p-nitrofenil-β-D-galactopiranosido	BGAL	L-lisina-β-naftilamida (ácido)	LYA
p-nitrofenil-α-D-galactopiranosido	AGAL	Glicilglicina-β-naftilamida	GGLY
bis-p-nitrofenil-fosfato	BPO ₄	Glicina-β-naftilamida	GLY
p-nitrofenol-N-acetil-β-D-glucosamina	NGLU	L-prolina-β-naftilamida	PRO
p-nitrofenil-α-D-glucopiranosida	AGL	L-arginina-β-naftilamida	ARG
o-Nitrofenol-β-D-Glucopiranosido	BGL	L-pirrolidonil-β-naftilamida	PYR
p-nitrofenil-fosfato	PO ₄	L-tritofano-β-naftilamida	TRY
p-nitrofenil-α-L-fucopiranosida	AFU	3-indoxil fosfato	IDX
p-nitrofenil-α-D-mannopiranosida	MNP	Trehalosa	TRE
L-leucina-β-naftilamida	LEU	Urea	URE
DL-metionina-β-naftilamida	MET	Indol	IND
L-lisina-β-naftilamida (alcalina)	LYB	Nitrato	NIT

- Después de 4 horas de incubación, registre los resultados de todos los sustratos que no requieren reactivos adicionales: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE y TRE. Compare BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU y MNP con el pocillo de control de nitrofenil (NPC). Cualquier tonalidad de amarillo debe registrarse como positivo.
- Añada 1 gota de reactivo de peptidasa a los pocillos LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY y BNAC.
 - Deje que el color se desarrolle durante 30 segundos, como mínimo, y luego registre los resultados. No espere más de 3 minutos después de añadir los reactivos para registrar los resultados. La presencia de cualquier tono de rosa o rojo debe interpretarse como positivo. El color de estos pocillos se oscurecerá con el tiempo, de modo que un color amarillo negativo puede tornarse un naranja más oscuro, pero aun así debe interpretarse como una reacción negativa. Las reacciones deben interpretarse como positivas **solamente** si existe un tono rosa o rojo. Algunos pocillos pueden tener un color naranja más oscuro en comparación con el pocillo de control (BNAC), pero aun así deben registrarse como negativos.
 - Tras la adición del reactivo de peptidasa al pocillo de control β-naftilamida (BNAC), el pocillo debe tener un color amarillo. Si hay un color rosa o rojo presente, se debe descartar el reactivo de peptidasa para evitar interpretaciones de falsos positivos.
- Se proporcionan dos pocillos de control para ayudar a interpretar las reacciones.
 - BNAC = control de β-naftilamida. Tras la adición del reactivo de peptidasa, este pocillo deberá ser de color amarillo a naranja.
 - NPC = control de nitrofenil. Este pocillo debe ser incoloro.
- Añada una gota de xileno al pocillo Indol (IND). Con el aplicador de madera, mezcle el contenido del pocillo IND. Añada 1 gota del reactivo de Ehrlich. Léalo tras 2-3 minutos.
- Añada 1 gota de ácido sulfanílico al pocillo de nitrato (NIT) por 1 gota de N, N-dimetil-alfa-naftilamina. Léalo tras 2-3 minutos.
- Añada 2 a 3 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % al pocillo BGAL. Espere entre 2 y 5 minutos antes de registrar el resultado. La formación de burbujas grandes indica una reacción positiva.

RESULTADOS

1. Gráfico de interpretación bioquímica

Sustrato	Reactivos	Positivo	Negativo
BGAL	Realice la comparación con el pocillo de control de nitrofenil (NPC).	Cualquier tonalidad de amarillo	Claro
AGAL			
BPO ₄			
NGLU			
AGL			
BGL			
PO ₄ ¹			
AFU			
MNP			

Sustrato	Reactivos	Positivo	Negativo
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY IDX	Añada 1 gota de reactivo de peptidasa. Permita que las reacciones de color se desarrollen durante al menos 30 segundos, pero no más de 3 minutos. El pocillo de control β -naftilamida (BNAC) debe ser amarillo.	Cualquier tono de rosa a magenta	De amarillo a naranja
TRE		Color azul/precipitado azul	Claro
URE		Amarillo	Naranja/rojo
IND		Rosa-Rojo	Amarillo-naranja
IND	Añada 1 gota de xileno, mezcle y añada 1 gota de reactivo de Ehrlich. Léalo tras 2-3 minutos.	Rosa	Amarillo/transparente
NIT	Añada 1 gota de ácido sulfanílico al 0,8 % y de N, N-dimetil-alfa-naftilamina al 0,5 %. Léalo tras 2-3 minutos.	Rojo	De transparente a rosa claro
Catalasa	Añada 2 a 3 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % a BGAL. Espere entre 2 y 3 minutos que se formen burbujas.	Burbujas grandes	Sin burbujas (o burbujas diminutas/misma cantidad en todos los pocillos).

1. Una reacción negativa de PO₄ puede ser de color transparente a ligeramente amarillo.

2. Principios de las reacciones de identificación

Sustratos de nitrofenil (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): Los sustratos orto o para-nitrofenil son incoloros. Si está presente la enzima correspondiente, el sustrato se rompe y libera el o-nitrofenil o p-nitrofenil libre, que es de color amarillo.

Sustratos de aminoácido β -naftilamida (LEU, MET, LYB, LYA, GGly, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): Cuando se hidrolizan los sustratos mediante la enzima correspondiente (por lo general, un aminoácido arilamidasa), se libera β -naftilamida. La β -naftilamina se detecta mediante la adición de p-dimetilaminocinamaldehído (en el reactivo de peptidasa), la cual crea un complejo de color rosa o morado.

NOTA: La enzima que rompe una aminoácido- β -naftilamida es una aminoácido-arilamidasa. El término "aminopeptidasa" se emplea frecuentemente como sinónimo de arilamidasa, pero realmente representa una enzima con una especificidad distinta (una aminopeptidasa rompe el aminoácido N-terminal de un péptido). Una arilamidasa y una aminopeptidasa pueden hidrolizar el mismo sustrato de aminoácido- β -naftilamida. Por tanto, el panel no mide necesariamente enzimas diferentes y únicas. Una única arilamidasa puede hidrolizar varias aminoácido- β -naftilamidas.

Indoxil fosfato (IDX): el indoxil fosfato se rompe mediante una fosfatasa para liberar indoxil. El indoxil se combina con el oxígeno para formar el azul índigo, que es un precipitado insoluble azul o verde.

Trehalosa (TRE): El uso de Trehalosa da lugar a la formación de ácido con una caída subsiguiente de pH, que se detecta mediante el cambio del indicador rojo de fenol de naranja a amarillo.

Urea (URE): la urea se descompone mediante ureasa para formar amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco (en forma de carbonato de amonio) provoca un aumento del pH que se detecta cuando el indicador rojo de fenol cambia de amarillo a rosa.

Indol (IND): El metabolismo de triptofano provoca la formación de indol. El xileno extrae el indol del caldo y lo concentra. El reactivo de Ehrlich reacciona ante el indol para formar un color rosado.

Nitrato (NIT): la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato a nitrito se detecta mediante la adición de ácido sulfanílico y, a continuación, N, N-dimetil-alfa-naftilamina, que produce un color rojo en presencia de nitritos.

La **catalasa** rompe el peróxido de hidrógeno en agua y gas de oxígeno, que se libera en la forma de burbujas.

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

El libro de códigos rápido de los biotipos de anaerobios MicroScan se utiliza para identificar los microorganismos de análisis desconocidos. Este libro de códigos se ha generado a partir de la base de datos de Beckman Coulter para los análisis incluidos en el panel de identificación.

El libro de códigos de los anaerobios rápidos de MicroScan se basa en un análisis por ordenador de las 24 pruebas en el panel rápido de identificación de anaerobios. Los resultados de las pruebas se transforman en un número de biotipo de 8 dígitos para el que el libro de códigos contiene una identificación de la especie y una probabilidad relativa acumulativa de identificación. Todas las identificaciones posibles se imprimen en orden de mayor a menor probabilidad, hasta un acumulado del 99,9 %. Si se produce un número de biotipo que no se puede localizar en el libro de códigos, debe sospecharse primero un error en el procedimiento. Por lo general, el número de biotipo se ha añadido de manera incorrecta o se ha registrado equivocadamente una reacción. Si el número de biotipo es correcto, se debe comprobar la posibilidad de cultivo mezclado y el microorganismo se debe volver a analizar, poniendo énfasis en el uso de una suspensión celular lo suficientemente turbia. Si al repetir el análisis se obtienen los mismos resultados, consulte el servicio de búsqueda de biotipos en el sitio web de Beckman Coulter o consulte con el distribuidor local.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los microorganismos en los que se realizarán las pruebas deben cultivarse en medios no selectivos, como TSA, Brucella, infusión de corazón cerebro o agar de Columbia, todos con sangre de oveja al 5 %. No deben utilizarse medios selectivos que contienen antibióticos; es decir, LKV (kanamicina/vancomicina), agar de *Bacteroides* Bile Esculin (BBE), alcohol feniletil (PEA), etc.
- La turbidez de la suspensión de organismos debe ser igual a, como mínimo, un estándar McFarland 3, pero no superior a un estándar McFarland 5. Si la suspensión del organismo sobre la que se realizarán las pruebas es menos turbia que un estándar McFarland 3, es posible que se presenten reacciones débiles o negativas falsas.
- El panel de identificación rápida de anaerobios está diseñado para identificar solamente bacterias anaeróbicas. Antes de las pruebas se deben realizar pruebas en cada organismo en relación con la aerotolerancia, pureza, reacción de cepas Gram y morfología de colonias. Si se enumera más de una identificación de especies para un número de biotipo particular, puede que sean necesarias pruebas complementarias para la identificación correcta.
- No todas las especies anaeróbicas encontradas en situaciones clínicas se incluyen en la base de datos de anaerobios rápidos. Las especies identificadas en el panel rápido de anaerobios se mencionan en el libro de códigos de biotipos de anaerobios rápidos. Las identificaciones anaeróbicas deben correlacionarse con las cepas Gram y otras pruebas de diagnóstico de apoyo. El usuario debe consultar la bibliografía de referencia actual para estas pruebas y también para la nomenclatura bacteriana.
- El panel de identificación rápida de anaerobios de MicroScan no ha sido aprobado por la FDA para su uso con los sistemas de instrumentos de MicroScan. Este panel debe leerse manualmente.

CONTROL DE CALIDAD

La validez de los medios de identificación rápida de anaerobios de MicroScan se debe comprobar analizando los microorganismos con reacciones conocidas. Las reacciones negativas pueden lograrse mediante la rehidratación de un panel con 50 µL de agua desionizada esterilizada en autoclave. Todos los sustratos deben ser negativos, según se describe en el gráfico de interpretación. Se debe comprobar la pureza del cultivo mediante un subcultivo de la suspensión utilizada como inóculo en medios de agar adecuados. Los resultados de las pruebas no son válidos si se detecta un cultivo mezclado (vea la Tabla 2).*

Tabla 2
Gráfico de control de calidad

Sustratos	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+

*Los resultados de cada reacción para los microorganismos de control recomendados por la ATCC (American Type Culture Collection) se muestran en el gráfico de control de calidad.

Tabla 2
Gráfico de control de calidad

Sustratos	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
CATALASA	–	–	+	–

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.
2. Para alcanzar resultados óptimos, el cultivo de *C. perfringens* debe tener solo 24 horas.

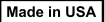
CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

En ensayos clínicos que usan organismos anaeróbicos que representan un conjunto diverso de aislamientos clínicos recientes, el panel de identificación rápida de anaerobios identificó correctamente el 92 % de los aislamientos.

Lista de símbolos

Lista de símbolos			
Símbolo	Título del símbolo	Descripción del estándar	Estándar
	No reutilizar	Indica que un dispositivo médico está destinado a un solo uso o a utilizarse en un solo paciente durante un único procedimiento.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Fecha de caducidad	Indica la fecha tras la cual no se debe utilizar el dispositivo médico.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Código de lote	Indica el código de lote del fabricante para identificar el lote.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Número de catálogo	Indica el número de catálogo del fabricante para que pueda identificarse el dispositivo médico.	ISO 15223-1, cláusula 5.1.6
	Fabricante	Indica el fabricante del dispositivo médico según se define en las directivas 90/385/CEE, 93/42/CEE y 98/79/CE de la UE.	ISO 15223-1, cláusula 5.1.1
	Fecha de fabricación	Indica la fecha de fabricación del dispositivo médico.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Representante autorizado en la Comunidad Europea	Indica el representante autorizado en la Unión Europea.	ISO 15223-1, cláusula 5.1.2
	Contenido suficiente para <n> pruebas	Indica el número total de pruebas de IVD que se pueden realizar con el IVD. (Habitualmente se incluye en los kits de reactivos).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Indica que se trata de un dispositivo médico que está destinado a utilizarse como dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, cláusula 5.5.1
	Límite de temperatura	Indica los límites de temperatura a los que puede exponerse de forma segura el dispositivo médico.	ISO 15223-1; 5.3.7

Lista de símbolos

Símbolo	Título del símbolo	Descripción del estándar	Estándar
	Consulte las Instrucciones de uso	Indica la necesidad de que el usuario consulte las instrucciones de uso.	ISO 15223-1; 5.4.3
	Marcado CE	Marca obligatoria europea de conformidad	NA
	Contenido	NA	NA
	Contenidos (envase)	Antimicrobiano (abreviatura)	NA
	Contenidos (envase)	Sustrato de identificación (abreviatura)	NA
	Hoja de datos de seguridad	Indica una hoja de datos de seguridad.	NA
	Made in USA	NA	NA
	Para uso de exportación solamente	NA	NA
	Volumen de reconstitución	NA	NA
	Frágil, manipular con precaución	Indica que se trata de un dispositivo médico que puede romperse o dañarse si no se manipula con cuidado.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Hacia arriba	Indica la correcta posición vertical	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices - Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements (ISO 15223-1: Productos sanitarios. Símbolos a utilizar en las etiquetas, el etiquetado y la información a suministrar. Parte 1: Requisitos generales).			

Beckman Coulter, el logotipo estilizado y las marcas de productos y servicios de Beckman Coulter aquí mencionadas son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Beckman Coulter, Inc. en Estados Unidos y otros países.

MicroScan

Manual de procedimentos para identificação rápida de anaeróbios

REF B1017-2

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O painel de identificação rápida de anaeróbios MicroScan foi concebido para a identificação rápida de bactérias anaeróbias isoladas a partir de espécimes clínicos de seres humanos.

SUMÁRIO E FUNDAMENTO

Utilizam-se testes cromogénicos convencionais e modificados para a identificação de bactérias anaeróbias.^{1,2,3,4,5,6,7} Produz-se uma suspensão McFarland 3 do organismo a ser testado em água desionizada autoclavada. O painel de identificação rápida de anaeróbios MicroScan, que consiste em 24 substratos desidratados, é reidratado e inoculado com a suspensão bacteriana e incubado aerobicamente durante 4 horas a 35–37 °C. Uma vez que o painel de identificação rápida de anaeróbios MicroScan deteta enzimas pré-formadas, não é necessário o crescimento organismo no painel. Após a incubação, interpretam-se as alterações no pH, a utilização de determinados substratos ou outras reações bioquímicas para a identificação.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Os painéis e reagentes de identificação rápida de anaeróbios MicroScan destinam-se apenas para fins de diagnóstico *in vitro*.
2. Não permitir que o reagente peptidase, reagente de Ehrlich, xileno ou qualquer um dos substratos de identificação entrem em contacto com os olhos, a pele ou o vestuário.
3. Respeitar as técnicas de assepsia e as precauções estabelecidas contra perigos microbiológicos durante todos os procedimentos, dando especial atenção ao facto de os painéis inoculados conterem organismos potencialmente patogénicos.
4. Todos os materiais devem ser autoclavados antes da sua eliminação.

ARMAZENAMENTO

Armazenar os painéis e os reagentes a 2–8 °C.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO GHS

Não classificado como perigoso

SDS A Ficha de dados de segurança está disponível em techdocs.beckmancoulter.com

COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Espécimes adequados, desprovidos de flora anaeróbia normal, devem ser colhidos, transportados e colocados em meios de isolamento primários em conformidade com os procedimentos recomendados no V.P.I., no *Anaerobe Laboratory Manual* (Manual de laboratório para anaeróbios),² no *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual* (Manual Wadsworth de bactérias anaeróbias),⁸ no *Laboratory Methods in Bacteriology*,⁹ (Métodos laboratoriais em microbiologia) do Centro de Controlo e Prevenção de Doenças e no *Manual of Clinical Microbiology* (Manual de microbiologia clínica).¹⁰

NOTA: as colónias de meios seletivos que contêm antibióticos, ou seja, LKV (canamicina/vancomicina) ou ágar *Bacteroides* Bile Esculin (BBE), álcool feniletílico (PEA), etc., não devem ser utilizadas para preparar inóculo para os painéis.

MATERIAIS FORNECIDOS

Painel de identificação rápida de anaeróbios (B1017-2)

20 formulários

Manual de procedimentos

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Óleo mineral (B1010-40)

Tabuleiro de cobertura (B1010-56B)

Reagente peptidase (B1012-30B)

N, N-dimetil-alfa-naftilamina a 0,5% (B1010-45A)

Ácido sulfanílico a 0,8% (B1010-44A)

Reagente de Ehrlich (B1015-6)

Xileno (B1015-5)

Pipeta de 50 µL com pontas esterilizadas

Peróxido de hidrogénio, 3%

Água de inóculo, 3 mL de água desionizada autoclavada (B1015-2)

Aplicadores esterilizados com ponta de algodão ou ansas de inoculação esterilizadas

Bastonetes aplicadores de madeira

Padrão de turvação McFarland 3, 4 e 5 de sulfato de bário

Vórtex

Incubadora, não-CO₂ (35 °C)

Organismos de controlo de qualidade:

C. perfringens ATCC 13124*

C. sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

PROCEDIMENTO

Preparação do painel

1. Remover os painéis da refrigeração. **Os painéis não devem ser utilizados se não houver dessecante, ou se o mesmo estiver quebrado, nem se a integridade da embalagem estiver comprometida (não selada, perfurada ou rasgada).**
2. Corte a bolsa para a abrir e retire o painel. Retire imediatamente o painel da bolsa de alumínio. Permita que os painéis atinjam a temperatura ambiente antes da reidratação. Os painéis podem ser empilhados com um tabuleiro de cobertura limpo colocado por cima dos mesmos.

Preparação do inóculo

1. Antes da inoculação dos painéis, os organismos a serem testados devem ser observados quanto à aerotolerância, pureza, reação à coloração de Gram e morfologia das colónias.
2. Utilizando um aplicador esterilizado de algodão ou uma ansa de inoculação, suspender colónias suficientes a partir de uma cultura de 24–48 horas em meios não seletivos, num tubo de amostra de 3 mL de água de inóculo (água desionizada autoclavada) para formar uma suspensão turbida equivalente a pelo menos um padrão McFarland 3, mas não superior a um padrão McFarland 5. Colocar no agitador vórtex para emulsionar, se necessário. Uma vez preparada a suspensão, o painel deve ser inoculado nos 15 minutos seguintes.**

Inoculação do painel

1. Retirar o painel da bolsa de folha de alumínio e colocar o rótulo com o número do espécime.
2. Adicionar 50 µL de suspensão bacteriana a cada poço contendo substratos, bem como aos dois poços de controlo (BNAC, NPC). Não é recomendável a utilização de uma pipeta Pasteur para inoculação.
3. Após um painel ter sido inoculado com 50 µL de inóculo, bata suavemente em cada lado do painel para ajudar a garantir a mistura com o substrato.

Sobreposição bioquímica com óleo

Colocar 2–3 gotas de óleo mineral sobre os poços de ureia (URE) e indol (IND).

Incubação

1. Empilhar os painéis em grupos de 3 a 5, com um painel de cobertura sobre o painel superior para evitar evaporação.
2. Incube os painéis inoculados durante 4 horas, a 35–37 °C, numa incubadora sem CO₂.

Leitura dos painéis

1. Retirar o reagente peptidase do frigorífico pelo menos 30 minutos antes de realizar a leitura dos painéis. O reagente peptidase pode precipitar a 4 °C, mas voltará a dissolver-se à temperatura ambiente. Não expor o reagente peptidase a temperaturas elevadas para agilizar a redissolução do precipitado cristalino, uma vez que as temperaturas elevadas causam a degradação do reagente.
2. Os painéis devem ser lidos utilizando luz refletida de um fundo branco.

Tabela 1, Substratos

Substratos	Abrev.	Substratos	Abrev.
p-nitrofenilo-β-D-galactopiranosídeo	BGAL	L-lisina-β-naftilamida (ácida)	LYA
p-nitrofenilo-α-D-galactopiranosídeo	AGAL	Glicilglicina-β-naftilamida	GGLY

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** Os meios não seletivos incluem TSA, Brucella, infusão de cérebro e coração ou ágar Columbia, todos com 5% de sangue de ovelha.

Substratos	Abrev.	Substratos	Abrev.
bis-p-nitrofenilfosfato	BPO ₄	Glicina-β-naftilamida	GLY
p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida	NGLU	L-prolina-β-naftilamida	PRO
p-nitrofenilo-α-D-glucopiranosido	AGL	L-arginina-β-naftilamida	ARG
o-nitrofenil-β-D-glucopiranosido	BGL	L-pirrolidonil-β-naftilamida	PYR
p-nitrofenilfosfato	PO ₄	L-triptofano-β-naftilamida	TRY
p-nitrofenilo-α-L-fucopiranosido	AFU	3-fosfato de indoxil	IDX
p-nitrofenilo-α-D-manopiranosido	MNP	Trealose	TRE
L-leucina-β-naftilamida	LEU	Ureia	URE
DL-metionina-β-naftilamida	MET	Indol	IND
L-lisina-β-naftilamida (alcalina)	LYB	Nitrato	NIT

- Após 4 horas de incubação, registar os resultados para todos os substratos que não exijam reagentes adicionais: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE e TRE. Comparar BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU e MNP com o poço de controlo de nitrofenilo (NPC). Qualquer tonalidade de amarelo deve ser registada como positiva.
- Adicionar 1 gota de reagente peptidase aos poços LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY e BNAC.
 - Permitir o desenvolvimento de cor durante pelo menos 30 segundos e, em seguida, registar os resultados. Não aguardar mais de 3 minutos após a adição dos reagentes antes de registar os resultados. A presença de qualquer tonalidade de rosa ou vermelho deve ser interpretada como um resultado positivo. A cor nestes poços irá escurecer com o tempo, pelo que uma cor amarela negativa pode tornar-se uma cor laranja mais escura, mas tal deve na mesma interpretar-se como sendo uma reação negativa. As reações devem ser registadas como positivas **apenas** se houver rosa ou vermelho presentes. Alguns poços poderão apresentar um laranja mais escuro do que o poço de controlo (BNAC), mas devem na mesma ser registados como negativos.
 - Após a adição do reagente peptidase ao poço de controlo de β-naftilamida (BNAC), o poço deve apresentar uma cor amarela. Caso se verifique qualquer coloração rosa ou vermelha, o reagente peptidase deve ser eliminado para prevenir interpretações de falsos positivos.
- São fornecidos dois poços de controlo para auxiliar na interpretação de reações.
 - BNAC = controlo de β-naftilamida. Após a adição do reagente peptidase, este poço deve apresentar uma cor amarela a laranja.
 - NPC = controlo de nitrofenilo. Este poço deve apresentar-se incolor.
- Adicionar uma gota de xileno ao poço de indol (IND). Com o bastonete aplicador de madeira, misturar o conteúdo do poço IND. Adicionar 1 gota de reagente de Ehrlich. Ler os resultados passados 2–3 minutos.
- Adicionar 1 gota de ácido sulfanílico ao poço de nitrato (NIT), seguida de 1 gota de N, N-dimetil-alfa-naftilamina. Ler os resultados passados 2–3 minutos.
- Adicionar 2–3 gotas de peróxido de hidrogénio a 3% ao poço BGAL. Aguardar 2–5 minutos antes de registar o resultado. Uma reação positiva é indicada pela formação de bolhas grandes.

RESULTADOS

1. Tabela de interpretação bioquímica

Substrato	Reagentes	Positivo	Negativo
BGAL AGAL BPO ₄ NGLU AGL BGL PO ₄ ¹ AFU MNP	Comparar com o poço de controlo de nitrofenilo (NPC)	Qualquer tonalidade de amarelo	Claro
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	Adicionar 1 gota de reagente peptidase. Permitir o desenvolvimento de reações de cor durante, pelo menos, 30 segundos, mas não mais do que 3 minutos. O poço de controlo β-naftilamida (BNAC) deve ser amarelo.	Qualquer tonalidade de rosa a magenta	Amarelo a laranja

Substrato	Reagentes	Positivo	Negativo
IDX		Cor azul/precipitado azul	Claro
TRE		Amarelo	Laranja/vermelho
URE		Rosa a vermelho	Amarelo a laranja
IND	Adicionar 1 gota de xileno, misturar, adicionar 1 gota de reagente de Ehrlich. Ler os resultados passados 2–3 minutos.	Cor-de-rosa	Amarelo/transparente
NIT	Adicionar 1 gota de ácido sulfanílico a 0,8% e de N, N-dimetil-alfa-naftilamina a 0,5%. Ler os resultados passados 2–3 minutos.	Vermelho	Transparente a rosa pálido
Catalase	Adicionar 2–3 gotas de peróxido de hidrogénio a 3% ao BGAL. Aguardar 2–3 minutos pela formação de bolhas.	Bolhas grandes	Sem bolhas (ou algumas bolhas minúsculas/mesma quantidade em todos os poços.)

1. Uma reação negativa de PO₄ pode ter um resultado transparente a amarelo muito claro.

2. Princípios das reações de identificação

Substratos de nitrofenilo (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): os substratos orto ou para-nitrofenilo são incolores. Se estiver presente a enzima adequada, o substrato é clivado, libertando o o- ou p-nitrofenilo, que é amarelo.

Substratos de aminoácidos β-naftilamida (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): quando os substratos são hidrolisados pela enzima apropriada (normalmente um aminoácido arilamidase), é libertada β-naftilamida. A β-naftilamina é detetada através da adição de p-dimetilaminocinamaldeído (no reagente peptidase), que cria um complexo de cor rosa a roxo.

NOTA: a enzima responsável pela clivagem do aminoácido β-naftilamida é um aminoácido arilamidase. O termo «aminopeptidase» é frequentemente utilizado como um sinónimo de arilamidase, mas, na verdade, representa uma enzima com uma especificidade diferente (uma aminopeptidase efetua a clivagem do aminoácido N-terminal de um peptídeo). Uma arilamidase e uma aminopeptidase podem hidrolisar o mesmo substrato de aminoácido β-naftilamida. Assim, o painel não mede necessariamente enzimas únicas e diferentes. Uma única arilamidase poderá hidrolisar várias β-naftilamidas de aminoácidos.

Fosfato de indoxil (IDX): o fosfato de indoxil é clivado por uma fosfatase, libertando indoxil. O indoxil combina-se com o oxigénio para formar anil, um precipitado insolúvel azul ou azul-esverdeado.

Trealose (TRE): a utilização de trealose resulta na formação de ácido, com uma queda subsequente no pH que é detetada pela mudança do indicador vermelho de fenol, de laranja para amarelo.

Ureia (URE): a ureia é dividida pela urease para formar amónia e dióxido de carbono. A amónia (na forma de carbonato de amónia) provoca um aumento do pH, o qual é detetado pela alteração do indicador vermelho de fenol de amarelo para rosa.

Indol (IND): o metabolismo do triptofano resulta na formação de indol. O xileno extrai o indol do meio líquido e concentra-o. O reagente de Ehrlich reage com o indol para formar uma coloração rosa.

Nitrato (NIT): a capacidade de um organismo em reduzir o nitrato a nitrito é detetada pela adição de ácido sulfanílico, seguido de N, N-dimetil-alfa-naftilamina, que produz uma cor vermelha na presença de nitrito.

A **Catalase** decompõe o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio gasoso, que é libertado sob a forma de bolhas.

IDENTIFICAÇÃO DO ORGANISMO

O Livro de códigos de biótipos para identificação rápida de anaeróbios MicroScan é utilizado para a identificação de organismos de teste desconhecidos. Este livro de códigos foi criado a partir da base de dados da Beckman Coulter relativa aos testes incluídos no painel de identificação.

O Livro de códigos de identificação rápida de anaeróbios MicroScan foi baseado numa análise computadorizada de 24 testes incluídos no painel de identificação rápida de anaeróbios. Os resultados do teste são transformados num «número de biótipo» com 8 algarismos, para o qual o livro de códigos lista uma identificação de espécie e uma probabilidade relativa cumulativa de identificação. Todas as identificações possíveis são impressas por ordem descendente da probabilidade mais elevada, até um valor cumulativo de 99,9%. Caso haja um número de biótipo que não se consiga encontrar no livro de códigos, deve suspeitar-se de um erro de procedimento. Geralmente, o número de biótipo terá sido adicionado de forma incorreta, ou uma reação terá sido registada erradamente. Caso o número de biótipo esteja correto, dever-se-á, então, verificar a possibilidade

de uma cultura mista, devendo testar-se novamente o organismo, com especial ênfase na utilização de uma suspensão de células suficientemente túrbida. Se, após a repetição dos testes, obtiver os mesmos resultados, consulte o Biotype Lookup Servic (Serviço de procura de biótipos) no site da Beckman Coulter ou consulte o seu distribuidor local.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Os organismos a ser testados devem ser cultivados em meios não seletivos, como por exemplo TSA, Brucella, infusão de cérebro e coração ou ágar Columbia, todos com 5% de sangue de ovelha. Os meios seletivos que contêm antibióticos, ou seja, LKV (canamicina/vancomicina) ou ágar *Bacteroides* Bile Esculin (BBE), álcool feniletílico (PEA), etc., não devem ser utilizados.
- A turvação da suspensão de organismos terá de ser igual a pelo menos um padrão McFarland 3, mas não superior ao padrão McFarland 5. Se a suspensão do organismo a ser testado for menos túrbida do que um padrão McFarland 3, podem ocorrer reações fracas ou de falsos negativos.
- O painel de identificação rápida de anaeróbios foi concebido para identificar apenas bactérias anaeróbias. Antes da realização do teste, cada organismo deve ser testado quanto à aerotolerância, pureza, reação à coloração de Gram e morfologia das colónias. Se a um determinado número de biótipo corresponder mais do que uma identificação de espécie, poderão ser necessários testes suplementares para determinar a identificação correta.
- Nem todas as espécies anaeróbias encontradas em situações clínicas estão incluídas na base de dados de anaeróbios. As espécies identificadas no painel de identificação rápida de anaeróbios encontram-se enumeradas no livro de códigos de biótipos de identificação rápida de anaeróbios. As identificações de anaeróbios devem ser correlacionadas com as colorações de Gram e outros testes de diagnóstico de suporte. O utilizador deve consultar a literatura de referência atual para estes testes e também para a nomenclatura bacteriana atual.
- O painel de identificação rápida de anaeróbios MicroScan não foi autorizado pela FDA para ser utilizado com os sistemas de instrumentos MicroScan. Este painel terá de ser lido manualmente.

CONTROLO DE QUALIDADE

A aceitabilidade dos meios de identificação rápida de anaeróbios MicroScan deve ser verificada através do teste com organismos com reações conhecidas. Podem conseguir-se reações negativas reidratando um painel com 50 µL de água desionizada autoclavada. Todos os substratos devem ser negativos, conforme descrito na tabela de interpretação. A pureza da cultura deve ser verificada através de subculturas a partir da suspensão utilizada como inóculo em meio de ágar adequado. Os resultados do teste serão inválidos caso seja detetada uma cultura mista (consultar a Tabela 2).*

Tabela 2

Gráfico de controlo de qualidade

Substratos	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–

*Os resultados correspondentes a cada reação relativa aos organismos de controlo recomendados pela American Type Culture Collection (Coleção de cultura dos Estados Unidos) (ATCC) são enumerados na Tabela de Controlo de Qualidade.

Tabela 2
Gráfico de controlo de qualidade

Substratos	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
NIT ²	V	–	–	–
CATALASE	–	–	+	–

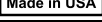
1. American Type Culture Collection, Manassas, VA EUA.
2. Para resultados ideais, a cultura de *C. perfringens* deve ter apenas 24 horas.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Em ensaios clínicos que utilizaram organismos anaeróbios representando um conjunto diverso de isolados clínicos recentes, o painel de Identificação rápida de organismos anaeróbios identificou corretamente 92% dos isolados.

Legenda dos símbolos

Legenda dos símbolos			
Símbolo	Designação do símbolo	Descrição do padrão	Padrão
	Não reutilizar	Indica um dispositivo médico que se destina a ser utilizado uma vez ou num único paciente durante um procedimento único.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Data de validade	Indica a data após a qual o dispositivo médico não deve ser usado.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Código de lote	Indica o código de lote do fabricante pelo qual o lote pode ser identificado.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Número do catálogo	Indica o número de catálogo do fabricante para que o dispositivo médico possa ser identificado.	ISO 15223-1, cláusula 5.1.6
	Fabricante	Indica o fabricante do dispositivo médico, conforme definido nas Diretivas da UE 90/385/CEE, 93/42/CEE e 98/79/CE.	ISO 15223-1, cláusula 5.1.1
	Data de fabrico	Indica a data em que o dispositivo médico foi fabricado.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Representante autorizado na Comunidade Europeia	Indica o representante autorizado na Comunidade Europeia.	ISO 15223-1, cláusula 5.1.2
	Contém o suficiente para <n> testes	Indica o número total de testes de IVD que podem ser realizados com o IVD. (Normalmente incluído nos kits de reagentes).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Indica um dispositivo médico destinado a ser utilizado como um dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, cláusula 5.5.1
	Limites de temperatura	Indica os limites de temperatura aos quais o dispositivo médico pode ser exposto com segurança.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Consulte as Instructions for Use (Instruções de utilização)	Indica a necessidade de o utilizador consultar as instruções de utilização.	ISO 15223-1; 5.4.3
	Marcação CE	Marca regulatória de conformidade europeia	n/d
	Índice	n/d	n/d

Legenda dos símbolos			
Símbolo	Designação do símbolo	Descrição do padrão	Padrão
	Conteúdo (embalagem)	Agente antimicrobiano (abreviatura)	n/d
	Conteúdo (embalagem)	Substrato de identificação (abreviatura)	n/d
	Ficha de dados de segurança	Indica uma ficha de dados de segurança.	n/d
	Made in USA	n/d	n/d
	Apenas para fins de exportação	n/d	n/d
	Volume de reconstituição	n/d	n/d
	Frágil, manusear com cuidado	Indica um dispositivo médico que pode partir-se ou danificar-se se não for manuseado com cuidado.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Este lado para cima	Indica a posição vertical correta	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices — Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements (ISO 15223-1: Dispositivos médicos — Símbolos a utilizar em etiquetas de dispositivos médicos, rotulagem e informações a serem fornecidas. Parte 1: Requisitos gerais).			

Beckman Coulter, o logótipo estilizado e as marcas de produtos e serviços supramencionados da Beckman Coulter são marcas comerciais ou marcas comerciais registadas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e outros países.



MicroScan

Prosedyrehandbok for hurtig anaerob ID

REF B1017-2

ANVENDELSESOMRÅDE

MicroScan hurtige anaerobe identifikasjonspanel er designet for hurtig identifikasjon av anaerobe bakterier isolert fra humane kliniske prøver.

SAMMENDRAG OG PRINSIPP

Modifiserte konvensjonelle og kromogene tester benyttes for å identifisere anaerobe bakterier.^{1,2,3,4,5,6,6,7} En McFarland 3-suspensjon av organismen som skal testes, er laget i autoklavert, avionisert vann. MicroScan hurtige anaerobe identifikasjonspanel, bestående av 24 dehydrerte substrater, rehydreres og inokuleres med den bakterielle suspensjonen og inkuberes aerobisk i 4 timer ved 35–37 °C. Fordi MicroScan hurtige anaerobe identifikasjonspanel detekterer preformede enzymer, er ikke vekst av organismen i panelet nødvendig. Etter inkubasjon tolkes endringer i pH og anvendelse av visse substrater eller andre biokjemiske reaksjoner for identifikasjon.

ADVARSEL OG FORHOLDSREGLER

1. MicroScan hurtige anaerobe identifikasjonspaneler og reagenser er kun for *in vitro*-diagnostisk bruk.
2. Ikke la peptidasereagens, Ehrlichs reagens, xylen eller noen av identifikasjonssubstratene komme i kontakt med øyne, hud eller klær.
3. Overhold aseptiske teknikker og etablerte forholdsregler mot mikrobiologiske farer ved bruk av alle prosedyrer, med spesiell oppmerksomhet på at de inokulerte panelene inneholder potensielt patogene organismer.
4. Alle materialer skal autoklaveres før avhending.

OPPBEVARING

Oppbevar paneler og reagenser ved 2–8 °C.

GHS-FAREKLASSIFISERING

Ikke klassifisert som farlig



Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på techdocs.beckmancoulter.com

PRØVEINNSAMLING OG KLARGJØRING

Hensiktsmessige prøver, uten normale anaerobe flora, bør samles, transporteres og plasseres på primærisolasjonsmedier i samsvar med anbefalte prosedyrer i V.P.I., *Anaerobe Laboratory Manual* (Anaerob laboratoriehåndbok),² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual* (Wadsworths anaerobe bakterielle håndbok),⁸ *C.D.C.s Laboratory Methods in Bacteriology* (Laboratoriemetoder innen bakteriologi),⁹ og *Manual of Clinical Microbiology* (Håndbok i klinisk mikrobiologi).¹⁰

MERK: Kolonier fra selektive medier som inneholder antibiotika, dvs. LKV (kanamycin/vancomycin), eller *Bacteroides* Bile Esculin (BBE)-agar, fenyletylalkohol (PEA) osv., bør ikke brukes til tilberedning av inokulum for paneler.

MEDFØLGENDE MATERIALER

Hurtig anaerob identifikasjonspanel (B1017-2)

20 regneark

Prosedyrehandbok

PÅKREVDE MATERIALER SOM IKKE MEDFØLGER

Mineralolje (B1010-40)

Dekkebrett (B1010-56B)

Peptidasereagens (B1012-30B)

0,5 % N, N-dimetyl-alfa-naftylamin (B1010-45A)

0,8 % sulfanilsyre (B1010-44A)

Ehrlichs reagens (B1015-6)

Xylen (B1015-5)

50 µL pipette med sterile spisser

Hydrogenperoksid, 3 %

Inokulumvann, 3 mL autoklavert avionisert vann (B1015-2)

Sterile applikatorer med bomullsspiss eller sterile inokuleringsløgger

Påføringspinner i tre

3, 4 og 5 McFarland bariumsulfat-turbiditetsstandard

Vortexblander

Inkubator, ikke-CO₂ (35 °C)

Kvalitetskontrollorganismer:

C. perfringens ATCC 13124*

C. sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

PROSEDYRE

Klargjøring av panel

1. Ta paneler ut fra kjøling. **Paneler skal ikke brukes hvis tørkemiddelet ikke er til stede eller er ødelagt, eller hvis pakken er uforseglet, punktert eller revet i stykker.**
2. Klipp opp posen, og ta ut panelet. Ta panelet straks ut av folieposen. La panelene nå romtemperatur før rehydrering. Panelene kan stables med et rent dekselbrett øverst.

Klargjøring av inokulum

1. Før panelene inokuleres, skal organismer som skal testes, observeres for aerotoleranse, renhet, gramflekkeaksjon og kolonimorfologi.
2. Ved hjelp av en steril bomullsapplikator eller inokuleringsløkke suspenderes nok kolonier fra en 24–48 timers kultur på ikke-selektive medier i et prøverør med 3 mL inokulumvann (autoklavert, avionisert vann) for å opprette en turbid suspensjon tilsvarende minst en McFarland 3-standard, men ikke mer enn en McFarland 5-standard. Vorteks for å emulgere om nødvendig. Når først suspensjonen er klargjort, bør panelet inokuleres innen 15 minutter.**

Panelinokulering

1. Ta ut panelet fra folieposen og merk det med prøvenummeret.
2. Tilsett 50 µL bakteriell suspensjon til hver brønn som inneholder substrat, pluss de to kontrollbrønnene (BNAC og NPC). Bruk av en pasteurpipette for inokulering anbefales ikke.
3. Når panelet er inokulert med 50 µL inokulum, slå lett på hver side av panelet for å bidra til å sikre blanding med substratet.

Biokjemiske oljeoverlegg

Legg 2–3 dråper mineralolje over urea (URE)- og indol (IND)-brønnene.

Inkubasjon

1. Stable paneler i grupper på 3 til 5 med dekkebrett over topppanelet for å unngå fordampning.
2. Inkuber de inokulerte panelene i 4 timer ved 35–37 °C i en inkubator uten CO₂.

Lese panelene

1. Ta ut peptidasereagenset fra kjøleskapet minst 30 minutter før panelene leses av. Peptidasereagenset kan bunnfelles ved 4 °C, men det vil oppløses på nytt ved romtemperatur. Ikke utsett peptidasereagenset for høye temperaturer for å akselerere gjenoppløsning av det krystallinske presipitatet, da høy temperatur vil føre til at reagenset svekkes.
2. Les av panelene med reflektert lys fra en hvit bakgrunn.

Tabell 1, Substrater

Substrater	Fork.	Substrater	Fork.
p-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid	BGAL	L-lysin-β-naftylamid (syre)	LYA
p-nitrofenyl-α-D-galaktopyranosid	AGAL	Glysyglysin-β-naftylamid	GGLY
bis-p-nitrofenyl-fosfat	BPO ₄	Glysin-β-naftylamid	GLY
p-nitrofenyl-N-acetyl-β-D-glukosaminid	NGLU	L-prolin-β-naftylamid	PRO
p-nitrofenyl-α-D-glukopyranosid	AGL	L-arginin-β-naftylamid	ARG
o-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid	BGL	L-pyrrolidonyl-β-naftylamid	PYR
p-nitrofenyl-fosfat	PO ₄	L-tryptofan-β-naftylamid	TRY
p-nitrofenyl-α-L-fucopyranosid	AFU	3-indoksyl-fosfat	IDX
p-nitrofenyl-α-D-mannopyranosid	MNP	Trehalose	TRE
L-leucin-β-naftylamid	LEU	Urea	URE
DL-metionin-β-naftylamid	MET	Indol	IND
L-lysin-β-naftylamid (alkalisk)	LYB	Nitrat	NIT

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** Ikke-selektive medier inkluderer TSA, Brucella, hjerne-hjerte-infusjon eller Columbia agar, alle med 5 % fåreblod.

3. Etter 4 timers inkubasjon registreres resultatene for alle substratene som ikke trenger ytterligere reagens: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE, og TRE. Sammenlign BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU og MNP med nitrofenyl-kontrollbrønnen (NPC). Enhver nyanse av gult skal registreres som positiv.
4. Tilsett 1 dråpe peptidasereagens til LEU-, MET-, LYB-, LYA-, GGLY-, GLY-, PRO-, ARG-, PYR-, TRY- og BNAC-brønner.
 - A. La fargen utvikles i minst 30 sekunder før resultatene registreres. Ikke vent lenger enn 3 minutter etter at reagensene er tilsatt, før resultatene registreres. En hvilken som helst nyanse av rosa eller rødt skal tolkes som positiv. Fargen på disse brønnene vil bli mørkere med tiden, slik at en negativ gulfarge kan bli en mørkere oransje. Dette bør likevel fortsatt tolkes som en negativ reaksjon. Reaksjoner skal registreres som positive **bare** hvis det finnes rosa eller rød farge. Noen brønner kan være mørkere oransje, sammenlignet med kontrollbrønnen (BNAC). Disse bør likevel registreres som negative.
 - B. Etter tilsetning av peptidasereagens til β -naftylamidkontroll-brønnen (BNAC), skal brønnen være gul. Hvis det er noen rosa eller rødfarge, bør peptidasereagenset kastes for å forhindre falskt positive tolkninger.
5. To kontrollbrønner leveres for å bistå i tolkning av reaksjonene.
 - A. BNAC = β -naftylamidkontroll. Etter tilsetning av peptidasereagens bør denne brønnen være gul til oransje i farge.
 - B. NPC = nitrofenylkontroll. Denne brønnen skal være klar.
6. Tilsett én dråpe xylen til indol (IND)-brønnen. Rør innholdet i IND-brønnen med påføringspinnen i tre. Tilsett 1 dråpe Ehrlichs reagens. Avles etter 2–3 minutter.
7. Tilsett 1 dråpe hver av sulfanilsyre til nitrat (NIT)-brønnen, etterfulgt av 1 dråpe N, N-dimetyl-alfa-naftylamin. Avles etter 2–3 minutter.
8. Tilsett 2–3 dråper 3 % hydrogenperoksid til BGAL-brønnen. Vent i 2–5 minutter før resultatet registreres. En positiv reaksjon indikeres av dannelsen av store bobler.

RESULTATER

1. Tabell for biokjemisk tolkning

Substrat	Reagenser	Positiv	Negativ
BGAL AGAL BPO ₄ NGLU AGL BGL PO ₄ ¹ AFU MNP	Sammenlign med nitrofenyl (NPC)-kontrollbrønnen	Enhver nyanse av gul	Klar
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	Tilsett 1 dråpe peptidasereagens. La fargereaksjon utvikles i minst 30 sekunder, men ikke lenger enn 3 minutter. β -naftylamid-kontrollbrønnen (BNAC) skal være gul.	Enhver nyanse av rosa til magenta	Gult til oransje
IDX		Blåfarge/blått presipitat	Klar
TRE		Gul	Oransje/rød
URE		Rosa-rød	Gul-oransje
IND	Tilsett 1 dråpe xylen, rør, tilsett 1 dråpe Ehrlichs reagens. Avles etter 2–3 minutter.	Rosa	Gul/klar
NIT	Tilsett 1 dråpe hver av 0,8 % suflanilsyre og 0,5 % N, N-dimetyl-alfa-naftylamin. Avles etter 2–3 minutter.	Rød	Fargeløs til svak rosa
Katalase	Tilsett 2–3 dråper 3 % hydrogenperoksid til BGAL. Vent i 2–3 min. på at bobler skal dannes.	Store bobler	Ingen bobler (eller få, små bobler/samme antall i alle brønner.)

1. En negativ PO₄-reaksjon kan være klar til svært lys gul.

2. Prinsipper for identifiseringsreaksjoner

Nitrofenylsubstrater (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): orto- eller paranitrofenylsubstrater er fargeløse. Hvis det egnede enzymet er til stede, spaltes substratet og frigir det frie o- eller p-nitrofenylet, som er gult.

Aminosyre β-naftylamidsubstrater (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): Når substratene hydrolyseres av det egnede enzymet (vanligvis en aminosyrearylamidase), frigis β-naftylamid. β-naftylamid detekteres ved tilsetning av p-dimetylaminocinnamaldehyd (i peptidasereagens) som skaper et kompleks som er rosa til lilla i farge.

MERK: Enzymet som spalter en aminosyre β-naftylamid, er en aminosyrearylamidase. Uttrykket «aminopeptidase» brukes hyppig som synonym for arylamidase, men representerer faktisk et enzym med forskjellig spesifisitet (en aminopeptidase spalter N-terminal-aminosyren fra et peptid). En arylamidase og en aminopeptidase kan hydrolysere det samme aminosyre β-naftylamidsubstratet. Dermed måler ikke panelet nødvendigvis forskjellige og unike enzymer. En enkelt arylamidase kan hydrolysere flere aminosyre-β-naftylamider.

Indoksylofosfatase (IDX): Indoksylofosfatase spaltes av en fosfatase for å frigi indoksylo. Indoksyloet kombineres med oksygen for å danne indigo blå, som er et uløselig blått eller blå-grønt presipitat.

Trehalose (TRE): Anvendelsen av trehalose resulterer i syredannelse med påfølgende reduksjon i pH, som detekteres av fenolrød-indikatoren som skifter farge fra oransje til gul.

Urea (URE): Urea splittes ved urease for å danne ammoniakk og karbondioksid. Ammoniakken (i form av ammoniakk-karbonat) fører til en stigning i pH, som detekteres av at fenolrød går fra gul til rosa.

Indol (IND): Omdanningen av tryptofan resulterer i dannelsen av indol. Xylen ekstraherer indol fra buljongen og konsentrerer det. Ehrlichs reagens reagerer med indolet for å danne en rosafarge.

Nitrat (NIT): En organismes evne til å redusere nitrat til nitritt påvises ved tilsetning av sulfanilsyre, deretter N, N-dimetyl-alfa-naftylamin, som produserer en rødfarge i nærvær av nitritt.

Catalase bryter ned hydrogenperoksid til vann og oksygen, som frigis som bobler.

IDENTIFISERING AV ORGANISME

MicroScan hurtig anaerob biotypekodebok brukes for å identifisere ukjente testorganismer. Denne kodeboken er generert fra Beckman Coulters database for testene som er inkludert på identifikasjonspanelet.

MicroScan hurtige anaerobe kodebok er basert på en dataanalyse av de 24 testene som er inkludert i det hurtige anaerobe identifikasjonspanelet. Testresultatene forvandles til et 8-sifret biotypenummer som kodeboken oppgir en artsidentifikasjon for og en kumulativ relativ sannsynlighet for identifikasjon. Alle mulige identifikasjoner skrives ut i synkende rekkefølge av høyest sannsynlighet til en kumulativ på 99,9 %. Dersom et biotypenummer oppstår som ikke finnes i kodeboken, bør man først mistenke en prosedyremessig feil. Vanligvis er biotypenummeret tilsatt feil eller en reaksjon er feilaktig registrert. Hvis biotypenummeret er riktig, bør muligheten sjekkes for blandet kultur og organismen bør testes på nytt, med spesiell vekt på bruk av en tilstrekkelig turbid cellesuspensjon. Hvis en ny test gir de samme resultatene, se Biotypesøketjeneste på Beckman Coulters nettside eller ta kontakt med din lokale distributør.

PROSEDYREBEGRENSNINGER

1. Organismer som skal testes, bør dyrkes på ikke-selektive medier som TSA, Brucella, hjerne-hjerte-infusjon eller Columbia-agar, alle med 5 % fåreblod. Selektive medier som inneholder antibiotika, dvs. LKV (kanamycin/vancomycin), *Bacteroider* Bile Esculin (BBE)-agar, fenyletylalkohol (PEA), osv., bør ikke brukes.
2. Turbiditeten til organismesuspensjonen må tilsvare minst en McFarland 3-standard, men ikke mer enn McFarland 5-standard. Hvis suspensjonen til organismen som skal testes, er mindre turbid enn en McFarland 3-standard, kan svake reaksjoner eller falskt negative reaksjoner forekomme.
3. Det hurtige anaerobe identifikasjonspanelet er designet for å identifisere bare anaerobe bakterier. Før testing skal hver organisme testes for aerotoleranse, renhet, gramflekke-reaksjon og kolonial morfologi. Hvis mer enn én artsidentifisering er oppgitt for et bestemt biotypenummer, kan flere tester være nødvendige for riktig identifikasjon.
4. Ikke alle anaerobe arter som møtes i kliniske situasjoner er inkludert i den hurtige anaerobe databasen. Artene som er identifisert på det hurtige anaerobe panelet, er oppgitt i den hurtige anaerobe biotypekodeboken. Anaerobe identifikasjoner bør korrelere med gramflekker og andre støttende diagnostiske tester. Brukeren skal se i gjeldende referanselitteratur for disse testene, i tillegg til gjeldende bakterielle nomenklatur.
5. MicroScan hurtige anaerobe identifikasjonspanel er ikke klarert av FDA til bruk med MicroScan-instrumentsystemer. Dette panelet må leses manuelt.

KVALITETSKONTROLL

Akseptabiliteten til MicroScan hurtige anaerobe identifikasjonsmedium skal kontrolleres ved å teste organismer med kjente reaksjoner. Negative reaksjoner kan oppnås ved å rehydrere et panel med 50 µL autoklavert, avionisert vann. Alle substrater bør være negative som beskrevet i fortolkningstabellen. Kulturrenhet skal sjekkes ved å subdyrke fra suspensjonen som brukes som inokulum på egnet agarmedium. Testresultater er ugyldige hvis en blandet kultur detekteres (se tabell 2).*

*Resultatene for hver reaksjon for de anbefalte kontrollorganismene fra ATCC, amerikansk typekultursamling er oppgitt i kvalitetskontrolltabellen.

Tabell 2
Kvalitetskontrolltabell

Substrater	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
CATALASE	–	–	+	–

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA.
2. For optimale resultater bør *C. perfringens*-kultur bare være 24 timer gammel.

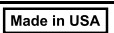
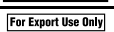
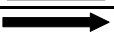
YTELSESKARAKTERISTIKA

I kliniske studier som benytter anaerobe organismer som representerer et variert sett med nylig kliniske isolater, identifiserte det hurtige anaerobe identifikasjonspanelet 92 % av isolatene riktig.

Symbolnøkkel

Symbolnøkkel			
Symbol	Symboltittel	Beskrivelse av standard	Standard
	Ikke til gjenbruk	Angir medisinsk utstyr som er beregnet for engangsbruk eller for bruk på én pasient under én prosedyre.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Utløpsdato	Angir den siste datoen det medisinske utstyret kan brukes.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Batchkode	Angir produsentens batchkode, slik at en batch eller en lot kan identifiseres.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Katalognummer	Angir produsentens katalognummer, slik at det medisinske utstyret kan identifiseres.	ISO 15223-1, del 5.1.6
	Produsent	Angir produsenten av det medisinske utstyret som definert i EU-direktivene 90/385/EØF, 93/42/EØF og 98/79/EF.	ISO 15223-1, del 5.1.1
	Produksjonsdato	Angir datoen da det medisinske utstyret ble produsert.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Autorisert representant i EU	Angir autorisert representant i EU.	ISO 15223-1, del 5.1.2

Symbolnøkkel

Symbol	Symboltittel	Beskrivelse av standard	Standard
	Inneholder nok til <n> analyser	Angir det totale antallet IVD-tester som kan utføres med IVD. (Normalt inkludert på reagenssettene.)	ISO 15223-1; 5.5.5
	<i>In vitro</i> -diagnostisk medisinsk utstyr	Angir medisinsk utstyr som er beregnet for bruk som <i>in vitro</i> -diagnostisk medisinsk utstyr.	ISO 15223-1, del 5.5.1
	Temperaturbegrensning	Angir temperaturgrensene det medisinske utstyret trygt kan utsettes for.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Se bruksanvisning	Angir at brukeren må sjekke bruksanvisningen.	ISO 15223-1; 5.4.3
	CE-merke	Europeisk merke for samsvar	Ikke relevant
	Innhold	Ikke relevant	Ikke relevant
	Innhold (pakke)	Antimikrobielt middel (forkortelse)	Ikke relevant
	Innhold (pakke)	Identifiseringssubstrat (forkortelse)	Ikke relevant
	Sikkerhetsdatablad	Angir et sikkerhetsdatablad.	Ikke relevant
	Made in USA	Ikke relevant	Ikke relevant
	Kun til eksportbruk	Ikke relevant	Ikke relevant
	Rekonstitueringsvolum	Ikke relevant	Ikke relevant
	Ømtålig, behandles med varsomhet	Angir medisinsk utstyr som kan bli ødelagt eller skadet hvis det ikke håndteres forsiktig.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Denne siden opp	Angir riktig stående stilling	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical devices - Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied. Part 1: General Requirements. (ISO 15223-1: Medisinsk utstyr – Symboler til bruk på etiketter, som merking eller til informasjon for medisinsk utstyr. Del 1: Generelle krav.)			

Beckman Coulter, den stiliserte logoen og Beckman Coulters vare- og servicemerker som er omtalt her, er varemerker eller registrerte varemerker som tilhører Beckman Coulter, Inc. i USA og andre land.

MicroScan

Εγχειρίδιο διαδικασιών ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων οργανισμών

REF B1017-2

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η πλάκα ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών MicroScan είναι σχεδιασμένη για την ταχεία ταυτοποίηση αναερόβιων βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από ανθρώπινα κλινικά δείγματα.

ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΑΡΧΗ

Για την ταυτοποίηση των αναερόβιων βακτηρίων χρησιμοποιούνται τροποποιημένες συμβατικές και χρωμογονικές εξετάσεις.^{1,2,3,4,5,6,7} Παρασκευάζεται ένα εναιώρημα του μικροοργανισμού προς εξέταση, θολερότητας 3 της κλίμακας McFarland, σε απιονισμένο νερό, αποστειρωμένο σε αυτόκαυστο. Η πλάκα ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών MicroScan, που αποτελείται από 24 αφυδατωμένα υποστρώματα, επανενυδατώνεται, ενοφθαλμίζεται με το βακτηριακό εναιώρημα και υποβάλλεται σε αερόβια επώαση για 4 ώρες σε θερμοκρασία 35–37 °C. Καθότι η πλάκα ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών MicroScan ανιχνεύει προσχηματισμένα ένζυμα, δεν είναι απαραίτητη η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στην πλάκα. Μετά από την επώαση, οι μεταβολές στο pH, η χρήση ορισμένων υποστρωμάτων ή άλλες βιοχημικές αντιδράσεις ερμηνεύονται με σκοπό την ταυτοποίηση.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Οι πλάκες και τα αντιδραστήρια ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών MicroScan προορίζονται μόνο για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
2. Μην αφήνετε το αντιδραστήριο πεπτιδάσης, το αντιδραστήριο Ehrlich, το ξυλόλιο ή οποιοδήποτε από τα υποστρώματα ταυτοποίησης να έρθουν σε επαφή με τα μάτια, το δέρμα ή τα ρούχα.
3. Πρέπει να εφαρμόζονται άσηπτες τεχνικές και οι καθιερωμένες προφυλάξεις έναντι των μικροβιολογικών κινδύνων σε όλες τις διαδικασίες, λαμβάνοντας ιδιαίτερα υπόψη ότι οι ενοφθαλμισμένες πλάκες περιέχουν δυνητικούς παθογόνους οργανισμούς.
4. Πριν από την απόρριψη, όλα τα υλικά θα πρέπει να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Αποθηκεύετε τις πλάκες και τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία 2–8 °C.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΠΕΣ

Δεν ταξινομείται ως επικίνδυνο



Το Δελτίο δεδομένων ασφαλείας είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση techdocs.beckmancoulter.com

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΪΓΜΑΤΟΣ

Κατάλληλα δείγματα, απαλλαγμένα από τη φυσιολογική αναερόβια χλωρίδα, θα πρέπει να συλλέγονται, να μεταφέρονται και να τοποθετούνται σε θρεπτικά υλικά για αρχική απομόνωση, σύμφωνα με διαδικασίες που συνιστώνται στο *Anaerobe Laboratory Manual* (Εγχειρίδιο Αναερόβιων Εργαστηρίου) του V.P.I., το² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual* (Εγχειρίδιο Αναερόβιων Βακτηρίων Wadsworth),⁸ το *Laboratory Methods in Bacteriology* (Εργαστηριακές μέθοδοι στη Βακτηριολογία) του C.D.C.⁹ και το *Manual of Clinical Microbiology* (Εγχειρίδιο Κλινικής Μικροβιολογίας).¹⁰

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Αποικίες από επιλεκτικά θρεπτικά υλικά που περιέχουν αντιβιοτικά, όπως LKV (καναμυκίνη/βανκομυκίνη) ή άγαρ *Bacteroides* Bile Esculin (BBE), φαινυλο-αιθυλο-αλκοόλη (PEA) κ.λπ., δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία ενοφθαλμισμάτων για πλάκες.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Πλάκα ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών (B1017-2)

20 φύλλα εργασίας

Εγχειρίδιο διαδικασιών

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Παραφινέλαιο (B1010-40)

Καλυπτρίδα (B1010-56B)

Αντιδραστήριο πεπτιδάσης (B1012-30B)

N, N-διμεθυλ-α-ναφθυλαμίνη 0,5% (B1010-45A)

Σουλφανλικό οξύ 0,8% (B1010-44A)

Αντιδραστήριο Ehrlich (B1015-6)

Ξυλόλιο (B1015-5)

Πιπέτα των 50 µL με αποστειρωμένα ρύγχη

Υπεροξειδίο του υδρογόνου 3%

Ύδωρ ενοφθαλμίσματος, 3 mL απιονισμένο νερό, αποστειρωμένο σε αυτόκαυστο (B1015-2)

Αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί ή αποστειρωμένοι κρικοφόροι στυλεοί ενοφθαλμισμού

Ξύλινοι στυλεοί

Πρότυπα θολερότητας θειικού βαρίου McFarland 3, 4 και 5

Αναμίκτης Vortex

Μονάδα επώασης, χωρίς CO₂ (35 °C)

Μικροοργανισμοί ποιοτικού ελέγχου:

C. perfringens ATCC 13124*

C. sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή των πλακών

1. Αφαιρέστε τις πλάκες από το ψυγείο. **Οι πλάκες δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν ο αποξηραντικός παράγοντας απουσιάζει ή έχει καταστραφεί ή εάν η ακεραιότητα της συσκευασίας έχει υποβαθμιστεί (παραβίαση της σφράγισης τρυπημένη ή σχισμένη συσκευασία).**
2. Κόψτε τη θήκη για να την ανοίξετε και αφαιρέστε την πλάκα. Αφαιρέστε αμέσως την πλάκα από τη θήκη αλουμινίου. Αφήστε τις πλάκες να εγκλιματιστούν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την επανενυδάτωση. Επιτρέπεται η στοίβαξη των πλακών, εφόσον τοποθετηθεί πάνω τους μια καθαρή καλυπτρίδα.

Παρασκευή του ενοφθαλμίσματος

1. Πριν από τον ενοφθαλμισμό των πλακών, θα πρέπει να διαπιστωθεί αν οι μικροοργανισμοί προς εξέταση είναι αερανεκτικοί, καθώς και να παρατηρηθούν ως προς την καθαρότητα, την αντίδραση χρώσης Gram και τη μορφολογία αποικιών.
2. Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βαμβακοφόρο ή κρικοφόρο στυλεό ενοφθαλμισμού, εναιωρήστε επαρκή αριθμό αποικιών από καλλιέργεια 24–48 ωρών σε μη επιλεκτικό θρεπτικό υλικό, σε σωληνάριο με 3 mL ύδωρ ενοφθαλμισμού (απιονισμένο νερό αποστειρωμένο σε αυτόκαυστο), ώστε να δημιουργηθεί θολερό εναιώρημα ισοδύναμο τουλάχιστον με πρότυπο 3 της κλίμακας McFarland, αλλά όχι μεγαλύτερο από πρότυπο 5 της κλίμακας McFarland. Αν χρειάζεται, περιδινήστε για γαλακτωματοποίηση. Μόλις ετοιμαστεί το εναιώρημα, θα πρέπει να ενοφθαλμίσετε την πλάκα εντός 15 λεπτών.**

Ενοφθαλμισμός πλάκας

1. Αφαιρέστε την πλάκα από τη θήκη αλουμινίου και επισημάνετε την με τον αριθμό δείγματος.
2. Προσθέστε 50 µL βακτηριακού εναιωρήματος σε κάθε βοθρίο που περιέχει υπόστρωμα, καθώς και στα δύο βοθρία ελέγχου (BNAC, NPC). Δεν συνιστάται η χρήση πιπέτας Pasteur για ενοφθαλμισμό.
3. Μετά τον ενοφθαλμισμό της πλάκας με το ενοφθάλμισμα 50 µL, χτυπήστε ελαφρώς κάθε πλευρά της πλάκας για να διασφαλιστεί η ανάμειξη με το υπόστρωμα.

Βιοχημική επίστρωση ελαίου

Επιστρώστε τα βοθρία ουρίας (URE) και ινδόλης (IND) με 2–3 σταγόνες παραφινέλαιο.

Επώαση

1. Στοιβάξτε τις πλάκες σε ομάδες των 3 έως 5 πλακών, τοποθετώντας καλυπτρίδα στην επάνω πλάκα για την πρόληψη της εξάτμισης.
2. Επώαστε τις ενοφθαλμισμένες πλάκες επί 4 ώρες σε θερμοκρασία 35–37 °C, σε μονάδα επώασης χωρίς CO₂.

Ανάγνωση των πλακών

1. Αφαιρέστε το αντιδραστήριο πεπτιδάσης από το ψυγείο τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από την ανάλυση των πλακών. Το αντιδραστήριο πεπτιδάσης μπορεί να σχηματίσει ίζημα στους 4 °C, αλλά θα διαλυθεί εκ νέου όταν επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Μην εκθέτετε το αντιδραστήριο πεπτιδάσης σε αυξημένες θερμοκρασίες για να επιταχύνετε την επαναδιάλυση του κρυσταλλικού ιζήματος, καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες επιφέρουν υποβάθμιση του αντιδραστήριου.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** Στα μη επιλεκτικά θρεπτικά υλικά περιλαμβάνονται τα άγαρ TSA, Brucella, brain heart infusion ή Columbia, όλα με 5% αίμα προβάτου.

2. Για την ανάγνωση των πλακών θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ανακλώμενο φως από λευκό υπόβαθρο.

Πίνακας 1, Υποστρώματα

Υποστρώματα	Συντμ.	Υποστρώματα	Συντμ.
p-νιτροφαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης	BGAL	L-λυσίνη-β-ναφθυλαμίνη (όξινη)	LYA
p-νιτροφαινυλο-α-D-γαλακτοπυρανοζίτης	AGAL	Γλυκυλογλυκίνη-β-ναφθυλαμίνη	GGLY
δι-p-φωσφορικό-νιτροφαινύλιο	BPO ₄	β-ναφθυλαμίνη γλυκίνης	GLY
p-νιτροφαινυλο-N-ακετυλο-β-D-γλυκοσαμινίδιο	NGLU	L-προλίνη-β-ναφθυλαμίνη	PRO
p-νιτροφαινυλο-α-D-γλυκοπυρανοζίτης	AGL	L-αργινίνη-β-ναφθυλαμίνη	ARG
ο-νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης	BGL	L-πυρρολιδονυλ-β-ναφθυλαμίδη	PYR
p-φωσφορικό-νιτροφαινύλιο	PO ₄	L-τρυπτοφάνη-β-ναφθυλαμίνη	TRY
p-νιτροφαινυλο-α- L-φουκο-πυρανοζίτης	AFU	Φωσφορικό 3-ινδοξύλιο	IDX
p-νιτροφαινυλο-α-D-μαννοπυρανοζίτης	MNP	Τρεχαλόζη	TRE
L-λευκίνη-β-ναφθυλαμίνη	LEU	Ουρία	URE
DL-μεθειονίνη-β-ναφθυλαμίνη	MET	Ινδόλη	IND
L-λυσίνη-β-ναφθυλαμίνη (αλκαλική)	LYB	Νιτρικό	NIT

- Μετά από 4 ώρες επώασης, καταγράψτε τα αποτελέσματα για όλα τα υποστρώματα για τα οποία δεν απαιτούνται επιπλέον αντιδραστήρια: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE και TRE. Συγκρίνετε τα BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU και MNP με το βοηθίο μάρτυρα νιτροφαινυλίου (NPC). Οποιαδήποτε απόχρωση του κίτρινου θα πρέπει να καταγραφεί ως θετική αντίδραση.
- Προσθέστε 1 σταγόνα αντιδραστηρίου πεπτιδάσης στα βοηθία LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY και BNAC.
 - Αφήστε το χρώμα να αναπτυχθεί για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, καταγράψτε τα αποτελέσματα. Μην περιμένετε περισσότερο από 3 λεπτά μετά από την προσθήκη των αντιδραστηρίων για να καταγράψετε τα αποτελέσματα. Η παρουσία οποιασδήποτε απόχρωσης του ροζ ή του κόκκινου θα πρέπει να ερμηνευτεί ως θετική αντίδραση. Το χρώμα σε αυτά τα βοηθία θα γίνει πιο σκούρο με το πέρασμα του χρόνου, με αποτέλεσμα ένα αρνητικό κίτρινο χρώμα να γίνει πιο σκούρο πορτοκαλί, ωστόσο και αυτό θα πρέπει να ερμηνευτεί ως αρνητική αντίδραση. Οι αντιδράσεις θα πρέπει να καταγράφονται ως θετικές **μόνο** αν υπάρχει παρουσία ροζ ή κόκκινου χρώματος. Κάποια βοηθία ενδέχεται να έχουν πιο σκούρο πορτοκαλί χρώμα σε σύγκριση με το βοηθίο μάρτυρα (BNAC), ωστόσο και αυτά θα πρέπει να καταγραφούν ως αρνητικά.
 - Μετά από την προσθήκη αντιδραστηρίου πεπτιδάσης στο βοηθίο μάρτυρα β-ναφθυλαμίδης (BNAC), το βοηθίο θα πρέπει να έχει κίτρινο χρώμα. Εάν παρατηρηθεί παρουσία ροζ ή κόκκινου χρώματος, τότε θα πρέπει να απορρίψετε το αντιδραστήριο πεπτιδάσης, προκειμένου να αποφύγετε ψευδώς θετικές ερμηνείες.
- Παρέχονται δύο βοηθία ελέγχου για βοήθεια στην ερμηνεία των αντιδράσεων.
 - BNAC = μάρτυρας β-ναφθυλαμίνης. Μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου πεπτιδάσης, αυτό το βοηθίο θα πρέπει να αποκτήσει κίτρινο προς πορτοκαλί χρώμα.
 - NPC = μάρτυρας νιτροφαινυλίου. Αυτό το βοηθίο θα πρέπει να είναι άχρωμο.
- Προσθέστε μία σταγόνα ξυλολίου στο βοηθίο ινδόλης (IND). Χρησιμοποιώντας τον ξύλινο στυλεό, αναμίξτε το περιεχόμενο του βοηθίου IND. Προσθέστε 1 σταγόνα αντιδραστηρίου Ehrlich. Εκτελέστε ανάγνωση μετά από 2–3 λεπτά.
- Προσθέστε 1 σταγόνα σουλφανιλικό οξύ στο Νιτρικό (NIT) βοηθίο και, στη συνέχεια, 1 σταγόνα N, N-διμεθυλο-α-ναφθυλαμίνη. Εκτελέστε ανάγνωση μετά από 2–3 λεπτά.
- Προσθέστε 2–3 σταγόνες Υπεροξείδιο του υδρογόνου 3% στο βοηθίο BGAL. Περιμένετε 2–5 λεπτά πριν καταγράψετε το αποτέλεσμα. Ο σχηματισμός μεγάλων φυσαλίδων υποδεικνύει θετική αντίδραση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Πίνακας βιοχημικής ερμηνείας

Υπόστρωμα	Αντιδραστήρια	Θετικό	Αρνητικό
BGAL	Συγκρίνετε με το βοηθίο μάρτυρα	Οποιαδήποτε	Διαυγές
AGAL	νιτροφαινυλίου (NPC)	απόχρωση του	
		κίτρινου	
BPO ₄			
NGLU			
AGL			
BGL			
PO ₄ ¹			
AFU			
MNP			

Υπόστρωμα	Αντιδραστήρια	Θετικό	Αρνητικό
LEU	Προσθέστε 1 σταγόνα αντιδραστήριο πεπτιδάσης. Αφήστε τις χρωματικές αντιδράσεις να αναπτυχθούν για 30 δευτερόλεπτα τουλάχιστον, αλλά όχι πάνω από 3 λεπτά.	Οποιαδήποτε ροζ έως πορφυρή απόχρωση	Κίτρινο προς πορτοκαλί
MET			
LYB			
LYA			
GGLY			
GLY	Το βοθρίο μάρτυρα β-ναφθυλαμίνης (BNAC) θα πρέπει να έχει κίτρινο χρώμα.	Μπλε χρώση/Μπλε ίζημα	Διαυγές
PRO			
ARG			
PYR			
TRY			
IDX			
TRE		Κίτρινο	Πορτοκαλί/κόκκινο
URE		Ροζ-κόκκινο	Κίτρινο-πορτοκαλί
IND	Προσθέστε 1 σταγόνα ξυλόλιο, ανακατέψτε, προσθέστε 1 σταγόνα αντιδραστήριο Ehrlich. Εκτελέστε ανάγνωση μετά από 2–3 λεπτά.	Ροζ	Κίτρινο/διαυγές
NIT	Προσθέστε 1 σταγόνα σουλφανιλικό οξύ 0,8% και 1 σταγόνα N, N-διμεθυλο-α-ναφθυλαμίνη 0,5%. Εκτελέστε ανάγνωση μετά από 2–3 λεπτά.	Κόκκινο	Διαυγές προς απαλό ροζ
Κατάλαση	Προσθέστε 2–3 σταγόνες Υπεροξειδίου του υδρογόνου 3% στο BGAL. Περιμένετε 2–3 λεπτά.έως ότου σχηματιστούν φυσαλίδες.	Μεγάλες φυσαλίδες	Χωρίς σχηματισμό φυσαλίδων (ή λίγες μικρές φυσαλίδες/ίδιος αριθμός σε όλα τα βοθρία.)

1. Μια αρνητική αντίδραση PO₄ μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα διαυγές έως πολύ ανοιχτό κίτρινο χρώμα.

2. Αρχές αντιδράσεων ταυτοποίησης

Υποστρώματα νιτροφαινυλίου (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): Τα υποστρώματα ορθο-νιτροφαινυλίου ή παρα-νιτροφαινυλίου είναι άχρωμα. Εάν υπάρχει το κατάλληλο ένζυμο, το υπόστρωμα διασπάται, απελευθερώνοντας το ελεύθερο ο-νιτροφαινύλιο ή ρ-νιτροφαινύλιο, που έχει κίτρινο χρώμα.

Υποστρώματα β-ναφθυλαμίνης αμινοξέων (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): Όταν το υπόστρωμα υδρολύεται από το κατάλληλο ένζυμο (συνήθως από αρυλαμιδάση αμινοξέων), απελευθερώνεται β-ναφθυλαμίνη. Η β-ναφθυλαμίνη ανιχνεύεται μέσω της προσθήκης ρ-διμεθυλαμινοκιναμαλδεΰδης (στο αντιδραστήριο πεπτιδάσης), η οποία δημιουργεί ένα σύμπλεγμα του οποίου το χρώμα κυμαίνεται από ροζ έως μοβ.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το ένζυμο που διασπά τη β-ναφθυλαμίνη αμινοξέων είναι αρυλαμιδάση αμινοξέων. Ο όρος «αμινοπεπτιδάση» χρησιμοποιείται συχνά ως συνώνυμο της αρυλαμιδάσης, αλλά στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύει ένα ένζυμο διαφορετικής ειδικότητας (η αμινοπεπτιδάση διασπά το αμινοτελικό άκρο ενός πεπτιδίου). Η αρυλαμιδάση και η αμινοπεπτιδάση δύναται να υδρολύσουν το ίδιο υπόστρωμα β-ναφθυλαμίνης αμινοξέων. Επομένως, η πλάκα δεν

μετρά κατ' ανάγκη διαφορετικά και μοναδικά ένζυμα. Μια μεμονωμένη αρυλαμιδάση μπορεί να υδρολύσει πολλαπλές β-ναφθυλαμίνες αμινοξέων.

Φωσφορικό ινδοξύλιο (IDX): Το φωσφορικό ινδοξύλιο διασπάται από φωσφατάση για την απελευθέρωση ινδοξυλίου. Το ινδοξύλιο συνδυάζεται με οξυγόνο, σχηματίζοντας ένα βαθύ μπλε χρώμα με τη μορφή αδιάλυτου μπλε ή μπλε-πράσινου ιζήματος.

Τρεχαλόζη (TRE): Η χρήση της τρεχαλόζης έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό οξέων και την επακόλουθη μείωση του pH, η οποία ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρού της φαινόλης, που αλλάζει χρώμα από πορτοκαλί σε κίτρινο.

Ουρία (URE): Η ουρία διαχωρίζεται από την ουρεάση, σχηματίζοντας αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα. Η αμμωνία (υπό μορφή ανθρακικού αμμωνίου) επιφέρει αύξηση του pH, η οποία ανιχνεύεται από την μεταβολή του δείκτη ερυθρού της φαινόλης από κίτρινο σε ροζ χρώμα.

Ινδόλη (IND): Ο μεταβολισμός της τρυπτοφάνης έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ινδόλης. Το ξυλόλιο απομονώνει την ινδόλη από τον ζυμό και την συμπυκνώνει. Το αντιδραστήριο Ehrlich αντιδρά με την ινδόλη, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί ροζ χρώση.

Νιτρικό (NIT): Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να ανάγει το νιτρικό σε νιτρώδες ανιχνεύεται με την προσθήκη σουλφανιλικού οξέος και κατόπιν N,N-διμεθυλο-α-ναφθυλαμίνης, τα οποία παράγουν κόκκινο χρώμα παρουσία της νιτρώδους ομάδας.

Η **κατάλαση** διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και αέριο οξυγόνο, που απελευθερώνεται με τη μορφή φυσαλίδων.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Το Βιβλίο κωδικοποίησης βιοτύπων αναερόβιων μικροοργανισμών ταχείας ταυτοποίησης MicroScan χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των άγνωστων μικροοργανισμών της εξέτασης. Το βιβλίο κωδικοποίησης έχει δημιουργηθεί από τη βάση δεδομένων της Beckman Coulter για τις εξετάσεις που περιλαμβάνονται στην πλάκα ταυτοποίησης.

Το Βιβλίο κωδικοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών ταχείας ταυτοποίησης MicroScan βασίζεται σε υπολογιστική ανάλυση των 24 εξετάσεων της πλάκας ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων μετασχηματίζονται σε έναν 8ψήφιο «αριθμό βιοτύπου» για τον οποίο το βιβλίο κωδικοποίησης παραθέτει την ταυτοποίηση είδους και μια αθροιστική σχετική πιθανότητα ταυτοποίησης. Όλες οι πιθανές ταυτοποιήσεις παρέχονται με φθίνουσα σειρά, ξεκινώντας από τη μέγιστη πιθανότητα και φτάνοντας σε αθροιστικό ποσοστό 99,9%. Σε περίπτωση που προκύψει ένας αριθμός βιοτύπου που δεν μπορεί να βρεθεί στο βιβλίο κωδικοποίησης, θα πρέπει να υποψιαστεί κανείς καταρχάς την πιθανότητα κάποιου σφάλματος στη διαδικασία. Συνήθως, έχει προστεθεί εσφαλμένος αριθμός βιοτύπου ή έχει καταγραφεί εσφαλμένα μια αντίδραση. Εάν ο αριθμός βιοτύπου είναι σωστός, τότε θα πρέπει να ελεγχθεί η πιθανότητα μικτής καλλιέργειας και να επαναληφθεί η εξέταση του μικροοργανισμού, με ιδιαίτερη έμφαση στη χρήση επαρκώς θολερού κυτταρικού εναιωρήματος. Εάν προκύψουν τα ίδια αποτελέσματα μετά την επανεξέταση, συμβουλευτείτε το Biotype Lookup Service (Υπηρεσία αναζήτησης βιοτύπων) στον ιστότοπο της Beckman Coulter ή απευθυνθείτε στον τοπικό σας διανομέα.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1. Οι μικροοργανισμοί προς εξέταση θα πρέπει να καλλιεργούνται σε μη επιλεκτικά θρεπτικά υλικά, όπως άγαρ TSA, Brucella, brain heart infusion ή Columbia, όλα με 5% αίμα προβάτου. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επιλεκτικά θρεπτικά υλικά που περιέχουν αντιβιοτικά, όπως LKV (καναμυκίνη/βανκομυκίνη), άγαρ *Bacteroides* Bile Esculin (BBE), άγαρ φαινυλο-αιθυλο-αλκοόλης (PEA) κ.λπ.
2. Η θολερότητα του εναιωρήματος μικροοργανισμών πρέπει να ισοδυναμεί τουλάχιστον με πρότυπο 3 της κλίμακας McFarland, αλλά όχι μεγαλύτερο από πρότυπο 5 της κλίμακας McFarland. Εάν το εναιώρημα του μικροοργανισμού προς εξέταση εμφανίζει μικρότερη θολερότητα σε σύγκριση με το πρότυπο 3 της κλίμακας McFarland, ενδέχεται να προκύψουν ασθενείς ή ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις.
3. Η πλάκα ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών είναι σχεδιασμένη για την ταυτοποίηση αποκλειστικά αναερόβιων βακτηρίων. Πριν από την εξέταση, θα πρέπει να διαπιστωθεί για κάθε μικροοργανισμό αν είναι αερανεκτικός, καθώς και να εξεταστεί ως προς την καθαρότητα, την αντίδραση χρώσης Gram και τη μορφολογία αποικιών. Εάν είναι προγραμματισμένη η ταυτοποίηση περισσότερων τους ενός ειδών για έναν συγκεκριμένο αριθμό βιοτύπου, ενδέχεται να είναι αναγκαία η διενέργεια συμπληρωματικών εξετάσεων με σκοπό τη σωστή ταυτοποίηση.
4. Η βάση δεδομένων αναερόβιων μικροοργανισμών ταχείας ταυτοποίησης δεν περιλαμβάνει όλα τα είδη αναερόβιων μικροοργανισμών που απαντούν σε κλινικές καταστάσεις. Τα είδη που ταυτοποιούνται στην πλάκα ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών παρατίθενται στο Βιβλίο κωδικοποίησης βιοτύπων αναερόβιων μικροοργανισμών ταχείας ταυτοποίησης. Οι ταυτοποιήσεις αναερόβιων μικροοργανισμών θα πρέπει να συσχετίζονται με χρώσεις gram και άλλες συνοδευτικές διαγνωστικές εξετάσεις. Ο χρήστης θα πρέπει να ανατρέχει στην τρέχουσα βιβλιογραφία αναφοράς για αυτές τις εξετάσεις, καθώς και για την τρέχουσα ονοματολογία των βακτηρίων.
5. Η πλάκα ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών MicroScan δεν έχει λάβει έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) για χρήση με τα συστήματα οργάνων MicroScan. Η ανάγνωση της πλάκας πρέπει να γίνει μη αυτόματα.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Η αποδεκτότητα των θρεπτικών υλικών ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών MicroScan ταυτοποίησης θα πρέπει να ελέγχεται μέσω της εξέτασης μικροοργανισμών με γνωστές αντιδράσεις. Αρνητικές αντιδράσεις μπορούν να επιτευχθούν με επανενυδάτωση μιας πλάκας με 50 µL απιονισμένο νερό, αποστειρωμένο σε αυτόκαυστο. Όλα τα υποστρώματα θα πρέπει να είναι αρνητικά, όπως περιγράφεται στον πίνακα ερμηνείας. Η καθαρότητα της καλλιέργειας θα πρέπει να ελέγχεται με υποκαλλιέργεια μέρους του εναιωρήματος που χρησιμοποιήθηκε ως ενοφθάλμισμα σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό άγαρ. Τα αποτελέσματα της εξέτασης δεν θεωρούνται έγκυρα αν ανιχνευτεί μικτή καλλιέργεια (βλ. Πίνακα 2).*

Πίνακας 2

Πίνακας ποιοτικού ελέγχου

Υποστρώματα	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
ΚΑΤΑΛΑΣΗ	–	–	+	–

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA.

2. Για βέλτιστα αποτελέσματα, η καλλιέργεια *C. perfringens* θα πρέπει να έχει δημιουργηθεί μόλις 24 ώρες νωρίτερα.

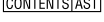
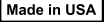
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Σε κλινικές μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν αναερόβιοι μικροοργανισμοί που αντιπροσώπευαν ένα ποικιλόμορφο σύνολο κλινικά απομονωμένων στελεχών, η πλάκα ταχείας ταυτοποίησης αναερόβιων μικροοργανισμών ταυτοποίησε σωστά τα απομονωμένα στελέχη σε ποσοστό 92%.

Υπόμνημα συμβόλων

Υπόμνημα συμβόλων			
Σύμβολο	Τίτλος συμβόλου	Περιγραφή προτύπου	Πρότυπο
②	Να μην επαναχρησιμοποιείται	Υποδεικνύει μια ιατρική συσκευή που προορίζεται για μία μόνο χρήση ή για χρήση σε έναν μόνο ασθενή στο πλαίσιο μίας και μοναδικής διαδικασίας.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Χρήση έως	Υποδεικνύει την ημερομηνία μετά το πέρας της οποίας δεν πρέπει να χρησιμοποιείται η ιατρική συσκευή.	ISO 15223-1; 5.1.4

*Τα αποτελέσματα για κάθε αντίδραση για τους συνιστώμενους μικροοργανισμούς ελέγχου του ATCC, Συλλογή Μικροβίων Αμερικανικού Τύπου παρατίθενται στον Πίνακα ποιοτικού ελέγχου.

Υπόμνημα συμβόλων			
Σύμβολο	Τίτλος συμβόλου	Περιγραφή προτύπου	Πρότυπο
	Αριθμός παρτίδας	Υποδεικνύει τον αριθμό παρτίδας του κατασκευαστή ώστε να είναι δυνατή η αναγνώριση της παρτίδας.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Κωδικός καταλόγου	Υποδεικνύει τον αριθμό καταλόγου του κατασκευαστή, ώστε να είναι δυνατή η αναγνώριση της ιατρικής συσκευής.	ISO 15223-1, παράγραφος 5.1.6
	Κατασκευαστής	Υποδεικνύει τον κατασκευαστή της ιατρικής συσκευής όπως ορίζεται στις οδηγίες 90/385/ΕΟΚ, 93/42/ΕΟΚ και 98/79/ΕΚ της ΕΕ.	ISO 15223-1, παράγραφος 5.1.1
	Ημερομηνία κατασκευής	Υποδεικνύει την ημερομηνία κατασκευής της ιατρικής συσκευής.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα	Υποδεικνύει τον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπο στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα.	ISO 15223-1, παράγραφος 5.1.2
	Περιέχει επαρκή ποσότητα για <η> εξετάσεις	Υποδεικνύει τον συνολικό αριθμό εξετάσεων IVD που μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη συσκευή IVD. (Περιλαμβάνεται συνήθως στα kit αντιδραστηρίων.)	ISO 15223-1; 5.5.5
	<i>In vitro</i> διαγνωστική ιατρική συσκευή	Υποδεικνύει μια ιατρική συσκευή που προορίζεται για χρήση ως ιατρική συσκευή για διάγνωση <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, παράγραφος 5.5.1
	Περιορισμοί θερμοκρασίας	Υποδεικνύει τα όρια θερμοκρασίας στα οποία η ιατρική συσκευή μπορεί να εκτεθεί με ασφάλεια.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Υποδεικνύει ότι ο χρήστης είναι απαραίτητο να συμβουλευτεί τις οδηγίες χρήσης.	ISO 15223-1; 5.4.3
	Σήμανση CE	Ρυθμιστική σήμανση ευρωπαϊκής συμμόρφωσης	Δ/Ι
	Περιεχόμενα	Δ/Ι	Δ/Ι
	Περιεχόμενα (συσκευασία)	Αντιμικροβιακός παράγοντας (σύντηξη)	Δ/Ι
	Περιεχόμενα (συσκευασία)	Υπόστρωμα ταυτοποίησης (σύντηξη)	Δ/Ι
	Φύλλο Δεδομένων Ασφάλειας	Υποδεικνύει ένα δελτίο δεδομένων ασφάλειας.	Δ/Ι
	Made in USA	Δ/Ι	Δ/Ι
	Χρήση μόνο για εξαγωγή	Δ/Ι	Δ/Ι
	Όγκος ανασύστασης	Δ/Ι	Δ/Ι
	Εύθραυστο, να χρησιμοποιείται με προσοχή	Υποδεικνύει μια ιατρική συσκευή που μπορεί να σπάσει ή να υποστεί φθορά εάν ο χειρισμός της δεν γίνει σωστά.	ISO 15223-1; 5.3.1

Υπόμνημα συμβόλων			
Σύμβολο	Τίτλος συμβόλου	Περιγραφή προτύπου	Πρότυπο
	Αυτή η πλευρά προς τα πάνω	Υποδεικνύει τη σωστή όρθια θέση της συσκευασίας	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices - Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements (ISO 15223-1: Προϊόντα για ιατρική χρήση - Σύμβολα που πρέπει να χρησιμοποιούνται με τις ετικέτες, την επισήμανση και τις πληροφορίες που πρέπει να παρέχονται για τα προϊόντα για ιατρική χρήση. Μέρος 1: Γενικές απαιτήσεις).			

Η επωνυμία Beckman Coulter, το τυποποιημένο λογότυπο και τα σήματα προϊόντων και υπηρεσιών της Beckman Coulter που αναφέρονται στο παρόν είναι εμπορικά σήματα ή σήματα κατατεθέντα της Beckman Coulter, Inc. στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε άλλες χώρες.

MicroScan

厌氧菌快速鉴定操作手册

REF B1017-2

预期用途

MicroScan 厌氧菌快速鉴定测试组合设计用于快速鉴定从人类临床样本中分离的厌氧菌。

摘要和原理

使用经过改良的常规显色测试鉴定厌氧菌。^{1、2、3、4、5、6、7}待测试微生物的 McFarland 3 悬液在高温灭菌去离子水中制备。MicroScan 厌氧菌快速鉴定测试组合包含 24 种脱水底物，使用细菌悬液再水化、孵育，并在 35 – 37°C 下有氧孵育 4 小时。由于 MicroScan 厌氧菌快速鉴定测试组合检测出产酶，因此不需要使微生物在测试组合上生长。孵育后，结合 pH 值的变化、特定底物的使用或其他生化反应进行判读鉴定。

警告和注意事项

1. MicroScan 厌氧菌快速鉴定测试组合和试剂仅用于体外诊断。
2. 不要让肽酶试剂、埃利希试剂、二甲苯或任何鉴定底物接触到眼睛、皮肤或衣物。
3. 在整个操作过程中，遵照无菌技术和已有的微生物危害预防措施，并特别注意已接种的测试组合中包含具有潜在致病性的微生物。
4. 所有材料在丢弃处理前应进行高压灭菌。

储存

将测试组合和试剂储存在 2 – 8°C 下。

GHS 危险等级分类

未被归为危险品

SDS 化学品安全技术说明书见 techdocs.beckmancoulter.com

样本的采集 和准备

应当按照 V.P.I.、*Anaerobe Laboratory Manual* (厌氧菌实验室手册)、²*Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual* (Wadsworth 厌氧菌手册)、⁸C.D.C. 的 *Laboratory Methods in Bacteriology* (实验室细菌学方法)⁹及 *Manual of Clinical Microbiology* (临床微生物学手册) 中建议的程序采集、运输并将适当的样本 (不含正常厌氧菌落) 放置于初代分离培养基上。¹⁰

注释：不应使用含抗生素 (如 LKV (卡那霉素/万古霉素)) 或 *Bacteroides* 胆汁七叶甙 (BBE) 琼脂、苯乙醇 (PEA) 等的选择性培养基中的菌落制备测试组合用接种物。

提供的材料

厌氧菌快速鉴定测试组合 (B1017-2)

20 个工作表

操作手册

所需但未提供的材料

矿物油 (B1010-40)

盖盘 (B1010-56B)

肽酶试剂 (B1012-30B)

0.5% N,N-二甲基- α -萘胺 (B1010-45A)

0.8% 磺胺酸 (B1010-44A)

埃利希试剂 (B1015-6)

二甲苯 (B1015-5)

带无菌吸头的 50 μ L 移液管

3% 过氧化氢

接种液，3 mL 高温灭菌去离子水 (B1015-2)

无菌棉头接种棒或无菌接种环

木质棉球棍

3、4 和 5 McFarland 硫酸钡浊度检测标准液

旋涡振荡器

孵育箱，无 CO₂ (35°C)

质量控制微生物：
C. perfringens ATCC 13124*
C. sordellii ATCC 9714
B. fragilis ATCC 25285
P. magnus ATCC 29328

方法
检测板的制备

- 1. 从冰箱中取出测试组合。如果发现干燥剂包丢失或包装破损、或测试组合包装不完整（未密封、被刺破或撕破），请勿使用该测试组合。
- 2. 剪开包装袋并取出检测板。立即将检测板从铝箔包装袋内取出。在再水化之前，等待检测板恢复至室温。可将检测板叠放在一起，上面用干净的盖盘覆盖。

接种物制备

- 1. 接种测试组合之前，应观察待测试微生物的耐氧性、纯度、革兰氏染色反应和菌落形态。
- 2. 使用无菌棉制接种棒或接种环将 24 – 48 小时非选择性培养基中的足够菌落悬浮在装有 3 mL 接种液（高温灭菌去离子水）的试管中，以制备至少等效于 McFarland 3 标准液但不超过 McFarland 5 标准液的混浊悬液。必要时涡旋混合进行乳化。悬液制备完成后，应在 15 分钟内接种测试组合。*

检测板接种

- 1. 从箔袋中取出测试组合并将其标记上样本编号。
- 2. 将 50 µL 细菌悬液加入每个含底物的孔和两个对照孔（BNAC、NPC）中。不建议使用巴斯德吸管接种。
- 3. 用 50 µL 接种物给检测板接种后，轻击检测板的各侧，以帮助与底物混合。

生物化学油覆盖

用 2 – 3 滴矿物油覆盖尿素 (URE) 和吲哚 (IND) 孔。

孵育

- 1. 以 3 – 5 个为一组叠放测试组合，将盖板置于顶部测试组合的上面以防蒸发。
- 2. 将接种过的检测板放入无 CO₂ 的孵育盘中，在 35-37°C 下孵育 4 小时。

读取检测板

- 1. 在读取测试组合前，至少提前 30 分钟将肽酶试剂从冰箱中取出。肽酶试剂可以在 4°C 下沉淀，但会在室温下再溶解。不要通过将肽酶试剂暴露于高温下加速晶形沉淀物的再溶解，因为高温会导致试剂降解。
- 2. 应使用来自白色背景的反射光读取测试组合。

表 1，底物

底物	缩写	底物	缩写
p-硝基苯基-β-D-半乳糖苷	BGAL	L-赖氨酸-β-萘酰胺（酸性）	LYA
p-硝基苯基-α-D-半乳糖苷	AGAL	双甘氨酸-β-萘酰胺	GGLY
双-p-硝基苯基-磷酸盐	BPO ₄	甘氨酸-β-萘酰胺	GLY
p-硝基苯基-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷	NGLU	L-脯氨酸-β-萘酰胺	PRO
p-硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷	AGL	L-精氨酸-β-萘酰胺	ARG
o-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷	BGL	L-吡咯烷酮基-β-萘酰胺	PYR
p-硝基苯基-磷酸盐	PO ₄	L-色氨酸-β-萘酰胺	TRY
p-硝基苯基-α-L-岩藻糖苷	AFU	3-吲哚磷酸盐	IDX
p-硝基苯基-α-D-吡喃甘露糖苷	MNP	海藻糖	TRE
L-亮氨酸-β-萘酰胺	LEU	脲	URE
DL-蛋氨酸-β-萘酰胺	MET	吲哚	IND
L-赖氨酸-β-萘酰胺（碱性）	LYB	硝酸盐	NIT

- 3. 进行 4 小时的孵育后，记录不需要额外试剂的所有底物的结果：BGAL、AGAL、BPO₄、NGLU、AGL、BGL、PO₄、AFU、MNP、IDX、URE 和 TRE。将 BGAL、AGAL、BPO₄、NGLU、AGL、BGL、PO₄、AFU 和 MNP 与硝基苯基对照 (NPC) 孔进行比较。任何程度的黄色均应记录为阳性。
- 4. 加入 1 滴肽酶试剂到 LEU、MET、LYB、LYA、GGLY、GLY、PRO、ARG、PYR、TRY 和 BNAC 孔中。
 - A. 等待至少 30 秒以发生显色，然后记录结果。加入试剂到记录结果之间的等待时间不能超过 3 分钟。若存在任何程度的粉色或红色，均应判读为阳性。这些孔呈现的颜色将随着时间加深，所以阴性的黄色可能会变成更深的

*美国标准菌种保藏中心，地址：Manassas, VA USA

** 非选择性培养基包括 TSA、布鲁氏菌、脑心浸液或哥伦比亚琼脂，它们均含有 5% 羊血。

橙色，但仍然应该将此结果判读为阴性反应。只应在存在粉色或红色时将反应记录为阳性。有些孔呈现的橙色可能比对照孔 (BNAC) 深，但仍然应该将其记录为阴性。

- B. 将肽酶试剂添加到 β -萘酰胺对照孔 (BNAC) 之后，该孔应呈现黄色。如果出现任何粉色或红色，应丢弃该肽酶试剂，以防造成假阳性判读。

5. 提供两个对照孔帮助判读反应。

A. BNAC = β -萘酰胺对照。添加肽酶试剂后，这个孔应呈现黄色到橙色。

B. NPC = 硝基苯基对照。这个孔应该没有颜色。

6. 加入 1 滴二甲苯到吡啶 (IND) 孔中。用木质棉球棍搅拌 IND 孔的内含物。加入 1 滴埃利希试剂。2–3 分钟后读取结果。

7. 加入 1 滴磺胺酸到硝酸盐 (NIT) 孔中，然后加入 1 滴 N,N-二甲基- α -萘胺。2–3 分钟后读取结果。

8. 加入 2–3 滴 3% 过氧化氢到 BGAL 孔中。等待 2–5 分钟后再记录结果。形成大气泡则表示阳性反应。

结果

1. 生化判读图表

底物	试剂	阳性	阴性
BGAL	与硝基苯基 (NPC) 对照孔比较	任何程度的黄色	透明
AGAL			
BPO ₄			
NGLU			
AGL			
BGL			
PO ₄ ¹			
AFU			
MNP			
LEU	加入 1 滴肽酶试剂。至少等待 30 秒但不超过 3 分钟，以让颜色反应显色。	任何程度的粉色到品红	黄色到橙色
MET			
LYB			
LYA			
GGLY			
GLY	β -萘酰胺 (BNAC) 对照孔应呈现黄色。		
PRO			
ARG			
PYR			
TRY			
IDX		蓝色/蓝色沉淀物	透明
TRE		黄色	橙色/红色
URE		粉色-红色	黄色-橙色
IND	加入 1 滴二甲苯并搅拌，加入 1 滴埃利希试剂。2–3 分钟后读取结果。	粉红色	黄色/清澈
NIT	加入 1 滴 0.8% 磺胺酸和 1 滴 0.5% N,N-二甲基- α -萘胺。2–3 分钟后读取结果。	红色	清澈到淡粉色
过氧化氢酶	加入 2–3 滴 3% 过氧化氢到 BGAL 中。等待 2–3 分钟以形成气泡。	大气泡	没有气泡 (或者少量小气泡/所有孔的量均相同。)

1. 阴性 PO₄ 反应可能为清澈到浅黄色。

2. 鉴定反应原理

硝基苯基底物 (BGAL、AGAL、BPO₄、NGLU、AGL、BGL、PO₄、AFU、MNP) : 邻硝基苯基或对硝基苯基底物无色。如果存在合适的酶, 底物会裂解, 释放出呈黄色的游离邻硝基苯基或对硝基苯基。

氨基酸 β-萘酰胺底物 (LEU、MET、LYB、LYA、GGLY、GLY、PRO、ARG、PYR、TRY) : 用适当的酶 (通常是氨基酸芳基酰胺酶) 对底物进行水解时, 会释放 β-萘酰胺。可以通过 (在肽酶试剂中) 添加对二甲氨基苯甲醛形成粉色到紫色的化合物来检测 β-萘酰胺。

注释: 分裂氨基酸 β-萘酰胺的酶是氨基酸芳基酰胺酶。“氨肽酶”常用作芳基酰胺酶的同义词, 但实际表示的是具有不同特异性的酶 (从肽中分裂出 N-末端氨基酸的氨肽酶)。芳基酰胺酶和氨肽酶可以水解同一种氨基酸 β-萘酰胺底物。因此, 测试组合没必要测量不同的酶。一种芳基酰胺酶可以水解多种氨基酸 β-萘酰胺。

吡啶磷酸盐 (IDX) : 磷酸酶分裂吡啶磷酸盐, 释放出吡啶酚。吡啶酚与氧气结合形成不能溶解的蓝色或蓝绿色沉淀物 - 靛蓝。

海藻糖 (TRE) : 利用海藻糖会形成酸, 继而导致 pH 值下降, 这可通过酚红指示剂从橙色变为黄色来检测。

尿素 (URE) : 脲酶可以将尿素分解为氨和二氧化碳。氨 (以碳酸铵的形式存在) 可以导致 pH 值升高, 这可以通过酚红指示剂从黄色变为粉色来检测。

吡啶 (IND) : 色氨酸代谢生成吡啶。二甲苯从液体培养基中提取吡啶并将其进行浓缩。埃利希试剂与吡啶发生反应形成粉色。

硝酸盐 (NIT) : 微生物可使硝酸盐还原为亚硝酸盐, 这可通过添加磺胺酸随后添加 N,N-二甲基-α-萘胺加以检测。如果生成红色, 则表明存在亚硝酸盐。

过氧化氢酶将过氧化氢分解为水和氧气, 以气泡的形式释放出来。

微生物鉴定

MicroScan 厌氧菌快速鉴定生物型代码本用于鉴定未知的测试微生物。该代码本根据鉴定测试组合上执行的测试的贝克曼库尔特数据库生成。

MicroScan 厌氧菌快速鉴定代码本根据厌氧菌快速鉴定测试组合上执行的 24 项测试的计算机分析编制。这些测试结果被转换为 8 位数的“生物型码”, 代码本据此列出菌种鉴定及鉴定的累积相对概率。所有可能的鉴定结果降序列出, 最高为 99.9% 的累积概率。如果出现代码本中没有的生物型码, 首先应怀疑出现程序错误。通常为生物型码添加不正确或者反应记录错误。如果生物型码正确, 则应检查是否可能存在混合培养液并重新测试微生物, 特别要注意使用足够浑浊的细胞悬液。如果重新测试后产生的结果相同, 则查阅贝克曼库尔特公司网站上的生物型查找服务或咨询您当地的分销商。

程序的局限性

1. 应将待测试微生物放置于 TSA、布鲁氏菌、脑心浸液或哥伦比亚琼脂 (全部含有 5% 羊血) 等非选择性培养基上进行培养。不应使用含抗生素 (如 LKV (卡那霉素/万古霉素)) 或 *Bacteroides* 胆汁七叶甙 (BBE) 琼脂、苯乙醇 (PEA) 等的选择性培养基。
2. 微生物悬液的浊度必须至少等于 McFarland 3 标准液但不得超过 McFarland 5 标准液。如果待测试微生物的悬液浊度低于 McFarland 3 标准液, 则可能发生弱反应或假阴性反应。
3. 厌氧菌快速鉴定测试组合设计用于仅鉴定厌氧菌。测试前, 应测试每种微生物的耐氧性、纯度、革兰氏染色反应和菌落形态。如果为某个特定生物型码列出多个菌种鉴定, 可能需要进行补充测试来进行正确鉴定。
4. 厌氧菌快速鉴定数据库中并不包含临床环境中遇到的所有厌氧菌种。通过厌氧菌快速鉴定测试组合鉴定的菌种列在厌氧菌快速鉴定生物型代码本中。厌氧菌鉴定应与革兰氏染色及其他支持性诊断测试相关联。用户应参阅这些测试的最新参考文献以及现行细菌命名法。
5. MicroScan 厌氧菌快速鉴定测试组合尚未获得 FDA 批准用于 MicroScan 仪器系统。必须人工读取该测试组合。

质量控制

应当通过测试具有已知反应的微生物来检查 MicroScan 厌氧菌快速鉴定培养基的可接受性。用 50 μL 高温灭菌去离子水再水化测试组合可以获得阴性反应。所有的底物均应呈现为判读图表中所述的阴性。应将培养液从接种物悬液转移到合适的琼脂培养基中进行传代培养, 以检测培养液的纯度。如果检测到混合培养液, 测试结果无效 (参阅表 2)。

表 2
质控表

底物	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	—
AGAL	+	—	+	—
BPO ₄	V	—	+	—
NGLU	+	—	+	—
AGL	+	V	+	—
BGL	—	—	+	—

* 质量控制图表列出了推荐的美国标准菌种保藏中心 (ATCC) 对照微生物的每种反应结果。

表 2
质控表

底物	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
PO ₄	+	✓	+	—
AFU	—	✓	+	—
MNP	✓	—	+	—
LEU	✓	—	+	+
MET	✓	—	✓	+
LYB	✓	—	✓	+
LYA	—	—	—	+
GGLY	—	—	✓	+
GLY	—	—	—	+
PRO	—	+	—	—
ARG	+	—	✓	+
PYR	+	—	—	+
TRY	—	✓	✓	✓
IDX	✓	—	+	—
TRE ²	✓	—	—	—
URE	—	+	—	—
IND	—	+	—	—
NIT ²	✓	—	—	—
过氧化氢酶	—	—	+	—

1. 美国标准菌种保藏中心，地址：Manassas, VA USA。

2. 为了获得最佳结果，*C. perfringens*培养液的制成时间应不超过 24 小时。

性能特征

使用代表近期各种不同临床分离株的厌氧菌进行临床试验时，厌氧菌快速鉴定测试组合正确鉴定了 92% 的分离株。

符号注解

符号注解			
符号	符号名称	标准说明	标准
ⓧ	请勿重复使用	指示医疗设备为一次性用品，或者适用于在单次手术中为单名患者使用。	ISO 15223-1；5.4.2
🕒	使用期限	指示医疗设备的最后使用日期。	ISO 15223-1；5.1.4
LOT	批号	指示制造商的批次代码，以用于标识批次。	ISO 15223-1；5.1.5
REF	目录号	指示制造商的产品目录号，以用于识别医疗设备。	ISO 15223-1；第 5.1.6 条
🏭	制造商	根据欧盟指令 90/385/EEC、93/42/EEC 和 98/79/EC 的规定指示医疗设备的制造商。	ISO 15223-1；第 5.1.1 条
📅	生产日期	指示医疗设备的生产日期。	ISO 15223-1；5.3.1
EC REP	欧洲共同体授权代表	指示欧洲共同体授权代表。	ISO 15223-1；第 5.1.2 条
Σ	内含物品足够进行 <n> 次测试	指示可使用 IVD 执行的 IVD 测试总数。（通常标注在试剂盒上）。	ISO 15223-1；5.5.5
IVD	体外诊断医疗设备	指示医疗设备适用于作为体外诊断医疗设备使用。	ISO 15223-1；第 5.5.1 条
🔥	温度限制	指示医疗设备可安全接触的温度限制。	ISO 15223-1；5.3.7
📖	请参阅使用说明	指示用户需要参阅使用说明。	ISO 15223-1；5.4.3
CE	CE 标志	欧盟 CE 认证法规标志	不适用
CONTENTS	内置物	不适用	不适用
CONTENTS AST	内容物（包装）	抗菌剂（缩写）	不适用
CONTENTS ID	内容物（包装）	鉴定底物（缩写）	不适用

符号注解			
符号	符号名称	标准说明	标准
	化学品安全技术说明书	指示化学品安全技术说明书。	不适用
	Made in USA	不适用	不适用
	仅供出口	不适用	不适用
	复溶体积	不适用	不适用
	易碎，小心处理	指示医疗设备若处理不当，则可能被打碎或损坏。	ISO 15223-1；5.3.1
	此面向上	指示正确的直立位置	ISO 7000：0623
ISO 15223-1: Medical Devices - Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements. (ISO 15223-1：医疗设备 — 用于医疗设备标签、作标记和提供信息的符号。第 1 部分：通用要求。)			

Beckman Coulter、标志以及文中提及的贝克曼库尔特产品和服务标记均是美国贝克曼库尔特有限公司在美国和其他国家/地区的商标或注册商标。

MicroScan

Podręcznik procedur szybkiej identyfikacji beztlenowców

REF B1017-2

ZASTOSOWANIE

Panel MicroScan do szybkiej identyfikacji beztlenowców jest przeznaczony do szybkiej identyfikacji bakterii beztlenowych izolowanych z ludzkich próbek klinicznych.

OMÓWIENIE I ZASADA DZIAŁANIA

Zmodyfikowane testy konwencjonalne i chromogeniczne służą do identyfikacji bakterii beztlenowych.^{1,2,3,4,5,6,7} Badana zawiesina drobnoustrojów o zmętnieniu 3 w skali McFarlanda jest przygotowana w autoklawowanej wodzie dejonizowanej. Panel MicroScan do szybkiej identyfikacji beztlenowców, zawierający 24 odwodnione substraty, jest ponownie uwadniany i inokulowany z zawiesiną bakteryjną przez 4 godziny w temp. 35–37°C w warunkach tlenowych. Ponieważ panel MicroScan do szybkiej identyfikacji beztlenowców wykrywa wstępnie utworzone enzymy, nie jest wymagany wzrost drobnoustroju w panelu. Po inkubacji analizowane są zmiany pH, wykorzystanie pewnych substratów lub inne reakcje biochemiczne w celu identyfikacji.

OSTRZEŻENIE I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Panele i odczynniki MicroScan do szybkiej identyfikacji beztlenowców są przeznaczone wyłącznie do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
2. Nie dopuścić do kontaktu odczynnika peptydazowego, odczynnika Ehrlicha, ksylenu ani dowolnego z substratów identyfikacyjnych z oczami, skórą lub odzieżą.
3. Przy wykonywaniu wszystkich procedur ze szczególnym uwzględnieniem kwestii, że inokulowane panele zawierają potencjalnie chorobotwórcze drobnoustroje, należy stosować techniki aseptyczne i środki ostrożności wymagane podczas pracy z organizmami potencjalnie patogennymi.
4. Wszystkie materiały należy przed utylizacją autoklawować.

PRZECHOWYWANIE

Panele i odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2–8°C.

KLASYFIKACJA ZAGROŻEŃ WG GHS

Substancja niesklasyfikowana jako niebezpieczna

SDS Karta charakterystyki jest dostępna w witrynie techdocs.beckmancoulter.com

POBIERANIE I PRZYGOTOWY-WANIE PRÓBEK

Odpowiednie próbki powinny być pobierane, transportowane i posiewane na podstawowych podłożach selektywnych zgodnie z procedurami zalecanymi w dokumentach V.P.I., *Anaerobe Laboratory Manual* (Podręcznik laboratoryjny dotyczący beztlenowców V.P.I.),² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual* (Podręcznik bakterii beztlenowych Wadswortha),⁸ C.D.C.'s *Laboratory Methods in Bacteriology* (Metody laboratoryjne CDC w bakteriologii)⁹ oraz *Manual of Clinical Microbiology* (Podręcznik mikrobiologii klinicznej).¹⁰

UWAGA: Kolonie z podłoży selektywnych, zawierających antybiotyki, tj. LKV (kanamycyna/wankomycyna) ani agar *Bacteroides* Bile Esculin (BBE), alkohol fenyloetylowy (PEA) itd. nie powinny być stosowane do przygotowywania inokulum dla paneli.

MATERIAŁY DOSTARCZONE

Panel do szybkiej identyfikacji beztlenowców (B1017-2)

20 arkuszy roboczych

Procedura ręczna

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

Olej mineralny (B1010-40)

Taca pokrywowa (B1010-56B)

Odczynnik peptydazowy (B1012-30B)

0,5% N,N-dimetylo-alfa-naftyloamina (B1010-45A)

0,8% kwas sulfanilowy (B1010-44A)

Odczynnik Ehrlicha (B1015-6)

Ksylene (B1015-5)

Pipetor 50 µL z jałowymi końcówkami

Nadtlenek wodoru, 3%
Woda inokulacyjna, 3 mL autoklawowanej wody dejonizowanej (B1015-2)
Jałowe patyczki bawełniane lub jałowe ezy do inokulacji
Wymazówki drewniane
Wzorzec zmętnienia siarczanu baru 3, 4 i 5 w skali McFarlanda
Wyrząsarka do probówek
Inkubator, bez CO₂ (35°C)
Drobnoustroje do kontroli jakości:
C. perfringens ATCC 13124*
C. sordellii ATCC 9714
B. fragilis ATCC 25285
P. magnus ATCC 29328

PROCEDURA

Przygotowanie paneli

- Wyjąć panele z chłodziarki. **Nie należy używać paneli, jeżeli brak jest środka osuszającego lub jest on uszkodzony, bądź opakowanie jest naruszone (niezaklejone, przebite lub rozdarte).**
- Rozciąć torebkę i wyjąć panel. Natychmiast wyjąć panel z torebki foliowej. Przed powtórным uwodnieniem panele powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Panele można ustawiać jeden na drugim, umieszczając przezroczystą pokrywkę na górze każdego z nich.

Przygotowanie inokulum

- Przed inokulacją paneli badane drobnoustroje należy obserwować pod kątem tolerancji tlenu, czystości, barwienia Grama i morfologii kolonii.
- Stosując jałowy bawełniany patyczek lub eżę do posiewów, zawiesić wystarczającą ilość kolonii z 24–48 godzinnej hodowli na podłożu nieselektywnym w probówce zawierającej 3 mL wody inokulacyjnej (autoklawowanej wody dejonizowanej), aby przygotować mętną zawiesinę równoważną co najmniej wzorcowi zmętnienia 3 w skali McFarlanda, ale nie więcej niż wzorcowi zmętnienia 5 w skali McFarlanda. W razie potrzeby worteksować, aby emulsyfikować. Po przygotowaniu zawiesiny panel należy inokulować w ciągu 15 minut.**

Inokulacja panelu

- Wyjąć panel z torebki foliowej i opisać go numerem próbki.
- Dodać 50 µL zawiesiny bakteryjnej do każdej studzienki zawierającej substraty oraz do dwóch studzienek kontrolnych (BNAC i NPC). Nie jest zalecane stosowanie do inokulacji pipety Pasteura.
- Po inokulacji panelu z 50 µL inokulum, lekko postukać każdy z boków panelu, aby pomóc w wymieszaniu substratu.

Nałożenie oleju biochemicznego

Nałożyć do studzienek mocznika (URE) i indolu (IND) 2–3 krople oleju mineralnego.

Inkubacja

- Ułożyć panele piętrowo w grupach od 3 do 5 z pokrywą panelu na górze panelu, aby zapobiec parowaniu.
- Inkubować inokulowane panele przez 4 godziny w temperaturze 35–37°C w inkubatorze niezawierającym CO₂.

Odczyt z paneli

- Wyjąć odczynnik peptydazowy z chłodziarki na co najmniej 30 minut przed odczytaniem paneli. Odczynnik peptydazowy może wytrącać się w temperaturze 4°C, ale ponownie rozpuści się w temperaturze pokojowej. Nie należy narażać odczynnika peptydazowego na podwyższone temperatury w celu szybszego rozpuszczenia osadu krystalicznego, ponieważ wysokie temperatury mogą spowodować degradację odczynnika.
- Panele należy odczytać przy użyciu światła odbitego od białego tła.

Tabela 1, Substraty

Substraty	Skrót	Substraty	Skrót
p-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd	BGAL	L-lizyno-β-naftyloamid (kwaśny)	LYA
p-nitrofenylo-α-D-galaktopiranozyd	AGAL	Glicyloglicyno-β-naftyloamid	GGLY

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** Podłoża nieselektywne zawierają TSA, Brucella, bulion mózgowo-sercowy lub agar Columbia, wszystkie z 5% krwi owczej.

Substraty	Skrót	Substraty	Skrót
bis-p-nitrofenylo-fosforan	BPO ₄	Glicyno-β-naftyloamid	GLY
p-nitrofenylo-N-acetylo-β-D-glukozaminid	NGLU	L-prolino-β-naftyloamid	PRO
p-nitrofenylo-α-D-glukopiranozyd	AGL	L-arginino-β-naftyloamid	ARG
o-nitrofenylo-β-D-glukopiranozyd	BGL	L-pirolidonylo-β-naftyloamid	PYR
p-nitrofenylo-fosforan	PO ₄	L-tryptofano-β-naftyloamid	TRY
p-nitrofenylo-α-L-fukopiranozyd	AFU	Fosforan 3-indoksylu	IDX
p-nitrofenylo-α-D-mannopiranozyd	MNP	Trehaloza	TRE
L-leucyno-β-naftyloamid	LEU	Mocznik	URE
DL-metionino-β-naftyloamid	MET	Indol	IND
L-lizyno-β-naftyloamid (zasadowy)	LYB	Azotan	NIT

- Po 4 godzinach inkubacji zapisać wyniki dla wszystkich substratów niewymagających dodatkowych odczynników: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE i TRE. Porównać BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, i MNP ze studzienką kontroli nitrofenylowej (NPC). Każdy odcień żółtego należy rejestrować jako wynik dodatni.
- Dodać 1 kroplę odczynnika peptydazowego do studzienek LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY i BNAC.
 - Umożliwić rozwój reakcji barwnej przez co najmniej 30 sekund, a następnie zarejestrować wyniki. Po dodaniu odczynników nie czekać dłużej niż 3 minuty przed zarejestrowaniem wyników. Obecność jakiegokolwiek odcienia od różowego lub czerwonego należy interpretować jako wynik dodatni. Barwa tych studzienek z czasem pociemnieje i dlatego ujemny kolor żółty może stać się ciemniejszym kolorem pomarańczowym, ale nadal należy interpretować to jako reakcję ujemną. Reakcje należy interpretować jako dodatnie **wyłącznie** wtedy, gdy występuje kolor różowy lub czerwony. Niektóre studzienki mogą mieć ciemniejszy kolor pomarańczowy w porównaniu ze studzienką kontrolną (BNAC), ale nadal należy je zarejestrować jako ujemne.
 - Po dodaniu odczynnika peptydazowego do studzienki kontroli β-naftyloamidowej (BNAC), studzienka powinna mieć barwę żółtą. Jeżeli występuje jakikolwiek kolor różowy lub czerwony, odczynnik peptydazowy należy odrzucić, aby zapobiec interpretacjom fałszywie dodatnim.
- W celu ułatwienia interpretacji reakcji, dostarczono dwie studzienki kontroli.
 - BNAC = kontrola β-naftyloamidu. Po dodaniu odczynnika peptydazowego studzienka ta powinna mieć kolor od żółtego do pomarańczowego.
 - NPC = kontrola nitrofenylowa. Ta studzienka powinna być bezbarwna.
- Dodać jedną kroplę ksyleny do studzienki indolu (IND). Za pomocą drewnianej wymazówki wymieszać zawartość studzienki IND. Dodać 1 kroplę odczynnika Ehrlicha. Odczytać po 2–3 minutach.
- Dodać 1 kroplę kwasu sulfanilowego do studzienki azotanu (NIT), a następnie 1 kroplę N,N-dimetylo-alfa-naftyloaminy. Odczytać po 2–3 minutach.
- Dodać 2–3 krople 3% nadtlenku wodoru do studzienki BGAL. Odczekać 2–5 minut przed zarejestrowaniem wyniku. Reakcja dodatnia jest wskazana przez tworzenie dużych pęcherzyków.

WYNIKI

1. Tabela interpretacji biochemicznej

substrat	Odczynniki	Dodatni	Ujemny
BGAL AGAL BPO ₄ NGLU AGL BGL PO ₄ ¹ AFU MNP	Porównać ze studzienką kontroli nitrofenylu (NPC)	Dowolny odcień żółtego	Przezroczysty
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	Dodać 1 kroplę odczynnika peptydazowego. Umożliwić rozwój reakcji barwnej przez co najmniej 30 sekund, ale nie dłużej niż przez 3 minuty. Studzienka kontroli β-naftyloamidu (BNAC) powinna być żółta.	Dowolny odcień od różowego do magenty	Od żółtego do pomarańczowego

substrat	Odczynniki	Dodatni	Ujemny
IDX		Niebieskie zabarwienie / niebieski osad	Przezroczysty
TRE		Żółty	Pomarańczowy/czerwony
URE		Różowo-czerwony	Żółty-pomarańczowy
IND	Dodać 1 kroplę ksylenu, wymieszać, dodać 1 kroplę odczynnika Ehrlicha. Odczytać po 2–3 minutach.	Różowy	Żółty/przezroczysty
NIT	Dodać 1 kroplę 0,8% kwasu sulfanilowego i 0,5% N,N-dimetylo-alfa-naftyloaminy. Odczytać po 2–3 minutach.	Czerwony	Od przezroczystego do bladoróżowego
Katalaza	Dodać 2–3 krople 3% nadtlenu wodoru do studzienki BGAL. Odczekać 2–3 min, aby powstały pęcherzyki.	Duże pęcherzyki	Brak pęcherzyków (lub bardzo niewiele niewielkich pęcherzyków / takie same pęcherzyki we wszystkich studzienkach).

1. Ujemna reakcja PO₄ może być od przezroczystej do bardzo jasnożółtej.

2. Zasady reakcji identyfikacyjnych

Substraty nitrofenylowe (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): substraty orto- lub para-nitrofenylowe są bezbarwne. Jeżeli obecny jest odpowiedni enzym, substrat jest rozszczepiany uwalniając wolny o- lub p-nitrofenyl, który jest żółty.

Aminokwasowe substraty β-naftyloamidowe (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): gdy substraty są hydrolizowane za pomocą odpowiedniego enzymu (zazwyczaj arylamidaza aminokwasu), uwalniany jest β-naftyloamid. β-naftyloamid jest wykrywany przez dodanie aldehydu p-dimetyloaminocynamonowego (w odczynniku peptydazowym), co tworzy kompleks, który ma barwę od różowej do purpurowej.

UWAGA: enzym, który rozszczepia β-naftyloamid aminokwasu to arylamidaza aminokwasowa. Określenie „aminopeptydaza” jest często stosowane jako synonim dla arylamidazy, ale faktycznie oznacza enzym o innej swoistości (aminopeptydaza rozszczepia N-końcowy aminokwas peptydu). Arylamidaza i aminopeptydaza mogą hydrolizować ten sam substrat β-naftyloamidu aminokwasu. Dlatego panel nie musi koniecznie oznaczać różnych i unikatowych enzymów. Pojedyncza arylamidaza może hydrolizować kilka β-naftyloamidów aminokwasów.

Fosforan indoksyli (IDX): fosforan indoksyli jest rozszczepiany przez fosfatazę uwalniając indoksyli. Indoksyli łączy się z tlenem tworząc błękit indygo, który jest nierozpuszczalnym niebieskim lub niebieskozielonym osadem.

Trehaloza (TRE): wykorzystanie trehalozy powoduje tworzenie kwasu i dalszy spadek pH, który jest wykrywany za pomocą wskaźnika czerwieni fenolowej zmieniającego kolor z pomarańczowego na żółty.

Mocznik (URE): jest rozszczepiany przez ureazę tworząc amoniak i ditlenek węgla. Amoniak (w postaci węglanu amonu) powoduje wzrost pH, co jest wykrywane przez wskaźnik czerwieni fenolowej zmieniający kolor z żółtego na różowy.

Indol (IND): metabolizm tryptofanu powoduje tworzenie indolu. Ksylen ekstrahuje indol z bulionu i zagęszcza go. Odczynnik Ehrlicha reaguje z indolem dając różowy kolor.

Azotan (NIT): Zdolność drobnoustroju do redukcji azotanu do azotynu jest wykrywana poprzez dodanie kwasu sulfanilowego, a następnie N,N-dimetylo-alfa-naftyloaminy, co powoduje czerwone zabarwienie w obecności azotynu.

Katalaza rozszczepia nadtlenek wodoru na wodę i gazowy tlen, który jest uwalniany jako pęcherzyki.

IDENTYFIKACJA MIKROORGANIZMU

Książka kodów szybkiego biotypu beztlencowców MicroScan służy do identyfikacji nieznanego drobnoustroju badanych. Ta książka kodów została wygenerowana z bazy danych firmy Beckman Coulter dla testów zawartych w panelu identyfikacji.

Książka kodów szybkiego biotypu beztlencowców MicroScan opiera się na analizie komputerowej 24 testów w panelu do szybkiej identyfikacji beztlencowców. Wyniki testu są przekształcane do 8-cyfrowego „numeru biotypu”, dla którego książka kodów wymienia identyfikację gatunków i zbiorcze względne prawdopodobieństwo identyfikacji. Wszystkie możliwe identyfikacje są drukowane w porządku malejącym najwyższego prawdopodobieństwa do łącznie 99,9%. Jeśli numer biotypu nie występuje w książce kodów, należy podejrzewać błąd procedury. Zazwyczaj numer biotypu dodano nieprawidłowo lub reakcja została błędnie zarejestrowana. Jeżeli numer biotypu jest prawidłowy, należy sprawdzić możliwość wymieszania hodowli i drobnoustrojów należy ponownie zbadać ze szczególnym naciskiem na stosowanie wystarczająco mętnej zawiesiny

komórkowej. Jeżeli ponowne oznaczenia prowadzą do tych samych wyników, należy skonsultować się z serwisem Biotype Lookup (Wyszukiwanie biotypu) dostępnym na stronie internetowej Beckman Coulter lub z lokalnym dystrybutorem.

OGRANICZENIA METODY

1. Badane drobnoustroje powinny być hodowane na podłożach nieselektywnych, takich jak TSA, Brucella, bulion mózgowo-sercowy lub agar Columbia, wszystkie z 5% krwią owczą. Nie powinny być stosowane podłoża selektywne, zawierające antybiotyki, tj. LKV (kanamycyna/wankomycyna), agar *Bacteroides* Bile Esculin (BBE), alkohol fenyloetylowy (PEA) itd.
2. Zmętnienie zawiesiny drobnoustroju musi być równe co najmniej wzorcowi zmętnienia 3 w skali McFarlanda, ale nie więcej niż wzorcowi zmętnienia 5 w skali McFarlanda. Jeżeli badana zawiesina drobnoustroju wykazuje zmętnienie mniejsze niż 3 w skali McFarlanda, mogą wystąpić reakcje słabe lub fałszywie ujemne.
3. Panel do szybkiej identyfikacji beztlenowców jest opracowany do identyfikacji jedynie bakterii beztlenowych. Przed badaniem każdy drobnoustrój należy zbadać pod kątem tolerancji tlenu, czystości, barwienia Grama i morfologii kolonii. Jeżeli dla określonego numeru biotypu ma być wymieniona identyfikacja więcej niż jednego gatunku, do prawidłowej identyfikacji mogą być konieczne testy uzupełniające.
4. Nie wszystkie gatunki beztlenowe napotkane w sytuacjach klinicznych są uwzględnione w bazie danych szybkiego panelu beztlenowców. Gatunki identyfikowane w szybkim panelu beztlenowców są wymienione w książce kodów szybkiego biotypu beztlenowców. Identyfikacje beztlenowców powinny być skorelowane z barwieniem Grama lub innymi pomocniczymi testami diagnostycznymi. Użytkownik powinien skonsultować piśmiennictwo źródłowe z tymi testami i również pod kątem bieżącej nomenklatury bakteriologicznej.
5. Panel MicroScan do szybkiej identyfikacji beztlenowców nie został dopuszczony przez FDA do stosowania z systemami analizatorów MicroScan. Panel ten musi być odczytywany ręcznie.

KONTROLA JAKOŚCI

Dopuszczalność podłoży identyfikacyjnych MicroScan do szybkiej identyfikacji beztlenowców należy sprawdzać przez badanie drobnoustrojów za pomocą znanych reakcji. Reakcje ujemne można osiągnąć przez ponowne nawodnienie panelu 50 µL autoklawowanej wody dejonizowanej. Wszystkie substraty powinny być ujemne, jak opisano w tabeli interpretacji. Czystość hodowli należy sprawdzać przy użyciu hodowli podrzędnej z zawiesiny stosowanej jako inokulum na odpowiednich podłożach agarowych. Jeżeli wykryta zostanie hodowla mieszana, wyniki testu są nieważne (zobacz Tabela 2).*

Tabela 2

Tabela kontroli jakości

Substraty	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
KATALAZA	–	–	+	–

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA.

*Wyniki dla każdej reakcji zalecanych drobnoustrojów kontrolnych Amerykańskiej Kolekcji Typów Kultur (ATCC) są przedstawione w tabeli kontroli jakości.

2. W celu uzyskania optymalnych wyników hodowla *C. perfringens* powinna mieć jedynie 24 godziny.

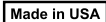
CHARAKTERYSTYKA TESTU

W badaniach klinicznych wykorzystujących drobnoustroje beztlenowe reprezentujące różnorodny zbiór niedawnych izolatów klinicznych, szybki panel do identyfikacji beztlenowców prawidłowo identyfikował 92% izolatów.

Legenda symboli

Legenda symboli			
Symbol	Nazwa symbolu	Opis normy	Standard
	Nie używać ponownie	Wskazuje, że urządzenie medyczne jest przeznaczone do jednorazowego użytku lub do użycia u jednego pacjenta podczas jednego zabiegu.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Termin ważności	Wskazuje datę, po upływie której urządzenie medyczne nie nadaje się do użytku.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Kod partii	Wskazuje kod partii producenta, dzięki któremu można zidentyfikować partię lub serię.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Numer katalogowy	Wskazuje numer katalogowy producenta, dzięki któremu można zidentyfikować urządzenie medyczne.	ISO 15223-1, punkt 5.1.6
	Producent	Wskazuje producenta urządzenia medycznego zgodnie z definicjami podanymi w dyrektywach UE 90/385/EWG, 93/42/EWG i 98/79/WE.	ISO 15223-1, punkt 5.1.1
	Data produkcji	Wskazuje datę produkcji urządzenia medycznego.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej	Wskazuje autoryzowanego przedstawiciela we Wspólnocie Europejskiej.	ISO 15223-1, punkt 5.1.2
	Wystarczy na wykonanie <n> testów	Wskazuje całkowitą liczbę testów IVD, które można przeprowadzić za pomocą danego testu IVD. (Zazwyczaj umieszczone na zestawach odczynników).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Diagnostyczne urządzenie medyczne do badań <i>in vitro</i>	Wskazuje urządzenie przeznaczone do stosowania jako urządzenie medyczne do diagnostyki <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, punkt 5.5.1
	Ograniczenia temperatury	Wskazuje granice temperatury, do jakich można bezpiecznie używać urządzenia medycznego.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Zapoznać się z instrukcją użycia	Wskazuje konieczność zapoznania się z instrukcją użycia.	ISO 15223-1; 5.4.3
	Znak CE	Znak zgodności z normami Unii Europejskiej	ND.
	Zawartość	ND.	ND.
	Zawartość (opakowania)	Środek przeciwbakteryjny (skrót)	ND.
	Zawartość (opakowania)	Substrat identyfikacyjny (skrót)	ND.

Legenda symboli

Symbol	Nazwa symbolu	Opis normy	Standard
	Karta Charakterystyki Bezpieczeństwa	Wskazuje kartę charakterystyki substancji.	ND.
	Made in USA	ND.	ND.
	Wyłącznie do zastosowania eksportowego	ND.	ND.
	Objętość do przygotowania	ND.	ND.
	Delikatne elementy. Obchodzić się ostrożnie.	Wskazuje urządzenie medyczne, które może złamać się lub zostać uszkodzone, jeżeli nie będzie obsługiwane ostrożnie.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Tą stroną do góry	Wskazuje prawidłową pozycję pionową	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices - Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements. (ISO 15223-1: Urządzenia medyczne — Symbole do stosowania na etykietach wyrobów medycznych, w ich oznakowaniu i w dostarczanych z nimi informacjach — Część 1: Wymagania ogólne).			

Beckman Coulter, stylizowane logo oraz wymienione tu znaki produktów i usług firmy Beckman Coulter są znakami towarowymi lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Beckman Coulter, Inc. w Stanach Zjednoczonych i innych krajach.

MicroScan

신속 혐기성균 ID 절차 설명서

[REF] B1017-2

사용목적

MicroScan 신속 혐기성균 동정 패널은 사람 임상 표본에서 분리한 혐기성 세균을 신속히 동정하도록 설계되었습니다.

요약 및 원리

변형된 기존 검사 및 발색 검사는 혐기성 세균 동정에 사용됩니다.^{1,2,3,4,5,6,7} 검사할 균의 McFarland 3 현탁액은 가압 멸균 처리한 탈이온수로 만듭니다. 24개의 탈수 기질로 구성된 MicroScan 신속 혐기성균 동정 패널은 세균 현탁액으로 재수화 및 접종되며 35~37°C에서 4시간 동안 호기성으로 배양됩니다. MicroScan 신속 혐기성균 동정 패널은 미리 형성된 효소를 검출하므로 패널 내 균의 성장은 필요하지 않습니다. 배양 후에는 동정을 위해 pH의 변화, 특정 기질의 이용 또는 다른 생화학적 반응을 해석합니다.

경고 및 주의 사항

1. MicroScan 신속 혐기성균 동정 패널 및 시약은 체외 진단 용도로만 사용하십시오.
2. 펩티다아제 시약, 에를리히 시약, 자일렌 또는 동정 기질이 눈, 피부, 옷에 닿아서는 안 됩니다.
3. 모든 절차를 진행하는 동안 미생물학적 위험을 방지하기 위한 무균 기법과 확립된 예방 조치를 준수하고, 접종된 패널에 병원성균이 있을 수 있음을 특히 주의하십시오.
4. 모든 물질은 폐기하기 전에 가압 멸균해야 합니다.

보관

패널과 시약을 2~8°C에 보관합니다.

GHS 유해물질 등급

유해물질로 분류되지 않음

[SDS] 안전보건자료는 techdocs.beckmancoulter.com에서 확인할 수 있습니다

검체 수집 및 준비

V.P.I., *Anaerobe Laboratory Manual*(혐기성균 취급 실험실 설명서),² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual*(*Wadsworth 혐기성 세균 설명서*),⁸ C.D.C.(미국 질병통제예방센터)의 *Laboratory Methods in Bacteriology*(세균학 실험실 방법),⁹ 및 *Manual of Clinical Microbiology*(임상 미생물학 설명서)에서 권장하는 절차에 따라 정상 혐기성균총이 없는 적절한 표본을 채취하고 운반하며 일차 분리 배지에 놓아야 합니다.¹⁰

참고: LKV(카나마이신/반코마이신) 또는 *Bacteroides* 담즙 에스쿨린(BBE) 한천, 페닐에틸 알콜(PEA) 등의 항생제가 포함된 선택성 배지의 집락을 사용하여 패널 접종을 준비해서는 안 됩니다.

제공되는 품목

신속 혐기성균 동정 패널(B1017-2)

워크시트 20장

절차 설명서

필요하지만 제공되지 않는 품목

미네랄 오일(B1010-40)

커버 트레이(B1010-56B)

펩티다아제 시약(B1012-30B)

0.5% N, N-디메틸-알파-나프틸아민(B1010-45A)

0.8% 설파닐산(B1010-44A)

에를리히 시약(B1015-6)

자일렌(B1015-5)

50µL 피펫터(멸균 팁 포함)

과산화수소, 3%

접종물 희석액, 3mL 가압 멸균 처리한 탈이온수(B1015-2)

끝이 멸균 면봉인 어플리케이터 또는 멸균 접종 루프

목재 어플리케이터

3, 4 및 5 McFarland 바륨 황산염 혼탁도 표준액

Vortex 믹서

배양기, 비-CO₂(35°C)

정도관리균:

C. perfringens ATCC 13124*

C. Sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

절차

패널 준비

1. 냉장고에서 패널을 꺼냅니다. **패널은 건조제가 없거나 파손된 경우 또는 포장 손상(개봉되어 있거나 구멍이 났거나 찢어짐)이 있을 경우 사용하지 마십시오.**
2. 파우치를 잘라 개봉하여 패널을 꺼냅니다. 포일 파우치에서 즉시 패널을 제거합니다. 재수화하기 전에 패널의 온도를 실온과 동일하게 하십시오. 깨끗한 커버 트레이를 위에 놓고 패널을 쌓을 수 있습니다.

접종물 준비

1. 패널 접종 전에 검사할 균의 순도, 산소내성, 그람 염색 반응 및 집락 형태를 관찰해야 합니다.
2. 멸균 면봉 어플리케이터 또는 접종 루프를 사용하여 3mL의 접종물 희석액(가압 멸균 처리한 탈이온수) 튜브에서 비선택성 배지의 24~48시간 배양액에서 얻은 충분한 집락을 현탁하여 적어도 McFarland 3 표준액과 동등하나 McFarland 5 표준액을 초과하지 않는 혼탁한 현탁액을 만듭니다. 필요한 경우 흔들어 유화시킵니다. 현탁액이 준비되면 패널을 15분 이내에 접종해야 합니다.**

패널 접종

1. 포일 파우치에서 패널을 꺼내고 패널에 표본 번호를 라벨링합니다.
2. 기질이 포함된 각 웰과 두 개의 정도관리물질 웰(BNAC, NPC)에 세균 현탁액 50μL을 추가합니다. 접종에는 파스퇴르 피펫을 사용하지 않는 것이 좋습니다.
3. 패널을 50 μL 접종물로 접종한 후에 패널 양쪽을 가볍게 두드려 기질과 잘 섞이도록 합니다.

생화학적 오일 오버레이

요소(URE)와 인돌(IND) 웰에 미네랄 오일 2~3방울을 얇게 덮습니다.

배양

1. 증발을 막기 위해 상단 패널 위에 커버 패널을 올려서 3~5개씩 패널을 쌓습니다.
2. 접종된 패널은 비-CO₂ 배양기에서 35~37°C로 4시간 배양합니다.

패널 판독

1. 패널을 판독하기 최소 30분 전에 냉장고에서 펩티다아제 시약을 꺼냅니다. 펩티다아제 시약은 4°C에서 침전시킬 수 있으나 실온에서 다시 용해해야 합니다. 결정형 침전물을 빠르게 재용해하기 위해 펩티다아제 시약을 높은 온도에 노출하지 마십시오. 고온에 노출되면 시약이 분해됩니다.
2. 패널은 흰색 배경에 반사광을 비춰서 판독해야 합니다.

표 1, 기질

기질	약어	기질	약어
p-니트로페닐-β-D-갈락토피라노시드	BGAL	L-리신-β-나프틸아민(산성)	LYA
p-니트로페닐-α-D-갈락토피라노시드	AGAL	글리실글리신-β-나프틸아민	GGLY
비스-p-니트로페닐 인산염	BPO ₄	글리신-β-나프틸아민	GLY
p-니트로페닐-N-아세틸-β-D-글루코사미니드	NGLU	L-프롤린-β-나프틸아민	PRO
p-니트로페닐-α-D-글루코피라노시드	AGL	L-아르기닌-β-나프틸아민	ARG
O-니트로페닐-β-D-글루코피라노사이드	BGL	L-피롤리도닐-β-나프틸아미드	PYR
p-니트로페닐 인산염	PO ₄	L-트립토판-β-나프틸아민	TRY
p-니트로페닐-α-L-푸코피라노시드	AFU	3-인독실 인산염	IDX
p-니트로페닐-α-D-만노피라노시드	MNP	트레할로스	TRE
L-류신-β-나프틸아민	LEU	요소	URE
DL-메티오닌-β-나프틸아민	MET	인돌	IND
L-리신-β-나프틸아민(알칼리)	LYB	질산염	NIT

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** 비선택성 배지에는 TSA, Brucella, 뇌심장침출액 또는 콜럼비아 한천(Columbia agar)이 포함되며 모두 5% 양 혈액이 함유되어 있습니다.

3. 배양 4시간 후 추가 시약이 필요하지 않은 모든 기질(BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE 및 TRE)의 결과를 기록합니다. BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU 및 MNP를 니트로페닐 정도관리물질 (NPC) 웰과 비교합니다. 노란색은 색조를 불문하고 모두 양성으로 기록해야 합니다.
4. 펩티다아제 시약 1방울을 LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY 및 BNAC 웰에 첨가합니다.
 - A. 30초 이상 색상이 발현되기를 기다렸다가 결과를 기록합니다. 결과를 기록하기 전에 시약을 첨가한 후 3분 이상 기다리지 마십시오. 분홍색 또는 빨간색이 조금이라도 나타나면 양성으로 해석합니다. 웰에 나타난 색은 시간이 지나면서 어두워지므로 음성 노란색은 어두운 주황색이 될 수 있지만 이는 여전히 음성 반응으로 해석해야 합니다. 분홍색 또는 빨간색이 나타나는 경우에만 반응을 양성으로 기록해야 합니다. 일부 웰은 정도관리물질 웰 (BNAC)보다 어두운 주황색으로 보일 수 있지만 여전히 음성으로 기록해야 합니다.
 - B. 펩티다아제 시약을 β-나프틸아민 정도관리물질 웰(BNAC)에 첨가한 후에는 해당 웰이 노란색이어야 합니다. 분홍색 또는 빨간색이 나타나는 경우 위양성 해석을 방지하기 위해 펩티다아제 시약을 폐기해야 합니다.
5. 두 개의 컨트롤 웰을 준비하여 반응 해석을 돕습니다.
 - A. BNAC = β-나프틸아민 정도관리물질. 펩티다아제 시약을 추가한 후 웰 색깔은 노란색에서 주황색이어야 합니다.
 - B. NPC = 니트로페닐 정도관리물질. 이 웰은 무색이어야 합니다.
6. 자일렌 1방울을 인돌(IND) 웰에 첨가합니다. 목재 어플리케이터로 IND 웰의 내용물을 잘 저어줍니다. 에를리히 시약을 1방울 첨가합니다. 2~3분 후 판독합니다.
7. 설파닐산 1방울을 질산염(NIT) 웰에 첨가한 후 N, N-디메틸-알파-나프틸아민 1방울을 첨가합니다. 2~3분 후 판독합니다.
8. 3% 과산화수소 2~3방울을 BGAL 웰에 첨가합니다. 2~5분간 기다렸다가 결과를 기록합니다. 양성 반응은 큰 기포 형식으로 나타납니다.

결과

1. 생화학적 해석 차트

기질	시약	양성	음성
BGAL AGAL BPO ₄ NGLU AGL BGL PO ₄ ¹ AFU MNP	니트로페닐(NPC) 정도관리물질 웰과 비교	조금이라도 노란색이 보임	투명
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	펩티다아제 시약 1방울을 추가합니다. 색상이 반응이 일어날 때까지 최소 30초 이상 기다리 되, 3분을 넘기지 마십시오.	분홍색에서 자 주색 발현	노란색 - 주황 색
IDX	β-나프틸아민(BNAC) 정도관리물질 웰은 노 란색이어야 합니다.	파란색/파란 침전물	투명
TRE		노란색	주황색/빨간색
URE		분홍색, 빨간색	노란색, 주황색
IND	자일렌 1방울을 첨가하고 저은 후 에를리히 시 약 1방울을 첨가합니다. 2~3분 후 판독합니다.	분홍색	노란색/투명
NIT	0.8% 설파닐산 1방울과 0.5% N, N-디메틸- 알파-나프틸아민 1방울을 첨가합니다. 2~3 분 후 판독합니다.	빨간색	투명 - 연분홍 색
카탈라아제	3% 과산화수소 2~3방울을 BGAL에 첨가합니 다. 거품이 형성될 때까지 2~3분간 기다립니다.	큰 기포	기포 없음(또 는 작은 기포 거의 없음/모 든 웰에서 동일 한 양.)

1. 음성 PO₄ 반응은 무색(투명)에서 매우 연한 노란색일 수 있습니다.

2. 동정 반응 원리

니트로페닐 기질(BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): 오르토 또는 파라-니트로페놀 기질은 무색입니다. 적절한 효소가 있는 경우 기질이 쪼개져 유리 o- 또는 p-니트로페닐이 나오며 노란색으로 표시됩니다.

아미노산 β-나프틸아민 기질(LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): 기질을 적절한 효소(보통 아미노산 아릴아미다제)로 가수분해하면 β-나프틸아민이 나옵니다. β-나프틸아민은 p-디메틸아미노시남알데히드(펩티다아제 시약에 포함)를 첨가하여 검출하고, 이때 분홍색에서 보라색을 띠는 복합체가 생성됩니다.

참고: 아미노산 β-나프틸아민을 쪼개는 효소는 아미노산 아릴아미다제입니다. ‘아미노펩티다아제’라는 용어는 주로 아릴아미다제의 동의어로 사용되지만 실제로는 특이도가 다른 효소(펩티드에서 N-말단 아미노산을 쪼개는 아미노펩티다아제)를 나타냅니다. 아릴아미다제와 아미노펩티다아제는 동일한 아미노산 β-나프틸아민 기질을 가수분해할 수 있습니다. 따라서 이 패널은 다른 효소와 고유한 효소를 측정하지 않을 수도 있습니다. 하나의 아릴아미다제가 여러 아미노산 β-나프틸아민을 가수분해할 수도 있습니다.

인독실 인산염(IDX): 인독실 인산염은 포스파타아제로 쪼개져 인독실을 내보냅니다. 인독실은 산소와 결합하여 남색을 나타냅니다. 이는 불용성 파란색 또는 청녹색 침전물이 됩니다.

트레할로스(TRE): 트레할로스를 사용하면 pH가 감소하고 산이 형성되며 이는 페놀 레드 지시약이 주황색에서 노란색으로 변함에 따라 검출됩니다.

요소(URE): 요소는 우레아제로 쪼개져 암모니아와 이산화탄소를 형성합니다. 암모니아(탄산암모늄 형태)는 pH를 높이며, 이는 페놀 레드 지시약이 노란색에서 분홍색으로 변함에 따라 검출됩니다.

인돌(IND): 트립토판이 대사를 거치면 인돌을 생성합니다. 자일렌은 액체 배지에서 인돌을 추출하여 농축합니다. 에를리히 시약은 인돌과 반응하여 분홍색을 형성합니다.

질산염(NIT): 균이 질산염을 아질산염으로 환원시키는 능력은 아질산염이 있을 때 빨간색을 나타내는 설파닐산 및 N, N-디메틸-알파-나프틸아민을 첨가할 때 검출됩니다.

카탈라아제는 과산화수소를 물과 산소 가스로 분해하며 가스는 거품처럼 나옵니다.

균 동정

MicroScan 신속 혐기성균 바이오타입 코드 일람은 알 수 없는 검사 대상 균의 동정에 사용됩니다. 이 코드 일람은 동정 패널에 포함된 검사를 위해 Beckman Coulter의 데이터베이스에서 생성했습니다.

MicroScan 신속 혐기성균 코드 일람은 신속 혐기성균 동정 패널에 포함된 24개 검사의 컴퓨터 분석 결과에 기초합니다. 검사 결과는 8자리 ‘바이오타입 번호’로 변환되며, 코드 일람에는 중 동정과 동정의 누적 상대 확률이 기재되어 있습니다. 가능한 모든 동정은 확률이 가장 높은 동정부부터 내림차순으로 인쇄되어 누적 확률이 99.9%가 됩니다. 코드 일람에서 찾을 수 없는 바이오타입 번호가 나타날 경우 먼저 절차에 오류가 있는지 의심해야 합니다. 일반적으로 바이오타입 번호가 잘못 추가되었거나 반응이 잘못 기록되었을 수 있습니다. 바이오타입 번호가 올바른 경우 배양액이 혼합되었는지 확인하고 세포 현탁액을 충분히 현탁하는 데 특별히 주의하여 균을 다시 검사해야 합니다. 재검 시 같은 결과가 나오면 Beckman Coulter 웹사이트의 Biotype Lookup Service를 이용하거나 현지 판매자에게 문의하십시오.

사용의 제약조건

1. 검사할 균은 TSA, Brucella, 뇌심장침출액 또는 콜럼비아 한천 등 모두 5% 양 혈액이 함유된 비선택적 배지에서 배양해야 합니다. LKV(카나마이신/반코마이신) 또는 *Bacteroides* 담즙 에스쿨린(BBE) 한천, 페닐에틸 알콜(PEA) 한천 등의 항생제가 포함된 선택성 배지는 사용하지 않아야 합니다.
2. 균 현탁액의 혼탁도는 적어도 McFarland 3 표준액과 동등해야 하나 McFarland 5 표준액을 초과하지 않아야 합니다. 검사할 균 현탁액의 혼탁도가 McFarland 3 표준액보다 적은 경우 약한 반응 또는 위음성 반응이 나타날 수 있습니다.
3. 신속 혐기성균 동정 패널은 혐기성 세균만 동정하도록 설계되었습니다. 검사 전에 각 균의 산소내성, 순도, 그람 염색 반응 및 집락 형태를 검사해야 합니다. 특정 바이오타입 번호에 2개 이상의 중 동정이 있을 경우 정확한 동정을 위해 추가적인 검사가 필요할 수 있습니다.
4. 임상적 상황에서 발견되는 모든 혐기성균 종이 신속 혐기성균 데이터베이스에 포함되어 있는 것은 아닙니다. 신속 혐기성균 패널에서 동정된 종은 신속 혐기성균 바이오타입 코드 일람에 나와 있습니다. 혐기성균 동정은 그람 염색 및 근거가 되는 다른 진단적 검사와 상호 관계가 있어야 합니다. 사용자는 이러한 검사 및 현재 세균 명명법에 대한 최신 참고 문헌을 참조해야 합니다.
5. MicroScan 신속 혐기성균 동정 패널은 MicroScan 장비 시스템과 함께 사용하도록 FDA에 명시되지 않았습니다. 이 패널은 수동으로 판독해야 합니다.

정도관리

알려진 반응으로 균을 검사하여 MicroScan 신속 혐기성균 동정 배지의 수용 가능성을 확인해야 합니다. 가압 멸균 처리한 탈이온수 50μL로 패널을 재수화하여 음성 반응을 얻을 수 있습니다. 모든 기질은 해석 차트에 설명된 대로 음성이어야 합니다. 배양 순도는 접종물로 사용된 현탁액에서 적절한 한천 배지로 2차 배양하여 확인해야 합니다. 혼합된 배양액이 검출된 경우 검사 결과는 유효하지 않습니다(표 2 참조).*

*권장 미국 중균 협회, ATCC 정도관리균에 대한 각 반응 결과는 정도관리 차트에 나열되어 있습니다.

표 2
정도관리 차트

기질	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
카탈라아제	–	–	+	–

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA USA.
2. 최적의 결과를 위해 *C. perfringens*는 24 시간만 배양해야 합니다.

성능 특성

다양한 최신 임상적 분리주를 대표하는 혐기성균을 사용하는 임상 시험에서 신속 혐기성균 동정 패널은 분리주의 92%를 정확하게 동정했습니다.

기호 목록

기호 목록			
기호	기호 제목	표준 설명	표준
	재사용 금지	일회용이거나 한 번 시술 시 한 명의 환자에만 사용 가능한 의료 기기임을 나타냅니다.	ISO 15223-1; 5.4.2
	사용 기한	이 날짜가 지나면 의료기기를 더 이상 사용할 수 없습니다.	ISO 15223-1; 5.1.4
	배치 코드	배치나 로트를 식별할 수 있는 제조업체의 일련번호를 나타냅니다.	ISO 15223-1; 5.1.5
	카탈로그 번호	의료 기기를 식별할 수 있는 제조업체의 카탈로그 번호를 나타냅니다.	ISO 15223-1, 제 5.1.6항
	제조업체	EU 지침 90/385/EEC, 93/42/EEC 및 98/79/EC에 정의된 의료 기기 제조업체임을 나타냅니다.	ISO 15223-1, 제 5.1.1항
	제조일	의료 기기가 제조된 날짜를 나타냅니다.	ISO 15223-1; 5.3.1
	유럽공동체 위임 대표	유럽연합(EU) 대리점을 나타냅니다.	ISO 15223-1, 제 5.1.2항

기호 목록

기호	기호 제목	표준 설명	표준
	<n>회 검사에 충분한 양 포함	IVD로 수행 가능한 IVD 검사의 총 횟수를 나타냅니다. (일반적으로 시약 키트에 포함됨).	ISO 15223-1; 5.5.5
	체/외 진단 의료 기기	체/외 진단용으로 사용되는 의료 기기임을 나타냅니다.	ISO 15223-1, 제 5.5.1항
	온도 한계	의료기기를 안전하게 노출시킬 수 있는 온도 한도를 나타냅니다.	ISO 15223-1; 5.3.7
	사용 안내 참조	사용 안내를 참조해야 함을 나타냅니다.	ISO 15223-1; 5.4.3
	CE 표시	유럽 적합성 규정 마크	해당 없음
	내용물	해당 없음	해당 없음
	내용물 (패키지)	항균제 (약어)	해당 없음
	내용물 (패키지)	동정 기질 (약어)	해당 없음
	안전보건자료	안전보건자료를 나타냅니다.	해당 없음
	Made in USA	해당 없음	해당 없음
	수출용	해당 없음	해당 없음
	조제 용량	해당 없음	해당 없음
	깨지기 쉬움, 취급 주의	조심스럽게 취급하지 않으면 의료 기기가 파손되거나 손상될 수 있음을 나타냅니다.	ISO 15223-1; 5.3.1
	이 쪽이 윗면	올바르게 똑바로 세웠을 때의 위치를 나타냅니다.	ISO 7000: 0623

ISO 15223-1: Medical Devices - Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements(ISO 15223-1: 의료 기기 – 의료 기기 라벨용 기호, 제공할 라벨과 정보. 제 1부: 일반 요건).

본 문서에 포함된 Beckman Coulter, 스타일 로고, Beckman Coulter 제품 및 서비스 마크는 미국 및 기타 국가에서 Beckman Coulter, Inc.의 상표이거나 등록 상표입니다.

MicroScan

Hızlı Anaerob Tanımlama Prosedür Kılavuzu

REF B1017-2

KULLANIM AMACI

MicroScan Hızlı Anaerob Tanımlama paneli, insan klinik numunelerinden izole edilen anaerobik bakterilerin hızlı tanımlanması için tasarlanmıştır.

ÖZET VE PRENSİP

Anaerobik bakterilerin tanımlaması için modifiye konvansiyonel ve kromojenik testler kullanılır.^{1,2,3,4,5,6,7} Test edilecek organizmanın McFarland 3 süspansiyonu, otoklavlanmış deiyonize su içinde yapılır. 24 dehidrasyon uygulanmış substrat içeren MicroScan Hızlı Anaerob Tanımlama Paneli rehidre edilir ve bakteriyel süspansiyon ile inoküle edilir ve 35-37°C'de 4 saat boyunca aerobik olarak inkübe edilir. MicroScan Hızlı Anaerob Tanımlama Paneli önceden oluşturulmuş enzimleri tespit ettiğinden paneldeki organizmanın üremesi gerekli değildir. İnkübasyondan sonra pH'taki değişiklikler, belirli substratların kullanılması veya diğer biyokimyasal reaksiyonlar, tanımlama için yorumlanır.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. MicroScan Hızlı Anaerob Tanımlama panelleri ve reaktifleri yalnızca *in vitro* diagnostik kullanım içindir.
2. Peptidaz Reaktifi, Ehrlich Reaktifi, Ksilen veya tanımlama substratlarından herhangi birinin göz, cilt veya giysilerle temas etmesine izin vermeyin.
3. Tüm prosedürler boyunca, inokülasyon uygulanmış panellerin potansiyel olarak patojenik organizmalar içerdiği konusunda özel bir hassasiyetle mikrobiyolojik tehlikelere yönelik aseptik tekniklere ve belirlenmiş önlemlere uyun.
4. Tüm materyaller atılmadan önce otoklavlanmalıdır.

SAKLAMA

Panelleri ve reaktifleri 2-8°C'de saklayın.

GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

Tehlikeli olarak sınıflandırılmamıştır

SDS Güvenlik Bilgi Formuna techdocs.beckmancoulter.com adresinden ulaşılabilir

NUMUNELERİN TOPLANMASI VE HAZIRLANMASI

Normal anaerobik floradan yoksun olan uygun numuneler V.P.I., *Anaerobe Laboratory Manual (Anaerob Laboratuvar Kılavuzu)*,² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual (Wadsworth Anaerobik Bakteriyel Kılavuz)*,⁸ *C.D.C. Laboratory Methods in Bacteriology (Bakteriyoloji Laboratuvar Yöntemleri)*⁹ ve *Manual of Clinical Microbiology'de (Klinik Mikrobiyolojik Kılavuzu)* önerilen prosedürlere göre toplanmalı, nakledilmeli ve primer izolasyon ortamlarına yerleştirilmelidir.¹⁰

NOT: Antibiyotik, yani, LKV (Kanamisin/Vankomisin) veya *Bakteroidler* Safra Eskulin (BBE) agarı, Feniletıl Alkol (PEA) vs. içeren selektif ortamdaki koloniler, paneller için inokülüm hazırlamak için kullanılmamalıdır.

SAĞLANAN MALZEMELER

Hızlı Anaerob Tanımlama Paneli (B1017-2)

20 Çalışma Sayfası

Prosedür Kılavuzu

GEREKLİ OLAN ANCAK SAĞLANMAYAN MALZEMELER

Mineral Yağı (B1010-40)

Panel Kapağı (B1010-56B)

Peptidaz Reaktifi (B1012-30B)

%0,5 N, N-Dimetil-Alfa-Naftilamin (B1010-45A)

%0,8 Sülfanilik Asit (B1010-44A)

Ehrlich reaktifi (B1015-6)

Ksilen (B1015-5)

50 µL'lik steril uçlu pipetör

Hidrojen Peroksit, %3

İnokülüm Suyu, 3 mL otoklavlanmış deiyonize su (B1015-2)

Steril pamuk uçlu aplikatörler veya steril inokülasyon özeleri

Tahta aplikatör çubukları

3, 4 ve 5 McFarland Baryum Sülfat Türbidite Standardı

Vorteks karıştırıcı

İnkübatör, CO₂ dışı (35°C)

Kalite Kontrol Organizmaları:

C. perfringens ATCC 13124*

C. sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

PROSEDÜR

Panel Hazırlığı

1. Panelleri buzdolabından çıkarın. **Nem alıcı yoksa veya yırtılmışsa veya ambalaj bütünlüğünde bozulma olmuşsa (açılmış, delinmiş ya da yırtılmış), paneller kullanılmamalıdır.**
2. Poşeti keserek açın ve paneli çıkarın. Paneli hemen folyo poşetten çıkarın. Rehidrasyon öncesinde panellerin oda sıcaklığına gelmesini bekleyin. Paneller, üzerlerine temiz bir Panel Kapağı yerleştirilerek istiflenebilir.

İnokülüm Hazırlığı

1. Panellerin inokülasyonundan önce test edilecek organizmalar, aerotolerans, saflık, Gram boyama reaksiyonu ve koloni morfolojisi açısından incelenmelidir.
2. Steril bir pamuklu aplikatörü veya inokülasyon özesini kullanarak en az McFarland 3 standardına denk olan ancak McFarland 5 standardından yüksek olmayan bulanık bir süspansiyon elde etmek için 3 mL İnokülüm Suyu (otoklavlanmış deiyonize su) içeren tüpe seçici olmayan ortamda 24-48 saatlik kültürlemeden yeterli koloniyi süspanse edin. Gerekirse emülsifiye etmek için vorteksleyin. Süspansiyon hazır olduğunda panel, 15 dakika içinde inoküle edilmelidir.**

Panel İnokülasyonu

1. Folyo poşetten paneli çıkarın ve numune numarası ile etiketleyin.
2. Substratları içeren her kuyucuğa ve iki kontrol kuyucuğuna (BNAC, NPC) 50 µL bakteriyel süspansiyonu ekleyin. İnokülasyon için Pasteur pipetinin kullanılması önerilmez.
3. Panel, 50 µL inokülüm ile inoküle edildikten sonra, substrat ile karışmasını sağlamak için panelin her iki tarafına hafifçe vurun.

Biyokimyasal Yağ Kaplama

Üre (URE) ve İndol (IND) kuyucuklarını 2-3 damla mineral yağ ile kaplayın.

İnkübasyon

1. Buharlaşmayı engellemek için üst panelin üzerine bir panel kapağı koyarak panelleri 3-5'li gruplar halinde istifleyin.
2. İnoküle edilmiş panelleri 4 saat boyunca 35-37°C'de CO₂'siz bir inkübatörde inkübe edin.

Panellerin Okunması

1. Peptidaz reaktifini panelleri okumadan en az 30 dakika önce buzdolabından çıkarın. Peptidaz Reaktifi 4°C'de çökebilir, ancak oda sıcaklığında yeniden çözülür. Kristal çökeltinin yeniden çözülmesini hızlandırmak için Peptidaz Reaktifini yüksek sıcaklıklara maruz bırakmayın; yüksek sıcaklıklar reaktifin bozulmasına neden olur.
2. Paneller, beyaz bir arka plandan yansıtılan ışık kullanılarak okunmalıdır.

Tablo 1, Substratlar

Substratlar	Kıs.	Substratlar	Kıs.
p-Nitrofenil-β-D-Galaktopiranozid	BGAL	L-Lizin-β-Naftilamid (asit)	LYA
p-Nitrofenil-α-D-Galaktopiranozid	AGAL	Glisilglisine-β-Naftilamid	GGLY
bis-p-Nitrofenil-Fosfat	BPO ₄	Glisin-β-Naftilamid	GLY
p-Nitrofenil-N-Asetil-β-D-Glukozaminid	NGLU	L-Prolin-β-Naftilamid	PRO
p-Nitrofenil-α-D-Glukopiranozid	AGL	L-Arjinin-β-Naftilamid	ARG
o-Nitrofenil-β-D-Glukopiranozid	BGL	L-Pirolidonil-β-Naftilamid	PYR
p-Nitrofenil-Fosfat	PO ₄	L-Triptofan-β-Naftilamid	TRY
p-Nitrofenil-α-L-Fukopiranozid	AFU	3-İndoksil Fosfat	IDX
p-Nitrofenil-α-D-Mannopiranozid	MNP	Trehaloz	TRE
L-Lösin-β-Naftilamid	LEU	Üre	URE

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** Seçici olmayan ortam, tümü %5 koyun kanı ile TSA, Brucella, beyin kalp infüzyonu veya Columbia agarını içerir.

Substratlar	Kıs.	Substratlar	Kıs.
DL-Metiyonin-β-Naftilamid	MET	İndol	IND
L-Lizin-β-Naftilamid (alkalin)	LYB	Nitrat	NIT

3. 4 saatlik inkübasyondan sonra ilave reaktifler BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE ve TRE gerektirmeyen tüm substratlar için sonuçları kaydedin. BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU ve MNP'yi Nitrofenil Kontrol (NPC) kuyucuğuyla karşılaştırın. Herhangi bir sarı tonu pozitif olarak kaydedilmelidir.
4. LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY ve BNAC kuyucuklarına 1 damla Peptidaz Reaktifi ilave edin.
 - A. Rengin gelişmesi için en az 30 saniye bekleyin ve sonra sonuçları kaydedin. Sonuçları kaydetmeden önce reaktifleri ilave ettikten sonra 3 dakikadan fazla beklemeyin. Herhangi bir pembe veya kırmızı rengin varlığı, pozitif olarak yorumlanmalıdır. Bu kuyucuklardaki renk zamanla koyulaşacaktır, böylece negatif bir sarı renk daha koyu bir turuncu renk haline gelebilir, ancak bu yine de negatif bir reaksiyon olarak yorumlanmalıdır. Reaksiyonlar **yalnızca** pembe veya kırmızı renk olması durumunda pozitif olarak kaydedilmelidir. Bazı kuyucuklar, kontrol kuyucuğuyla (BNAC) karşılaştırıldığında daha koyu bir turuncu olabilir, ancak bunlar yine de negatif olarak kaydedilmelidir.
 - B. Peptidaz Reaktifinin β-Naftilamid kontrol kuyucuğuna (BNAC) ilave edilmesinden sonra kuyucuk sarı renkte olmalıdır. Pembe veya kırmızı varsa, yanlış pozitif yorumlamaları önlemek için Peptidaz Reaktifi atılmalıdır.
5. Reaksiyonların yorumlanmasına yardımcı olmak için iki kontrol kuyucuğu temin edilmiştir.
 - A. BNAC=β-Naftilamid kontrolü. Peptidaz Reaktifinin ilave edilmesinden sonra bu kuyucuk sarı ile turuncu renkte olmalıdır.
 - B. NPC=Nitrofenil kontrolü. Bu kuyucuk renksiz olmalıdır.
6. İndol (IND) kuyucuğuna bir damla Ksilen ilave edin. Tahta aplikatör çubuğu ile IND kuyucuğunun içeriğini karıştırın. 1 damla Ehrlich Reaktifi ilave edin. 2-3 dakika sonra okuyun.
7. Nitrat (NIT) kuyucuğuna 1'er damla Sülfanilik Asit ve ardından 1 damla N, N-Dimetil-Alfa-Naftilamin ilave edin. 2-3 dakika sonra okuyun.
8. BGAL kuyucuğuna 2-3 damla %3 Hidrojen Peroksit ilave edin. Sonucu kaydetmeden önce 2-5 dakika bekleyin. Pozitif reaksiyon, geniş kabarcıkların oluşumu ile gösterilir.

SONUÇLAR

1. Biyokimyasal Yorum Tablosu

Substrat	Reaktifler	Pozitif	Negatif
BGAL AGAL BPO ₄ NGLU AGL BGL PO ₄ ¹ AFU MNP	Nitrofenil (NPC) kontrol kuyucuğuyla karşılaştırın	Herhangi bir sarı tonu	Berrak
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	1 damla Peptidaz reaktifi ilave edin. En az 30 saniye ve en fazla 3 dakika boyunca renk reaksiyonlarının gelişmesini bekleyin.	Herhangi bir Pembe ile Macenta tonu	Sarı ile Turuncu
GLY PRO ARG PYR TRY	β-Naftilamid (BNAC) kontrol kuyucuğu sarı olmalıdır.		
IDX		Mavi renk/Mavi çökelti	Berrak
TRE		Sarı	Turuncu/Kırmızı
URE		Pembe-Kırmızı	Sarı-Turuncu
IND	1 damla Ksilen ilave edin, karıştırın, 1 damla Ehrlich reaktifi ilave edin. 2-3 dakika sonra okuyun.	Pembe	Sarı/Berrak

Substrat	Reaktifler	Pozitif	Negatif
NIT	1 damla %0,8'lik Sülfanilik Asit ve %0,5'lik N,N-Dimetil-Alfa-Naftilamin ilave edin. 2-3 dakika sonra okuyun.	Kırmızı	Berrak ila Uçuk Pembe
Katalaz	BGAL'e 2-3 damla %3 Hidrojen Peroksit ilave edin. Kabarcıkların oluşması için 2-3 dakika bekleyin.	Büyük Kabarcıklar	Kabarcık yok (veya birkaç çok küçük kabarcık/tüm kuyucuklarda aynı miktar)

1. Negatif PO₄ reaksiyonu, berrak ila çok açık sarı olabilir.

2. Tanımlama Reaksiyonlarının Prensipleri

Nitrofenil substratları (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): Orto veya para-nitrofenil substratları renksizdir. Uygun enzim varsa substrat, sarı renkli serbest o- veya p-nitrofenil bırakarak ayrılır.

Amino asit β-naftilamid substratları (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): Substratlar uygun enzim (genellikle bir amino asit arilamidaz) ile hidrolize edildiğinde, β-naftilamid serbest bırakılır. B-naftilamid, pembe ila mor renkte olan bir kompleks oluşturan p-dimetilaminosinamaldehit (Peptidaz Reaktifinde) ilave edilmesi ile tespit edilir.

NOT: Amino asit β-naftilamidi ayıran enzim, amino asit arilamidazdır. "Aminopeptidaz" terimi, sıklıkla arilamidaz ile eş anlamlı olarak kullanılır, ancak aslında farklı bir özgünlüğe sahip bir enzimi temsil eder (bir aminopeptidaz, N-terminal amino asidi bir peptidenden ayırır). Bir arilamidaz ve bir aminopeptidaz, aynı amino asit β-naftilamid substratını hidrolize edebilir. Bu nedenle, panelin mutlaka farklı ve benzersiz enzimleri ölçmesi gerekmez. Tek bir arilamidaz, birkaç amino asit β-naftilamidi hidrolize edebilir.

İndoksil Fosfat (IDX): İndoksil fosfat, indoksili serbest bırakacak şekilde bir fosfataz tarafından ayrılır. İndoksil, çözünmeyen mavi veya mavi-yeşil çökelti olan indigo mavisi oluşturacak şekilde oksijenle birleşir.

Trehaloz (TRE): Trehaloz'un kullanılması, turuncudan sarıya değişen fenol kırmızısı göstergesi ile tespit edilen pH'daki müteakip düşüşle asit oluşumuna yol açar.

Üre (URE): Üre, amonyak ve karbondioksit oluşturacak şekilde üreazdan ayrılır. Amonyak (amonyum karbonat şeklinde) pH'ta fenol kırmızısı göstergesinin sarıdan pembeye değişmesi ile tespit edilen bir artışa neden olur.

İndol (IND): Triptofan metabolizması, indol oluşumu ile sonuçlanır. Ksilen, besiyerinden indolü ekstrakte eder ve konsantre eder. Ehrlich Reaktif, pembe renk oluşturmak için indol ile reaksiyona girer.

Nitrat (NIT): Bir organizmanın nitratı nitrite indirgeme yeteneği Sülfanilik Asit ve ardından N, N-Dimetil-Alfa-Naftilamin ilave edilmesiyle tespit edilir ve bu maddeler nitrit varlığında kırmızı renk oluşturur.

Katalaz, hidrojen peroksidi kabarcıklar olarak serbestleşen su ve oksijen gazına ayırır.

ORGANİZMA TANIMLAMASI

MicroScan Hızlı Anaerob Biyotip Kod Kitabı bilinmeyen test organizmalarının tanımlanması için kullanılır. Bu kod kitabı tanımlama panelinde bulunan testler için Beckman Coulter'in veri tabanı kullanılarak oluşturulmuştur.

MicroScan Hızlı Anaerob Kod Kitabı, Hızlı Anaerob tanımlama panelindeki 24 testin bilgisayar analizine dayanmaktadır. Test sonuçları, kod kitabının bir tür tanımlamasını ve kümülatif bir göreceli tanımlama olasılığını listelediği 8 basamaklı bir "biyotip numarasına" dönüştürülür. Tüm olası tanımlamalar, %99,9'luk kümülatif sayıya en yüksek olasılıktan başlayarak azalan sırada yazılır. Kod kitabında bulunamayan bir biyotip numarası mevcut olması durumunda ilk önce bir prosedür hatasından şüphelenilmelidir. Genellikle biyotip numarası hatalı ilave edilmiştir veya bir reaksiyon hatalı kaydedilmiştir. Biyotip numarası doğruysa karışık bir kültür olasılığı kontrol edilmeli ve organizma, yeterince bulanık bir hücre süspansiyonu kullanılarak ve özel önem verilerek yeniden test edilmelidir. Yeniden test yaptığınızda aynı sonuçları elde ederseniz Beckman Coulter web sitesinde Biyotip Arama Hizmetine başvurun veya yerel dağıtımınıza danışın.

METODUN SINIRLILIKLARI

1. Test edilecek organizmalar, tümü %5 koyun kanı ile TSA, Brucella, beyin kalp infüzyonu veya Columbia agarı gibi seçici olmayan ortamlarda kültürlenmelidir. Antibiyotik, yani, LKV (Kanamisin/Vankomisin), *Bakteroidler* Safra Eskulin (BBE) agarı, Feniletıl Alkol (PEA) agarı vs. içeren seçici ortamlar kullanılmamalıdır.
2. Organizma süspansiyonunun türbiditesi, en az McFarland 3 standardına eşit olmalı ancak McFarland 5 standardından yüksek olmamalıdır. Test edilecek organizmanın süspansiyonu, bir McFarland 3 standardından daha az bulanıksa, zayıf reaksiyonlar veya yanlış negatif reaksiyonlar meydana gelebilir.
3. Hızlı Anaerob Tanımlama paneli, yalnızca anaerobik bakteriyi tanımlamak için tasarlanmıştır. Testten önce her organizma, aerotolerans, saflık, Gram boyama reaksiyonu ve kolonyal morfoloji açısından test edilmelidir. Belirli bir biyotip numarası için birden fazla tür tanımlaması listeleniyorsa, doğru tanımlama için ek testler gerekli olabilir.
4. Klinik durumlarda karşılaşılan anaerobik türlerin tümü Hızlı Anaerob veritabanına dahil edilmemiştir. Hızlı Anaerob panelinde tanımlanan türler, Hızlı Anaerobe Biyotip Kod Kitabında listelenir. Anaerobik tanımlamalar, gram boyamaları

ve diğer destekleyici tanılama testleri ile ilişkilendirilmelidir. Kullanıcı, bu testler için ve ayrıca güncel bakteriyel terminoloji için güncel referans literatüre başvurmalıdır.

5. MicroScan Hızlı Anaerob Tanımlama Paneli, MicroScan Cihaz Sistemleri ile kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmamıştır. Bu panel manuel olarak okunmalıdır.

KALİTE KONTROL

MicroScan Hızlı Anaerob Tanımlama ortamının kabul edilebilirliği, bilinen reaksiyonlar ile organizmaların test edilmesi yoluyla kontrol edilmelidir. Negatif reaksiyonlar, 50 µL otoklavlanmış deiyonize su ile panelin rehidre edilmesi ile elde edilebilir. Tüm substratlar yorum tablosunda açıklandığı gibi negatif olmalıdır. Kültür saflığı, inokülüm olarak kullanılan süspansiyondan uygun agar ortamına alt kültürleme yoluyla kontrol edilmelidir. Test sonuçları, karma bir kültürün tespit edilmesi durumunda geçersizdir (Bkz. Tablo 2).*

Tablo 2
Kalite Kontrol Tablosu

Substratlar	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
KATALAZ	–	–	+	–

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA ABD.

2. Optimum sonuçlar için *C. perfringens* kültürü yalnızca 24 saatlik olmalıdır.

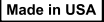
PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Çeşitli yeni klinik izolat setlerini temsil eden anaerobik organizmaların kullanıldığı klinik çalışmalarda, Hızlı Anaerob Tanımlama paneli izolatların %92'sini doğru bir şekilde tanımlamıştır.

Sembol Anahtarı

Sembol Anahtarı			
Sembol	Sembol Başlığı	Standardın Açıklaması	Standart
②	Tekrar kullanmayın	Bir kez kullanılması ya da tek bir hastada tek bir prosedürde kullanılması amaçlanan medikal cihazı belirtir.	ISO 15223-1; 5.4.2
🕒	Son kullanma tarihi	Medikal cihazın sonrasında kullanılmayacağı tarihi belirtir.	ISO 15223-1; 5.1.4

*Önerilen Amerika Tipi Kültür Toplama kontrol organizmalarına ait her reaksiyon için sonuçlar Kalite Kontrol Tablosunda listelenmektedir.

Sembol Anahtarı			
Sembol	Sembol Başlığı	Standardın Açıklaması	Standart
	Seri Kodu	Parti veya lot tanımlanabilecek şekilde üreticinin parti numarasını belirtir.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Katalog Numarası	Medikal cihazın tanımlanabilmesi için üreticinin katalog numarasını belirtir.	ISO 15223-1, madde 5.1.6
	Üretici	AB Yönetmelikleri 90/385/EEC, 93/42/EEC ve 98/79/EC'de tanımlandığı şekilde medikal cihaz üreticisini belirtir.	ISO 15223-1, madde 5.1.1
	Üretim Tarihi	Medikal cihazın üretildiği tarihi belirtir.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi	Avrupa Topluluğu yetkili temsilcisini belirtir.	ISO 15223-1, madde 5.1.2
	<n> sayıda test için yeterlidir	IVD'yle gerçekleştirilebilecek toplam IVD testi sayısını belirtir. (Genellikle reaktif kitlerine dahildir).	ISO 15223-1; 5.5.5
	In Vitro Diyagnostik Medikal Cihaz	In vitro diyagnostik medikal cihaz olarak kullanılmak üzere tasarlanmış medikal cihazı belirtir.	ISO 15223-1, madde 5.5.1
	Sıcaklık Kısıtlaması	Medikal cihazın güvenli bir şekilde maruz kalabileceği sıcaklık sınırlarını belirtir.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Kullanma Talimatına Başvurun	Kullanıcının kullanma talimatına başvurması gerektiğini belirtir.	ISO 15223-1; 5.4.3
	CE İşareti	Avrupa Uyumu Düzenleyici İşareti	uygulanamaz
	İçindekiler	uygulanamaz	uygulanamaz
	İçerik (paket)	Antimikrobiyal Ajan (kısaltma)	uygulanamaz
	İçerik (paket)	Tanımlama Substratı (kısaltma)	uygulanamaz
	Güvenlik Bilgi Formu	Güvenlik bilgi formunu belirtir.	uygulanamaz
	Made in USA	uygulanamaz	uygulanamaz
	Sadece İhracat Amaçlı Kullanım İçindir	uygulanamaz	uygulanamaz
	Sulandırma Hacmi	uygulanamaz	uygulanamaz
	Kırılabilir, dikkatli tutun	Medikal cihazın dikkatli taşınmaması halinde kırılabileceğini veya hasar görebileceğini belirtir.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Bu kısım yukarıya gelecektir	Doğru dikey konumu belirtir	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices - Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements (ISO 15223-1: Medikal cihazlar — Medikal Cihaz Etiketleriyle kullanılacak semboller, Etiketleme ve Temin Edilecek Bilgiler. 1. Bölüm: Genel Gereklilikler).			

Bu belgede belirtilen Beckman Coulter, stilize logo ve Beckman Coulter ürün ve hizmet markaları, Beckman Coulter, Inc. firmasının ABD'de ve diğer ülkelerdeki ticari veya tescilli ticari markalarıdır.

MicroScan

Практическое руководство по быстрой идентификации анаэробов

REF B1017-2

НАЗНАЧЕНИЕ

Панель MicroScan для быстрой идентификации анаэробов предназначена для быстрой идентификации анаэробных бактерий, изолированных из клинических образцов, полученных от человека.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ

Для идентификации анаэробных бактерий используются модифицированные стандартные и хромогенные тесты.^{1,2,3,4,5,6,7} В автоклавированной деионизованной воде готовится суспензия тестируемого микроорганизма с мутностью 3 по стандарту МакФарланда. На панели MicroScan для быстрой идентификации анаэробов, содержащей 24 дегидратированных субстрата, выполняется регидратирование, инокулирование с помощью бактериальной суспензии и инкубирование в аэробных условиях в течение 4 часов при температуре 35–37°C. Поскольку на панели MicroScan для быстрой идентификации анаэробов определяются готовые ферменты, рост микроорганизмов на ней не требуется. Интерпретация идентификации осуществляется на основе изменений pH, утилизации определенных субстратов или других биохимических реакций после инкубации.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Панели MicroScan для быстрой идентификации анаэробов и реагенты предназначены только для *in vitro* диагностики.
2. Не допускайте попадания в глаза, на кожу или на одежду пептидазного реагента, реактива Эрлиха, ксилола, а также субстратов для идентификации.
3. При работе с представляющим опасность микробиологическим материалом соблюдайте правила асептики и установленные меры предосторожности при выполнении всех процедур, обращая особое внимание на наличие в инокулированных панелях потенциально патогенных микроорганизмов.
4. Перед утилизацией все материалы необходимо автоклавировать.

ХРАНЕНИЕ

Панели и реагенты хранят при температуре 2–8°C.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество



Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Подлежащие исследованию образцы, не содержащие нормальной анаэробной флоры, должны собираться, транспортироваться и высеваться на питательные среды для первичной изоляции в соответствии с методиками, рекомендованными в документах *Anaerobe Laboratory Manual (Лабораторное руководство по работе с анаэробными бактериями)*² Политехнического института Вирджинии (V.P.I.), *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual (Руководство Уодсворта по анаэробным бактериям)*⁸, *Laboratory Methods in Bacteriology (Руководство по лабораторным методам в бактериологии)*⁹ Центра профилактики и контроля заболеваний (C.D.C.) и *Manual of Clinical Microbiology (Руководство по клинической микробиологии)*.¹⁰

ПРИМЕЧАНИЕ. При приготовлении инокулята для панелей не следует использовать колонии, выделенные из селективных сред, содержащих антибиотики, то есть LKV-агара (канамицин/ванкомицин), желчно-эскулинового агара для *Bacteroides* (BBE), агара на основе фенилэтилового спирта (ФЭС) и т. д.

ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Панель для быстрой идентификации анаэробов (B1017-2)

20 бланков регистрации

Практическое руководство

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Минеральное масло (B1010-40)

Лоток-крышка (B1010-56B)

Пептидазный реагент (B1012-30B)

0,5%-ный N, N-диметил-альфа-нафтиламина (B1010-45A)

0,8%-ный раствор сульфаниловой кислоты (B1010-44A)

Реагент Эрлиха (B1015-6)

Ксилл (B1015-5)

Пипеттор объемом 50 мкл со стерильными наконечниками

Перекись водорода, 3%-ный раствор

Вода для инокулята — 3 мл автоклавированной деионизованной воды (B1015-2)

Стерильные аппликаторы с наконечником из ваты или стерильные петли для инокуляции

Деревянные палочки для нанесения

Стандарты мутности 3, 4 и 5 по МакФарланду на основе сульфата бария

Вортекс

Инкубатор без CO₂ (35°C)

Микроорганизмы для контроля качества:

C. perfringens ATCC 13124*

C. sordellii ATCC 9714

B. fragilis ATCC 25285

P. magnus ATCC 29328

ПРОЦЕДУРА

Подготовка планшетов

1. Извлеките панели из холодильника. **Не используйте панели в случае отсутствия или повреждения влагопоглотителя или при нарушении целостности упаковки (упаковка вскрыта, проколота или разорвана).**
2. Разрежьте пакет и извлеките панель. Панель сразу же извлеките из фольгового пакета. Перед заполнением планшеты необходимо выдержать до достижения комнатной температуры. Панели можно складывать в стопку, накрыв сверху чистым лотком-крышкой.

Приготовление инокулята

1. Перед инокуляцией панелей следует проверить исследуемые микроорганизмы на азотоперантность, чистоту, реакцию с красителем Грама, а также морфологию колоний.
2. Используя стерильный аппликатор с наконечником из ваты или петли для инокуляции, суспендируйте в пробирке с 3 мл воды для инокулята (автоклавированной деионизованной воды) достаточное количество колоний из 24–48-часовой культуры, выращенной на неселективной среде, до получения суспензии, мутность которой составляет не менее 3 и не более 5 по МакФарланду. При необходимости перемешайте до образования суспензии. Инокуляцию панели необходимо проводить в течение 15 минут после приготовления суспензии.**

Инокуляция панели

1. Извлеките панель из фольгового пакета и прикрепите к ней этикетку с номером образца.
2. В каждую лунку с субстратом и в две контрольные лунки (BNAC, NPC) добавьте по 50 мкл бактериальной суспензии. При этом не рекомендуется использовать пастеровскую пипетку для инокуляции.
3. После инокуляции каждой лунки панели 50 мкл инокулята слегка постучите пальцами по каждой стороне панели для обеспечения перемешивания инокулята с субстратом.

Слой масла для проведения биохимической реакции

На поверхность лунок с мочевиной (URE) и индолем (IND) нанесите по 2–3 капли минерального масла.

Инкубация

1. Сложите панели стопками по 3–5 штук в каждой, а верхнюю панель накройте крышкой для предотвращения испарения.
2. Инкубируйте инокулированные панели в течение 4 часов при температуре 35–37°C в инкубаторе без CO₂.

Считывание данных с планшетов

1. Извлеките из холодильника пептидазный реагент не менее чем за 30 минут до считывания панелей. При температуре 4°C в пептидажном реагенте может выпасть осадок, однако при комнатной температуре он снова растворяется. Не допускается нагревание пептидажного реагента для ускорения растворения кристаллического осадка, поскольку повышенная температура вызывает разложение реагента.

*American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

** К числу неселективных сред относятся триптиказо-соевый агар (TSA), бруцелла-агар, агар с сердечно-мозговой вытяжкой и колумбийский агар, каждый из которых содержит 5% овечьей крови.

2. Панели должны считываться на белом фоне в отраженном свете.

Таблица 1. Субстраты

Субстраты	Сокр.	Субстраты	Сокр.
п-нитрофенил-β-D-галактопиранозид	BGAL	L-лизин-β-нафтиламид (кислотный)	LYA
п-нитрофенил-α-D-галактопиранозид	AGAL	Глицилглицин-β-нафтиламид	GGLY
бис-(п-нитрофенил)-фосфат	BPO ₄	Глицин-β-нафтиламид	GLY
р-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозаминид	NGLU	L-пролин-β-нафтиламид	PRO
п-нитрофенил-α-D-глюкопиранозид	AGL	L-аргинин-β-нафтиламид	ARG
о-нитрофенил-β-D-глюкопиранозид	BGL	L-пирролидонил-β-нафтиламид	PYR
п-нитрофенил-фосфат	PO ₄	L-триптофан-β-нафтиламид	TRY
п-нитрофенил-α-L-фукопиранозид	AFU	3-индоксилфосфат	IDX
п-нитрофенил-α-D-маннопиранозид	MNP	Трегалоза	TRE
L-лейцин-β-нафтиламид	LEU	Мочевина	URE
DL-метионин-β-нафтиламид	MET	Индол	IND
L-лизин-β-нафтиламид (щелочной)	LYB	Нитрат	NIT

3. После 4-часовой инкубации запишите результаты для всех субстратов, не требующих дополнительных реагентов: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE и TRE. Сравните BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU и MNP с контрольной лункой с нитрофениловым реагентом (NPC). Любой оттенок желтого цвета следует записывать как положительный результат.
4. Добавьте 1 каплю пептидазного реагента в лунки LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY и BNAC.
- A. Подождите не менее 30 секунд до развития цветной реакции, после чего запишите результаты. Промежуток времени между добавлением реагентов и записью результатов не должен превышать 3 минут. Любой оттенок розового или красного цвета следует интерпретировать как положительный результат. Со временем цвет этих лунок становится более темным, поэтому желтая окраска, указывающая на отрицательный результат, может переходить в темно-оранжевую; при этом результат все равно следует считать отрицательным. Реакцию следует записывать как положительную **только** в случае розовой или красной окраски. Некоторые лунки могут иметь более темно-оранжевый оттенок по сравнению с контрольной лункой (BNAC), однако результат все равно следует записывать как отрицательный.
- B. После добавления пептидазного реагента в контрольную лунку с β-нафтиламидом (BNAC) цвет лунки должен стать желтым. В случае появления розовой или красной окраски пептидазный реагент следует утилизировать во избежание получения ложноположительных интерпретаций.
5. Для облегчения интерпретации результатов в планшет включены две контрольные лунки.
- A. BNAC — контроль с β-нафтиламидом. После добавления пептидазного реагента цвет этой лунки должен стать от желтого до оранжевого.
- B. NPC — контроль с нитрофениловым реагентом. Эта лунка должна быть бесцветной.
6. В лунку с индолом (IND) добавьте одну каплю ксилола. Перемешайте содержимое лунки IND с использованием деревянной палочки для нанесения. Добавьте 1 каплю реагента Эрлиха. Через 2–3 минуты прочитайте результат.
7. В лунку с нитратом (NIT) добавьте 1 каплю сульфаниловой кислоты, а затем — 1 каплю N, N-диметил-альфа-нафтиламина. Через 2–3 минуты прочитайте результат.
8. В лунку с BGAL добавьте 2–3 капли 3%-ного раствора перекиси водорода. Подождите 2–5 минут, затем запишите результат. Образование крупных пузырей указывает на положительную реакцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Таблица для интерпретации результатов биохимических реакций

Субстрат	Реагенты	Положительный	Отрицательный
BGAL	Сравните с контрольной лункой с нитрофениловым реагентом (NPC)	Любой оттенок желтого	Прозрачный
AGAL			
BPO ₄			
NGLU			
AGL			
BGL			
PO ₄ ¹			
AFU			
MNP			

Субстрат	Реагенты	Положительный	Отрицательный
LEU	Добавьте 1 каплю пептидазного реагента. Подождите не менее 30 секунд (но не более 3 минут) до появления цветной реакции.	Любой	От желтого до оранжевого
MET		оттенок от	
LYB		розового до	
LYA	Контрольная лунка с β-нафтиламидом (BNAC) должна быть желтого цвета.	пурпурного	
GGLY			
GLY			
PRO			
ARG			
PYR			
TRY			
IDX		Синий цвет или синий осадок	Прозрачный
TRE		Желтый	Оранжевый или красный
URE		Розовый или красный	Желтый или оранжевый
IND	Добавьте 1 каплю ксилола, перемешайте и добавьте 1 каплю реагента Эрлиха. Через 2–3 минуты прочитайте результат.	Розовый	Желтый или прозрачный (бесцветный)
NIT	Добавьте 1 каплю 0,8%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 1 каплю 0,5%-ного N, N-диметил-альфа-нафтиламина. Через 2–3 минуты прочитайте результат.	Красный	От прозрачного до бледно-розового
Каталаза	В лунку BGAL добавьте 2–3 капли 3%-ного раствора перекиси водорода. Подождите 2–3 минуты до образования пузырьков.	Крупные пузыри	Отсутствие пузырей (или небольшое количество мелких пузырьков — такое же, как и в других лунках).

1. На отрицательную реакцию с PO₄ может указывать отсутствие окрашивания или бледно-желтая окраска.

2. Принципы реакций идентификации

Нитрофенильные субстраты (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): орто- или пара-нитрофениловые субстраты бесцветны. В присутствии соответствующего фермента субстрат расщепляется с высвобождением свободного о- или п-нитрофенола, имеющего желтый цвет.

β-нафтиламиды аминокислот в качестве субстратов (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): при гидролизе субстрата в присутствии соответствующего фермента (как правило, ариламидазы аминокислот) высвобождается β-нафтиламид. β-нафтиламид выявляется при добавлении п-диметиламинокоричного альдегида (к пептидазному реагенту), который образует комплекс с цветом от розового до фиолетового.

ПРИМЕЧАНИЕ. Ферментом, расщепляющим β-нафтиламид аминокислоты, является аминокислотная ариламидаза. В качестве синонима ариламидазы часто используют термин «аминопептидаза», однако фактически этот термин относится к ферменту с другой специфичностью (аминопептидаза отщепляет от пептида N-концевую аминокислоту). Ариламидаза и аминопептидаза могут гидролизовать один и тот же субстрат — β-нафтиламид аминокислоты. Таким образом, при использовании панели не всегда возможен замер

различных и индивидуальных ферментов. Одна и та же ариламидаза может гидролизовать β -нафтиламиды нескольких аминокислот.

Индоксилфосфат (IDX) — индоксилфосфат под действием фосфатазы расщепляется с высвобождением индоксила. При взаимодействии с кислородом индоксил образует краситель индиго синий, который представляет собой нерастворимый осадок синего или сине-зеленого цвета.

Трегалоза (TRE): утилизация трегалозы приводит к образованию кислоты и последующему снижению pH, которое определяется с помощью индикатора фенолового красного, меняющего цвет с оранжевого на желтый.

Мочевина (URE) — мочевина расщепляется уреазой с образованием аммиака и диоксида углерода. Аммиак (в форме карбоната аммония) вызывает повышение pH, которое выявляется с помощью индикатора фенолового красного, меняющего цвет с желтого на розовый.

Индол (IND): индол образуется в результате метаболизма триптофана. Ксилон экстрагирует индол из бульона и концентрирует его. Реактив Эрлиха реагирует с индолом с образованием соединения розового цвета.

Нитрат (NIT): способность микроорганизма восстанавливать нитрат в нитрит выявляется при добавлении сульфаниловой кислоты, а затем N, N-диметил-альфа-нафтиламина, который в присутствии нитрита вызывает красное окрашивание.

Каталаза расщепляет перекись водорода с образованием воды и кислорода, который выделяется в виде пузырей.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для идентификации неизвестных исследуемых микроорганизмов используется кодовая книга MicroScan для быстрого определения биотипа анаэроба. Эта кодовая книга создана на основе базы данных компании Beckman Coulter для тестов, включенных в панель для идентификации.

Кодовая книга MicroScan для быстрого определения анаэробов основана на компьютерном анализе 24 тестов, включенных в панель для быстрой идентификации анаэробов. Результаты теста преобразуются в 8-значный «номер биотипа», для которого в кодовой книге указан список наименований видов микроорганизмов, а также совокупная относительная вероятность идентификации. Все возможные идентификации распечатываются в порядке уменьшения вероятности идентификации, начиная с максимальной; в конце списка указывается совокупная вероятность (99,9%). Если номер биотипа в кодовой книге отсутствует, то прежде всего необходимо предположить ошибку при проведении процедуры. Обычно это связано с неправильным добавлением номера биотипа или ошибочной записью реакции. Если номер биотипа указан правильно, следует проверить, не является ли смешанной культура микроорганизма, а затем повторно протестировать микроорганизм, обращая особое внимание на использование достаточно мутной клеточной суспензии. Если при повторном тестировании результаты не изменяются, следует воспользоваться функциями сервисной программы Biotype Lookup на веб-сайте компании Beckman Coulter или обратиться к местному дистрибьютору.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. Микробиологический посев исследуемых микроорганизмов, необходимо проводить на неселективных средах, к числу которых относятся триптиказо-соевый агар (TSA), бруцелла-агар, агар с сердечно-мозговой вытяжкой и колумбийский агар, каждый из которых содержит 5% овечьей крови. Не следует использовать селективные среды, содержащие антибиотики, то есть LKV-агар (канамицин/ванкомицин), желчно-эскулиновый агар для *Bacteroides* (BBE), агар на основе фенилэтилового спирта (ФЭС) и т. д.
2. Мутность суспензии микроорганизма должна составлять не менее 3 и не более 5 по стандарту МакФарланда. Если мутность суспензии тестируемого организма ниже 3 по МакФарланду, возможны слабые или ложноотрицательные реакции.
3. Панель для быстрой идентификации анаэробов разработана для идентификации только анаэробных бактерий. Перед тестированием каждый микроорганизм следует проверить на аэротолерантность, чистоту, реакцию с красителем Грама и морфологию колоний. Если для определенного номера биотипа в списке идентифицированных видов указано несколько наименований, то для правильной идентификации, возможно, потребуются дополнительные тесты.
4. В базу данных быстрого определения анаэробов включены не все виды анаэробных бактерий, встречающиеся в клинических условиях. Виды, идентифицируемые при помощи панели для быстрой идентификации анаэробов, перечислены в кодовой книге для быстрого определения биотипов анаэробов. Идентификация анаэробов должны согласовываться с результатами окрашивания по Граму, а также с данными других подтверждающих диагностических тестов. Пользователь должен обращаться к текущей справочной литературе по этим тестам, а также учитывать текущую номенклатуру бактерий.
5. Панель MicroScan для быстрой идентификации анаэробов не была одобрена Управлением США по контролю за продуктами и лекарственными средствами (FDA) для использования с системами инструментов MicroScan. Результаты, получаемые с использованием этой панели, необходимо считывать вручную.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Пригодность сред, применяемых в панелях MicroScan для быстрой идентификации анаэробов, следует проверять путем тестирования микроорганизмов с использованием известных реакций. Отрицательные реакции можно получить, проводя регидратацию панели при добавлении 50 мкл автоклавированной деионизованной воды. Как указано в пояснительной таблице, все субстраты при этом должны показать отрицательную реакцию. Чистоту культуры следует проверять пересевом из суспензии, используемой в качестве инокулята, на подходящей агаровой среде. В случае выявления смешанной культуры результаты теста считаются недействительными (см. таблицу 2).*

Таблица 2

Таблица контроля качества

Субстраты	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	—
AGAL	+	—	+	—
BPO ₄	V	—	+	—
NGLU	+	—	+	—
AGL	+	V	+	—
BGL	—	—	+	—
PO ₄	+	V	+	—
AFU	—	V	+	—
MNP	V	—	+	—
LEU	V	—	+	+
MET	V	—	V	+
LYB	V	—	V	+
LYA	—	—	—	+
GGLY	—	—	V	+
GLY	—	—	—	+
PRO	—	+	—	—
ARG	+	—	V	+
PYR	+	—	—	+
TRY	—	V	V	V
IDX	V	—	+	—
TRE ²	V	—	—	—
URE	—	+	—	—
IND	—	+	—	—
NIT ²	V	—	—	—
КАТАЛАЗА	—	—	+	—

1. American Type Culture Collection, Manassas, VA, США.

2. Для получения оптимальных результатов культура *C. perfringens* не должна быть старше 24 часов.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

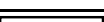
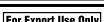
В клинических исследованиях с использованием анаэробных микроорганизмов, представляющих широкий набор последних клинических изолятов, применение панели для быстрой идентификации анаэробов приводило к правильной идентификации 92% изолятов.

Ключ символов

Ключ символов			
Символ	Название символа	Описание стандарта	Стандарт
ⓧ	Запрет на повторное применение	Обозначает медицинское изделие, предназначенное для одноразового применения или для применения одним пациентом в ходе одной процедуры.	ISO 15223-1; 5.4.2
⌚	Срок годности	Обозначает дату, после наступления которой не следует использовать данное медицинское изделие.	ISO 15223-1; 5.1.4

*Результаты для каждой реакции для рекомендованных контрольных микроорганизмов Американская коллекция типовых культур, ATCC перечислены в таблице контроля качества.

Ключ символов

Символ	Название символа	Описание стандарта	Стандарт
	Код партии	Обозначает код серии производителя, позволяющий идентифицировать серию или партию.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Номер по каталогу	Обозначает номер по каталогу производителя, позволяющий идентифицировать медицинское изделие.	ISO 15223-1, пункт 5.1.6
	Изготовитель	Обозначает производителя медицинского изделия согласно Директивам ЕС 90/385/ЕЕС, 93/42/ЕЕС и 98/79/ЕС.	ISO 15223-1, пункт 5.1.1
	Дата производства	Обозначает дату изготовления медицинского изделия.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе	Обозначает уполномоченного представителя в странах Европейского сообщества.	ISO 15223-1, пункт 5.1.2
	Содержимое рассчитано на <n> тестов	Обозначает общее количество IVD (диагностических тестов in vitro), которые можно выполнить с помощью медицинского изделия для IVD (диагностики in vitro). (Стандартное количество для набора реагентов).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>	Обозначает медицинское изделие, предназначенное для использования при диагностике <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, пункт 5.5.1
	Температурные ограничения	Обозначает предельные температуры, не оказывающие опасного воздействия на медицинское изделие.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Обратитесь к Инструкциям по применению	Обозначает, что пользователь должен ознакомиться с инструкциями по применению.	ISO 15223-1; 5.4.3
	Маркировка CE	Отметка о соответствии стандартам качества ЕС	неприменимо
	Содержание	неприменимо	неприменимо
	Содержимое (упаковка)	Антибактериальный препарат (сокращение)	неприменимо
	Содержимое (упаковка)	Субстрат для идентификации (сокращение)	неприменимо
	Паспорт безопасности	Обозначает паспорт безопасности.	неприменимо
	Сделано в США	неприменимо	неприменимо
	Только для экспорта	неприменимо	неприменимо
	Объем восстановления	неприменимо	неприменимо

Ключ символов			
Символ	Название символа	Описание стандарта	Стандарт
	Хрупкое изделие: обращаться с осторожностью	Обозначает, что медицинское изделие может быть сломано или повреждено при неосторожном обращении.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Этой стороной вверх	Указывает правильное вертикальное положение	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices - Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements (ISO 15223-1. Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования).			

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.



MicroScan

Manual de procedimentos de identificação rápida de anaeróbios

REF B1017-2

USO PREVISTO

O Pannel de identificação rápida de anaeróbios MicroScan foi desenvolvido para a identificação rápida de bactérias anaeróbicas isoladas a partir de espécimes clínicos humanos.

SUMÁRIO E PRINCÍPIO

Testes cromogênicos, convencionais e modificados, são usados para a identificação de bactéria anaeróbica.^{1,2,3,4,5,6,7} Uma suspensão McFarland 3 do organismo a ser testado é feita em água deionizada autoclavada. O Pannel de identificação rápida de anaeróbios MicroScan, que consiste em 24 substratos desidratados, é reidratado e inoculado com a suspensão bacteriana e incubado aerobicamente por 4 horas a uma temperatura de 35–37°C. Como o pannel de identificação rápida de anaeróbios MicroScan detecta enzimas pré-formadas, não é necessário realizar o crescimento do organismo no pannel. Após a incubação, as mudanças no pH e a utilização de determinados substratos ou outras reações bioquímicas são interpretadas para identificação.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Os painéis e reagentes de identificação rápida de anaeróbios MicroScan destinam-se apenas ao uso para diagnóstico *in vitro*.
2. Não permita que o reagente peptidase, o reagente de Ehrlich, o xileno ou quaisquer dos substratos de identificação entrem em contato com os olhos, a pele ou as roupas.
3. Observe as técnicas assépticas e as precauções estabelecidas contra riscos microbiológicos em todos os procedimentos, com especial atenção ao fato de que painéis inoculados contêm organismos potencialmente patogênicos.
4. Todos os materiais devem ser desinfetados em autoclave antes do descarte.

ARMAZENAMENTO

Armazene os painéis e os reagentes a 2–8°C.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO DO GHS

Não classificado como perigoso

SDS A Folha de dados de segurança está disponível em techdocs.beckmancoulter.com

COLETA DE ESPÉCIME E PREPARAÇÃO

Espécimes apropriados, desprovidos de flora anaeróbica normal, devem ser coletados, transportados e colocados em meio de isolamento primário, de acordo com os procedimentos recomendados no V.P.I., *no Anaerobe Laboratory Manual* (Manual de laboratório para anaeróbios),² no *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual* (Manual Wadsworth de bactérias anaeróbicas),⁸ nos *Laboratory Methods in Bacteriology* (Métodos laboratoriais em bacteriologia) do Centro de controle e prevenção de doenças⁹ e no *Manual of Clinical Microbiology* (Manual de microbiologia clínica).¹⁰

NOTA: as colônias de meios seletivos que contêm antibióticos, ou seja, LKV (canamicina/vancomicina) ou ágar *Bacteroides* Bile Esculina (BBE), álcool feniletílico (PEA), etc., não devem ser usadas para preparar o inóculo para os painéis.

MATERIAIS FORNECIDOS

Pannel de identificação rápida de anaeróbios (B1017-2)

20 planilhas de dados

Manual de procedimentos

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Óleo mineral (B1010-40)

Bandeja de proteção (B1010-56B)

Reagente peptidase (B1012-30B)

N, N-dimetil-alfa-naftilamina a 0,5% (B1010-45A)

Ácido sulfanílico a 0,8% (B1010-44A)

Reagente de Ehrlich (B1015-6)

Xileno (B1015-5)

Pipetador de 50 µL com pontas estéreis

Peróxido de hidrogênio, 3%

Água de inóculo, 3 mL de água deionizada autoclavada (B1015-2)
 Aplicadores com ponta em algodão estéreis ou alças de inoculação estéreis
 Bastões aplicadores em madeira
 Padrão de turbidez do sulfato de bário, McFarland 3, 4 e 5
 Misturador vórtex
 Incubador, sem CO₂ (35°C)
 Organismos de controle de qualidade:
C. perfringens ATCC 13124*
C. sordellii ATCC 9714
B. fragilis ATCC 25285
P. magnus ATCC 29328

PROCEDIMENTO

Preparação de painel

1. Retire os painéis da refrigeração. **Os painéis não deverão ser usados se não houver dessecante, se eles estiverem rompidos ou se a integridade da embalagem estiver comprometida (sem vedação, furada ou rasgada).**
2. Corte a bolsa para abri-la e retire o painel. Retire o painel imediatamente da embalagem de alumínio. Deixe os painéis se equilibrarem até a temperatura ambiente antes da reidratação. Os painéis podem ser empilhados com uma bandeja de proteção limpa na parte superior.

Preparação do inóculo

1. Antes da inoculação dos painéis, os organismos a serem testados devem ser observados para verificar a aerotolerância, pureza, reação da coloração de Gram e morfologia de colônias.
2. Usando um aplicador em algodão estéril ou alça de inoculação, suspenda colônias suficientes de uma cultura de 24–48 horas em meio não seletivo em um tubo de 3 mL de água de inóculo (água deionizada autoclavada) para criar uma suspensão turva, equivalente, no mínimo, ao padrão McFarland 3, mas não superior ao padrão McFarland 5. Agite em vórtex para emulsificar, se necessário. Após o preparo da suspensão, o painel deve ser inoculado em até 15 minutos.**

Inoculação do painel

1. Retire o painel da embalagem de alumínio e identifique-o com o número do espécime.
2. Adicione 50 µL de suspensão bacteriana a cada poço contendo substratos e nos dois poços de controle (BNAC e CPN). O uso de uma pipeta de Pasteur para inoculação não é recomendado.
3. Após o painel ter sido inoculado com o inóculo de 50 µL, bata levemente em cada lado do painel para garantir a mistura com o substrato.

Sobreposição bioquímica com óleo

Sobreponha 2–3 gotas de óleo mineral nos poços de ureia (URE) e indol (IND).

Incubação

1. Empilhe os painéis em grupos de 3 a 5 com um painel de proteção sobre o painel superior para evitar a evaporação.
2. Incube os painéis inoculados por 4 horas a uma temperatura de 35–37°C em uma incubadora sem CO₂.

Leitura dos painéis

1. Retire o reagente peptidase do refrigerador pelo menos 30 minutos antes de ler os painéis. O reagente peptidase pode precipitar a 4°C, mas se redissolverá em temperatura ambiente. Não exponha o reagente peptidase a temperaturas elevadas para acelerar uma nova dissolução do precipitado cristalino, pois as altas temperaturas causarão a degradação do reagente.
2. Os painéis devem ser lidos usando luz refletida de um fundo branco.

Tabela 1, Substratos

Substratos	Abr.	Substratos	Abr.
p-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo	BGAL	L-lisina-β-naftilamida (ácido)	LYA
p-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo	AGAL	Glicilglicina-β-naftilamida	GGLY

*American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

** Os meios não seletivos incluem TSA, Brucella, infusão de cérebro e coração ou ágar Columbia, todos com 5% de sangue de ovelha.

Substratos	Abr.	Substratos	Abr.
bis-p-nitrofenil-fosfato	BPO ₄	Glicina-β-naftilamida	GLY
p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida	NGLU	L-prolina-β-naftilamida	PRO
p-Nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo	AGL	L-arginina-β-naftilamida	ARG
o-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo	BGL	L-pirrolidonil-β-naftilamida	PYR
p-nitrofenil-fosfato	PO ₄	L-triptofano-β-naftilamida	TRY
p-nitrofenil-α-L-fucopiranosida	AFU	3-indoxil fosfato	IDX
p-nitrofenil-α-D-manopiranosida	MNP	Trealose	TRE
L-leucina-β-naftilamida	LEU	Ureia	URE
DL-metionina-β-naftilamida	MET	Indol	IND
L-lisina-β-naftilamida (alcalino)	LYB	Nitrato	NIT

- Após 4 horas de incubação, registre os resultados de todos os substratos que não exigem reagentes adicionais: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE e TRE. Compare BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU e MNP ao poço de controle nitrofenil (CPN). Qualquer tonalidade de amarelo deve ser registrada como um resultado positivo.
- Adicione 1 gota de reagente peptidase aos poços LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY e BNAC.
 - Deixe a coloração se desenvolver por pelo menos 30 segundos e, em seguida, registre os resultados. Não aguarde mais que 3 minutos para registrar os resultados após adicionar os reagentes. A presença de qualquer tonalidade de rosa ou vermelho deve ser interpretada como um resultado positivo. A coloração nesses poços irá escurecer com o tempo, portanto, uma coloração amarela negativa pode se tornar uma coloração laranja mais escura, mas ainda assim deve ser interpretada como uma reação negativa. As reações devem ser registradas como positivas **apenas** se houver uma coloração rosa ou vermelha. Alguns poços podem conter uma coloração laranja mais escura em comparação com o poço de controle (BNAC), mas esses também devem ser registrados como negativos.
 - Após a adição do reagente peptidase ao poço de controle β-naftilamida (BNAC), o poço deve apresentar uma coloração amarela. Caso haja a presença de uma coloração rosa ou vermelha, o reagente peptidase deve ser descartado para evitar interpretações de falso positivo.
- Dois poços de controle são fornecidos para auxiliar na interpretação das reações.
 - BNAC = controle β-naftilamida. Após a adição do reagente peptidase, esse poço deve ter uma coloração de amarelo a laranja.
 - CPN = controle nitrofenil. Esse poço deve ser incolor.
- Adicione uma gota de xileno ao poço de indol (IND). Com o bastão aplicador em madeira, misture o conteúdo do poço IND. Adicione 1 gota de reagente de Ehrlich. Faça a leitura após 2–3 minutos.
- Adicione 1 gota de ácido sulfanílico ao poço de nitrato (NIT) e, em seguida, 1 gota de N, N-dimetil-alfa-naftilamina. Faça a leitura após 2–3 minutos.
- Adicione 2–3 gotas de peróxido de hidrogênio a 3% ao poço BGAL. Aguarde 2–5 minutos antes de registrar o resultado. Uma reação positiva é indicada pela formação de bolhas grandes.

RESULTADOS

1. Tabela de interpretação bioquímica

Substrato	Reagentes	Positivo	Negativo
BGAL	Compare com o poço de controle nitrofenil (CPN)	Qualquer tonalidade de amarelo	Transparente
AGAL			
BPO ₄			
NGLU			
AGL			
BGL			
PO ₄ ¹			
AFU	Adicione 1 gota de reagente peptidase. Deixe as reações de coloração se desenvolverem por, no mínimo, 30 segundos, mas não mais do que 3 minutos.	Qualquer tonalidade de rosa a magenta	Amarelo a laranja
MNP			
LEU			
MET			
LYB			
LYA			
GGLY			
GLY			
PRO	O poço de controle β-naftilamida (BNAC) deve ser amarelo.		
ARG			
PYR			

Substrato	Reagentes	Positivo	Negativo
TRY			
IDX		Cor azul/precipitado azul	Transparente
TRE		Amarelo	Laranja/vermelho
URE		Rosa-vermelho	Amarelo-laranja
IND	Adicione 1 gota de xileno, misture e adicione 1 gota do reagente de Ehrlich. Faça a leitura após 2–3 minutos.	Rosa	Amarelo/incolor
NIT	Adicione 1 gota de ácido sulfanílico a 0,8% e de N, N-dimetil-alfa-naftilamina a 0,5%. Faça a leitura após 2–3 minutos.	Vermelho	Incolor a rosa claro
Catalase	Adicione 2–3 gotas de peróxido de hidrogênio a 3% ao BGAL. Aguarde por 2–3 minutos para que se formem bolhas.	Bolhas grandes	Nenhuma bolha (ou poucas bolhas pequenas/mesma quantidade em todos os poços.)

1. Uma reação PO₄ negativa pode ser de incolor a amarela muito clara.

2. Princípios das reações de identificação

Substratos de nitrofenil (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): os substratos orto ou para-nitrofenil são incolores. Se a enzima apropriada estiver presente, o substrato é clivado, liberando o o- ou p-nitrofenil livre, que é amarelo.

Substratos de aminoácido β-naftilamida (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): quando os substratos são hidrolisados pela enzima adequada (geralmente um aminoácido arilamidase), a β-naftilamida é liberada. A β-naftilamida é detectada pela adição de p-dimetilaminocinamaldeído (no reagente peptidase) que cria um complexo com coloração de rosa a roxo.

NOTA: a enzima que cliva um aminoácido β-naftilamida é um aminoácido arilamidase. O termo “aminopeptidase” é utilizado com frequência como sinônimo para arilamidase, mas representa, na verdade, uma enzima com uma especificidade diferente (uma aminopeptidase cliva o aminoácido N-terminal de um peptídeo). Uma arilamidase e uma aminopeptidase podem hidrolisar o mesmo substrato aminoácido β-naftilamida. Por essa razão, o painel não está necessariamente medindo enzimas diferentes e exclusivas. Uma única arilamidase pode hidrolisar diversos aminoácidos β-naftilamidas.

Indoxil fosfato (IDX): o indoxil fosfato é clivado por uma fosfatase para liberar indoxil. O indoxil combina-se ao oxigênio para formar o azul índigo, que é um precipitado azul ou azul esverdeado insolúvel.

Trealose (TRE): a utilização de trealose resulta na formação de ácido com uma queda subsequente do pH que é detectada pelo indicador vermelho de fenol, que muda de laranja para amarelo.

Ureia (URE): a ureia é dividida pela urease para formar amônia e dióxido de carbono. A amônia (na forma de carbonato de amônio) causa um aumento no pH que é detectado pela alteração do indicador vermelho de fenol que muda de amarelo para rosa.

Indol (IND): o metabolismo do triptofano resulta na formação de indol. O xileno extrai o indol do caldo e o concentra. O reagente de Ehrlich reage com o indol formando uma coloração rosa.

Nitrato (NIT): a capacidade de um organismo reduzir nitrato para nitrito é detectada pela adição de ácido sulfanílico seguido de N, N-dimetil-alfa-naftilamina, o que produz uma cor vermelha na presença de nitrito.

A **Catalase** quebra o peróxido de hidrogênio em água e gás oxigênio, que é liberado na forma de bolhas.

IDENTIFICAÇÃO DE ORGANISMOS

O Livro de códigos de biótipos para identificação rápida de anaeróbios MicroScan é usado para a identificação de organismos de teste desconhecidos. Esse livro de códigos foi gerado com base no banco de dados da Beckman Coulter para os testes incluídos no painel de identificação.

O Livro de códigos para identificação rápida de anaeróbios MicroScan baseia-se em uma análise de computador dos 24 testes incluídos no painel de identificação rápida de anaeróbios. Os resultados do teste são transformados em um “número de biótipo” de 8 dígitos, para o qual o livro de códigos lista uma identificação da espécie e uma probabilidade relativa e cumulativa de identificação. Todas as identificações possíveis são impressas em ordem decrescente da probabilidade mais alta, até um cumulativo de 99,9%. Caso ocorra um número de biótipo que não possa ser encontrado no livro de códigos, é preciso antes suspeitar de um erro de procedimento. Geralmente, o número de biótipo terá sido adicionado incorretamente ou uma reação foi registrada por equívoco. Se o número de biótipo estiver correto, deve-se verificar a possibilidade de uma cultura

misturada e deve-se realizar novamente o teste com o organismo, com ênfase especial no uso de uma suspensão de célula suficientemente turva. Se o novo teste gerar os mesmos resultados, consulte o Biotype Lookup Service (Serviço de busca de biótipo) no site da Beckman Coulter ou consulte o seu revendedor local.

LIMITAÇÃO DO PROCEDIMENTO

1. Os organismos a serem testados devem ter a cultura feita em meios não seletivos, tais como TSA, Brucella, infusão de cérebro e coração ou ágar Columbia, todos com 5% de sangue de ovelha. Os meios seletivos contendo antibióticos, ou seja, LKV (canamicina/vancomicina) ou ágar *Bacteroides* Bile Esculina (BBE), ágar álcool feniletílico (PEA), etc., não devem ser usados.
2. A turbidez da suspensão do organismo deve equivaler, no mínimo, ao padrão McFarland 3, mas não superior ao padrão McFarland 5. Se a suspensão do organismo a ser testado for menos turva do que o padrão McFarland 3, poderão ocorrer reações fracas ou reações de falso negativo.
3. O painel de identificação rápida de anaeróbios foi desenvolvido para identificar apenas bactérias anaeróbicas. Antes dos testes, cada organismo deve ser testado para verificar a aerotolerância, a pureza, a reação da coloração de Gram e a morfologia das colônias. Se para um determinado número de biótipo estiver listada mais do que uma identificação de espécie, podem ser necessários testes suplementares para a identificação correta.
4. Nem todas as espécies anaeróbicas encontradas em situações clínicas estão incluídas no banco de dados de identificação rápida de anaeróbios. As espécies identificadas no painel de identificação rápida de anaeróbios estão listadas no Livro de códigos de biótipos para identificação rápida de anaeróbios. As identificações anaeróbicas devem ser correlacionadas com colorações de Gram e outros testes diagnósticos de apoio. O usuário deve consultar a literatura de referência atual para esses testes e também a nomenclatura bacteriana vigente.
5. O Painel de identificação rápida de anaeróbios MicroScan ainda não foi liberado pela FDA para uso com os Sistemas de instrumentos MicroScan. Esse painel tem de ser lido manualmente.

CONTROLE DE QUALIDADE

A aceitação do meio de identificação rápida de anaeróbios MicroScan deve ser verificada testando os organismos com reações conhecidas. Reações negativas podem ser alcançadas reidratando um painel com 50 µL de água deionizada autoclavada. Todos os substratos devem ser negativos, conforme descrito na tabela de interpretação. A pureza da cultura deve ser verificada por meio da subcultura da suspensão usada como o inóculo no meio ágar adequado. Os resultados do teste serão inválidos se uma cultura mista for detectada (consulte a Tabela 2).*

Tabela 2

Tabela de controle de qualidade

Substratos	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–

*Os resultados de cada reação para os organismos de controle recomendados pela Coleção de cultura dos Estados Unidos estão listados na Tabela de controle de qualidade.

Tabela 2

Tabela de controle de qualidade

Substratos	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
NIT ²	V	–	–	–
CATALASE	–	–	+	–

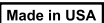
1. American Type Culture Collection, Manassas, VA EUA.
 2. Para obter resultados ideais, a cultura de *C. perfringens* deve ter apenas 24 horas.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Em ensaios clínicos que usaram organismos anaeróbicos os quais representam um conjunto diversificado de isolados clínicos recentes, o painel de Identificação rápida de anaeróbios identificou corretamente 92% dos isolados.

Legenda dos símbolos

Legenda dos símbolos			
Símbolo	Título do símbolo	Descrição do padrão	Padrão
	Não reutilize	Indica um dispositivo médico de uso único ou destinado para uso em um único paciente durante um único procedimento.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Data de validade	Indica a data após a qual o dispositivo médico não deve ser usado.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Código de lote	Indica o código de lote do fabricante pelo qual o lote pode ser identificado.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Número do catálogo	Indica o número de catálogo do fabricante para que o dispositivo médico possa ser identificado.	ISO 15223-1, cláusula 5.1.6
	Fabricante	Indica o fabricante do dispositivo médico, conforme definido nas Diretivas da UE 90/385/CEE, 93/42/CEE e 98/79/CE.	ISO 15223-1, cláusula 5.1.1
	Data de fabricação	Indica a data em que o dispositivo médico foi fabricado.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Representante autorizado na Comunidade Europeia	Indica o representante autorizado na Comunidade Europeia.	ISO 15223-1, cláusula 5.1.2
	Contém o suficiente para <n> testes	Indica o número total de testes de IVD que podem ser realizados com o IVD. (Normalmente incluído nos kits de reagentes).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Indica um dispositivo médico destinado a ser usado como um dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, cláusula 5.5.1
	Limitação de temperatura	Indica os limites de temperatura aos quais o dispositivo médico pode ser exposto com segurança.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Consulte as Instruções de uso	Indica a necessidade de o usuário consultar as instruções de uso.	ISO 15223-1; 5.4.3
	Marca CE	Marca regulatória de conformidade europeia	n/a
	Conteúdo	n/a	n/a

Legenda dos símbolos			
Símbolo	Título do símbolo	Descrição do padrão	Padrão
	Conteúdo (embalagem)	Agente antimicrobiano (abreviação)	n/a
	Conteúdo (embalagem)	Substrato de identificação (abreviação)	n/a
	Folha de dados de segurança	Indica uma folha de dados de segurança.	n/a
	Fabricado nos EUA	n/a	n/a
	Apenas para exportação	n/a	n/a
	Volume de reconstituição	n/a	n/a
	Frágil, manuseie com cuidado	Indica um dispositivo médico que pode ser quebrado ou danificado se não for manuseado com cuidado.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Este lado para cima	Indica a posição vertical correta	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices — Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements (ISO 15223-1: Dispositivos médicos — Símbolos para serem usados com etiquetas de dispositivos médicos, etiquetagem e informações a serem fornecidas. Parte 1: Requisitos gerais).			

Beckman Coulter, o logotipo estilizado e as marcas dos produtos e serviços da Beckman Coulter contidos neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e em outros países.

MicroScan

Hướng dẫn quy trình định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí

REF B1017-2

MỤC ĐÍCH SỬ DỤNG

Panel định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí của MicroScan được thiết kế để định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí được phân lập từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng của người.

TÓM TẮT VÀ NGUYÊN TẮC

Các xét nghiệm sinh màu và xét nghiệm thông thường tùy chỉnh được dùng để định danh vi khuẩn kỵ khí.^{1,2,3,4,5,6,7} Huyền dịch của sinh vật ở độ đục McFarland 3 cần xét nghiệm được chuẩn bị bằng nước khử ion đã hấp tiệt trùng. Panel định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí của MicroScan gồm có 24 cơ chất đã khử nước, được thủy hóa lại và cấy truyền bằng huyền dịch vi khuẩn, được ủ hiếu khí trong 4 giờ ở nhiệt độ 35–37°C. Vì Panel định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí của MicroScan phát hiện các enzym đã tạo trước nên sự sinh trưởng của sinh vật trong panel là không cần thiết. Sau khi ủ, những thay đổi trong độ pH, việc sử dụng các cơ chất nhất định hoặc phản ứng sinh hóa khác sẽ được diễn giải để định danh.

CẢNH BÁO VÀ THẬN TRỌNG

1. Các Panel và thuốc thử định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí của MicroScan chỉ dùng để chẩn đoán *in vitro*.
2. Không để Thuốc thử Peptidase, Thuốc thử Ehrlich, Xylene hay bất kỳ Cơ chất định danh nào dính vào mắt, da hay quần áo.
3. Tuân thủ các kỹ thuật vô trùng và biện pháp phòng ngừa đã thiết lập để ngăn ngừa các mối nguy hiểm vi sinh trong toàn bộ quy trình. Đặc biệt lưu ý rằng panel đã cấy truyền có chứa sinh vật có khả năng gây bệnh.
4. Phải hấp tiệt trùng tất cả vật tư trước khi xử lý vứt bỏ.

BẢO QUẢN

Phải bảo quản panel và thuốc thử ở nhiệt độ 2–8°C.

PHÂN LOẠI NGUY CƠ THEO GHS

Không được phân loại là nguy hiểm

SDS Bảng dữ liệu an toàn có sẵn tại techdocs.beckmancoulter.com

LẤY MẪU XÉT NGHIỆM VÀ CHUẨN BỊ

Cần lấy mẫu, vận chuyển và đưa mẫu bệnh phẩm phù hợp không có thực vật kỵ khí thông thường vào môi trường phân lập chính theo các quy trình được khuyến nghị trong V.P.I., *Anaerobe Laboratory Manual (Hướng dẫn cho phòng xét nghiệm vi khuẩn kỵ khí)*,² *Wadsworth Anaerobic Bacterial Manual (Hướng dẫn về vi khuẩn kỵ khí của Wadsworth)*,⁸ *Laboratory Methods in Bacteriology (Phương pháp của xét nghiệm trong vi khuẩn học)* của C.D.C.⁹ và *Manual of Clinical Microbiology (Hướng dẫn vi sinh lâm sàng)*.¹⁰

GHI CHÚ: Không được sử dụng các khuẩn lạc từ môi trường chọn lọc chứa chất kháng sinh, như là LKV (Kanamycin/Vancomycin), hoặc thạch *Bacteroides* Bile Esculin (BBE), Rượu Phenylethyl (PEA), v.v. để chuẩn bị môi trường cấy truyền cho các panel.

VẬT LIỆU ĐƯỢC CUNG CẤP

Panel định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí (B1017-2)

20 phiếu ghi kết quả xét nghiệm

Hướng dẫn quy trình

VẬT LIỆU CẦN THIẾT KHÔNG ĐƯỢC CUNG CẤP

Dầu khoáng (B1010-40)

Khay phủ (B1010-56B)

Thuốc thử Peptidase (B1012-30B)

N, N-Dimethyl-Alpha-Naphthylamine 0,5% (B1010-45A)

Axit sulfanilic 0,8% (B1010-44A)

Thuốc thử Ehrlich (B1015-6)

Xylene (B1015-5)

Pipet 50 µL có đầu hút vô khuẩn

Nước oxy già, 3%

Nước cấy truyền, 3 mL nước khử ion đã hấp tiệt trùng (B1015-2)

Que trét đầu cotton hoặc que cấy vòng vô khuẩn
Que trét gỗ
Ống độ đục chuẩn Bari Sunfat McFarland 3, 4 và 5
Máy trộn vortex
Buồng ủ, không có CO₂ (35°C)
Sinh vật kiểm soát chất lượng:
C. perfringens ATCC 13124*
C. sordellii ATCC 9714
B. fragilis ATCC 25285
P. magnus ATCC 29328

QUY TRÌNH
Chuẩn bị Panel

- 1. Lấy panel ra khỏi tủ đá. **Không được sử dụng các panel nếu không có gói hút ẩm, gói hút ẩm bị vỡ hoặc bao bì của panel không nguyên vẹn (không kín, bị thủng hoặc rách).**
- 2. Cắt mở túi và lấy panel ra. Lấy panel ngay ra khỏi túi giấy bạc. Để các panel về nhiệt độ phòng trước khi thủy hóa lại. Có thể xếp chồng các panel với điều kiện đặt một Khay phủ sạch lên trên.

Chuẩn bị môi trường cấy truyền

- 1. Trước khi cấy truyền các panel, cần quan sát sinh vật xét nghiệm xem mức độ hiếu khí, độ thuần khiết, phản ứng nhuộm Gram và hình thái của khuẩn lạc.
- 2. Dùng que trét đầu cotton hoặc que cấy vòng vô khuẩn lấy đủ số lượng khuẩn lạc đã nuôi cấy 24–48 giờ trên môi trường không chọn lọc vào một ống chứa 3 mL Nước cấy truyền (nước khử ion đã hấp tiệt trùng) để tạo một huyền dịch đục tối thiểu tương đương với độ đục chuẩn McFarland 3 nhưng không cao hơn độ đục chuẩn McFarland 5. Lắc để tạo nhũ tương, nếu cần. Sau khi chuẩn bị xong huyền dịch, phải cấy truyền panel trong vòng 15 phút.**

Cấy truyền Panel

- 1. Lấy panel ra khỏi túi giấy bạc và dán nhãn số mẫu bệnh phẩm.
- 2. Thêm 50 µL huyền dịch vi khuẩn vào từng giếng chứa cơ chất và hai giếng kiểm chuẩn (BNAC, NPC). Không nên sử dụng pipet Pasteur để cấy truyền.
- 3. Sau khi cấy truyền panel bằng 50 µL môi trường cấy truyền, gõ nhẹ vào từng cạnh của panel để giúp đảm bảo trộn đều cơ chất.

Phủ dầu sinh hóa

Phủ các giếng Urê (URE) và Indole (IND) bằng 2–3 giọt dầu khoáng.

Ủ

- 1. Xếp các panel thành từng nhóm 3 đến 5 panel, đặt panel trên cùng bằng tấm phủ để tránh bay hơi.
- 2. Ủ các panel đã cấy truyền trong 4 giờ ở nhiệt độ 35–37°C trong buồng ủ không có CO₂.

Đọc panel

- 1. Lấy Thuốc thử Peptidase ra khỏi tủ lạnh ít nhất 30 phút trước khi đọc panel. Thuốc thử Peptidase có thể kết tủa ở nhiệt độ 4°C, nhưng sẽ tan ra ở nhiệt độ phòng. Không để Thuốc thử Peptidase tiếp xúc với nhiệt độ cao hơn để kết tủa tinh thể tan nhanh hơn vì nhiệt độ cao sẽ làm thuốc thử biến chất.
- 2. Phải đọc các panel bằng đèn phản chiếu từ một nền trắng.

Bảng 1, Cơ chất

Cơ chất	Chữ viết tắt	Cơ chất	Chữ viết tắt
p-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside	BGAL	L-Lysine-β-Naphthylamide (axit)	LYA
p-Nitrophenyl-α-D-Galactopyranoside	AGAL	Glycylglycine-β-Naphthylamide	GGLY
bis-p-Nitrophenyl-Phosphate	BPO ₄	Glycine-β-Naphthylamide	GLY
p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminide	NGLU	L-Proline-β-Naphthylamide	PRO
p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranoside	AGL	L-Arginine-β-Naphthylamide	ARG
o-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranoside	BGL	L-Pyrrolidonyl-β-Naphthylamide	PYR

*Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection), Manassas, VA USA

** Môi trường không chọn lọc bao gồm TSA, Brucella, canh thang não tim hoặc thạch Columbia, tất cả đều có 5% máu cừu.

Cơ chất	Chữ viết tắt	Cơ chất	Chữ viết tắt
p-Nitrophenyl-Phosphate	PO ₄	L-Tryptophan-β-Naphthylamide	TRY
p-Nitrophenyl-α-L-Fucopyranoside	AFU	3-Indoxyl Phosphate	IDX
p-Nitrophenyl-α-D-Mannopyranoside	MNP	Trehalose	TRE
L-Leucine-β-Naphthylamide	LEU	Urê	URE
DL-Methionine-β-Naphthylamide	MET	Indole	IND
L-Lysine-β-Naphthylamide (kiềm)	LYB	Nitrat	NIT

- Sau khi ủ 4 giờ, hãy ghi lại kết quả của tất cả cơ chất không cần thêm thuốc thử: BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP, IDX, URE và TRE. So sánh BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU và MNP với giếng Kiểm chuẩn Nitrophenyl (NPC). Mọi sắc vàng phải được ghi là dương tính.
- Thêm 1 giọt Thuốc thử Peptidase vào các giếng LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY và BNAC.
 - Để màu phát triển trong ít nhất 30 giây, sau đó ghi lại kết quả. Sau khi thêm thuốc thử, hãy ghi lại kết quả trong vòng 3 phút. Nếu xuất hiện sắc hồng hoặc đỏ, phải diễn giải kết quả là dương tính. Màu của những giếng này sẽ đậm dần lên, do đó, màu vàng âm tính có thể trở thành màu cam đậm hơn nhưng vẫn phải diễn giải kết quả là phản ứng âm tính. **Chỉ** ghi phản ứng là dương tính nếu có màu hồng hoặc đỏ. Một số giếng có thể bắt màu cam đậm hơn so với giếng kiểm chuẩn (BNAC) nhưng vẫn phải ghi phản ứng này là âm tính.
 - Sau khi thêm Thuốc thử Peptidase vào giếng kiểm chuẩn β-Naphthylamide (BNAC), giếng này phải bắt màu vàng. Nếu có sắc hồng hoặc đỏ, phải thải bỏ Thuốc thử Peptidase để tránh diễn giải kết quả dương tính giả.
- Hai giếng kiểm chuẩn được cung cấp để hỗ trợ việc diễn giải phản ứng.
 - BNAC = Chất kiểm chuẩn β-Naphthylamide. Sau khi thêm Thuốc thử Peptidase, giếng này phải bắt màu vàng đến cam.
 - NPC = Chất kiểm chuẩn nitrophenyl. Giếng này phải không có màu.
- Thêm một giọt Xylene vào giếng Indole (IND). Dùng que trét gỗ khuấy các thành phần trong giếng IND. Thêm 1 giọt Thuốc thử Ehrlich. Đọc sau 2–3 phút.
- Thêm 1 giọt Axit sulfanilic vào giếng Nitrat (NIT), sau đó thêm 1 giọt N, N-Dimethyl-Alpha-Naphthylamine. Đọc sau 2–3 phút.
- Thêm 2–3 giọt Ôxy già 3% vào giếng BGAL. Đợi 2–5 phút trước khi ghi kết quả. Nếu có các bọt lớn thì đó là phản ứng dương tính.

KẾT QUẢ

1. Bảng diễn giải kết quả sinh hóa

Cơ chất	Thuốc thử	Dương tính	Âm tính
BGAL AGAL BPO ₄ NGLU AGL BGL PO ₄ ¹ AFU MNP	So sánh với giếng kiểm chuẩn Nitrophenyl (NPC)	Mọi sắc vàng	Trong
LEU MET LYB LYA GGLY GLY PRO ARG PYR TRY	Thêm 1 giọt thuốc thử Peptidase. Để phản ứng màu phát triển trong ít nhất 30 giây, nhưng không quá 3 phút.	Mọi sắc từ Hồng đến Đỏ tươi	Vàng đến cam
IDX	Giếng kiểm chuẩn β-Naphthylamide (BNAC) phải có màu vàng.	Màu lam/Kết tủa màu lam	Trong
TRE		Vàng	Cam/Đỏ
URE		Hồng-Đỏ	Vàng-Cam
IND	Thêm 1 giọt Xylene, khuấy và thêm 1 giọt thuốc thử Ehrlich. Đọc sau 2–3 phút.	Hồng	Vàng/Trong suốt

Cơ chất	Thuốc thử	Dương tính	Âm tính
NIT	Thêm lần lượt 1 giọt Axit sulfanilic 0,8% và N, N-Dimethyl-Alpha-Naphthylamine 0,5%. Đọc sau 2–3 phút.	Đỏ	Trong suốt đến hồng nhạt
Catalase	Thêm 2–3 giọt Oxy già 3% vào BGAL. Đợi 2–3 phút để bọt xuất hiện.	Bọt lớn	Không có bọt (hoặc ít bọt nhỏ/số lượng đồng đều trong tất cả các giếng.)

1. Phản ứng PO₄ âm tính có thể có màu trong suốt hoặc vàng rất nhạt.

2. Nguyên lý của các phản ứng định danh

Cơ chất Nitrophenyl (BGAL, AGAL, BPO₄, NGLU, AGL, BGL, PO₄, AFU, MNP): Các cơ chất ortho hoặc para-nitrophenyl không có màu. Nếu có enzym phù hợp, cơ chất sẽ bị tách ra, giải phóng o-nitrophenyl hoặc p-nitrophenyl tự do màu vàng.

Cơ chất axit amin β-naphthylamide (LEU, MET, LYB, LYA, GGLY, GLY, PRO, ARG, PYR, TRY): Khi cơ chất được thủy phân bằng enzym phù hợp (thường là axit amin arylamidase) sẽ giải phóng β-naphthylamide. Nhận biết β-naphthylamine bằng cách thêm p-dimethylaminocinnamaldehyde (trong Thuốc thử Peptidase) để tạo ra một phức chất màu hồng đến tím.

GHI CHÚ: Enzym có khả năng tách axit amin β-naphthylamide là axit amin arylamidase. Thuật ngữ “aminopeptidase” thường được sử dụng như từ đồng nghĩa của arylamidase nhưng thực chất lại đại diện cho enzym có mức đặc hiệu khác (aminopeptidase tách axit amin đầu N khỏi peptide). Arylamidase và aminopeptidase có thể thủy phân cùng một cơ chất axit amin β-naphthylamide. Do đó, panel không nhất thiết phải đo các enzym khác nhau và duy nhất. Một arylamidase có thể thủy phân nhiều axit amin β-naphthylamide.

Indoxyl Phosphate (IDX): Tách Indoxyl phosphate bằng phosphatase để giải phóng indoxyl. Indoxyl kết hợp với oxy để tạo thành màu lam chàm. Đó là một chất kết tủa màu lam hoặc lam-lục không hòa tan.

Trehalose (TRE): Sử dụng Trehalose sẽ tạo thành axit, làm cho độ pH giảm được nhận biết bằng chỉ thị phenol đỏ đổi màu từ cam sang vàng.

Urê (URE): Enzym xúc tác thủy phân urê thành amoniac và carbon dioxide. Amoniac (dưới dạng ammonium carbonate) làm tăng độ pH được nhận biết bằng chỉ thị phenol đỏ đổi màu từ vàng sang hồng.

Indole (IND): Tryptophan chuyển hóa sẽ tạo thành indole. Xylene sẽ chiết indole từ canh thang và cô đặc lại. Thuốc thử Ehrlich sẽ phản ứng với indole để tạo thành màu hồng.

Nitrat (NIT): Khả năng khử nitrat thành nitrit của sinh vật được phát hiện bằng cách thêm Axit sulfanilic và sau đó là N, N-Dimethyl-Alpha-Naphthylamine, sẽ tạo ra màu đỏ khi có mặt nitrit.

Catalase phá vỡ oxy già thành nước và khí oxy, giải phóng các bọt khí.

ĐỊNH DANH SINH VẬT

Sổ mã hóa kiểu sinh học vi khuẩn kỵ khí nhanh của MicroScan được dùng để định danh các sinh vật xét nghiệm chưa xác định. Sổ mã hóa này được tạo từ cơ sở dữ liệu của Beckman Coulter cho các xét nghiệm được đưa vào panel định danh.

Sổ mã hóa vi khuẩn kỵ khí nhanh của MicroScan được dựa trên phân tích bằng máy tính của 24 xét nghiệm được đưa vào Panel định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí. Kết quả xét nghiệm được chuyển đổi thành “số kiểu sinh học” gồm 8 chữ số. Sổ mã hóa sử dụng số kiểu sinh học để liệt kê định danh loài và tổng xác suất định danh tương đối. Tất cả khả năng định danh được in theo thứ tự giảm dần, bắt đầu từ xác suất cao nhất. Tổng xác suất lên tới 99,9%. Nếu có một số kiểu sinh học không tìm thấy trong sổ mã hóa, trước tiên, phải nghi ngờ đã xảy ra lỗi quy trình. Thường là do lỗi thêm số kiểu sinh học hoặc ghi lại phản ứng không chính xác. Nếu số kiểu sinh học là đúng thì có khả năng cần kiểm tra dấu hiệu nuôi cấy hỗn hợp và phải xét nghiệm lại sinh vật, đặc biệt chú ý đến việc sử dụng huyền dịch tế bào đủ độ đục. Nếu xét nghiệm lại vẫn cho kết quả như vậy, hãy tham vấn Dịch vụ Biotype Lookup (Tra cứu kiểu sinh học) trên trang web của Beckman Coulter hoặc liên hệ với nhà phân phối tại địa phương.

GIỚI HẠN CỦA QUY TRÌNH

1. Phải nuôi cấy các sinh vật cần xét nghiệm trên môi trường không chọn lọc, chẳng hạn như TSA, Brucella, canh thang não tim hoặc thạch Columbia, tất cả đều có 5% máu cừu. Không được sử dụng môi trường chọn lọc chứa chất kháng sinh, như là LKV (Kanamycin/Vancomycin), hoặc thạch *Bacteroides* Bile Esculin (BBE), Rượu Phenylethyl (PEA), v.v.
2. Độ đục của huyền dịch sinh vật tối thiểu phải tương đương với độ đục chuẩn McFarland 3 nhưng không vượt quá độ đục chuẩn McFarland 5. Nếu huyền dịch của sinh vật cần xét nghiệm có độ đục thấp hơn độ đục chuẩn McFarland 3 thì có thể xảy ra phản ứng âm tính giả hoặc phản ứng yếu.
3. Panel định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí chỉ được thiết kế để định danh vi khuẩn kỵ khí. Trước khi xét nghiệm, cần kiểm tra mức độ hiếu khí, độ thuần khiết, phản ứng nhuộm Gram và hình thái khuẩn lạc của từng sinh vật. Nếu một số kiểu sinh học cụ thể có nhiều định danh loài, có thể cần xét nghiệm bổ sung để định danh chính xác.

4. Cơ sở dữ liệu về Vi khuẩn kỵ khí nhanh không chứa tất cả các loài vi khuẩn kỵ khí thường gặp trong các tình huống lâm sàng. Các loài được định danh trên Panel vi khuẩn kỵ khí nhanh được liệt kê trong Sổ mã hóa kiểu sinh học của vi khuẩn kỵ khí nhanh. Các định danh của vi khuẩn kỵ khí phải tương quan với xét nghiệm nhuộm gram và chẩn đoán hỗ trợ khác. Người dùng phải tham khảo tài liệu tham khảo hiện hành đối với các xét nghiệm này cũng như tham khảo danh pháp hiện tại của vi khuẩn.
5. Panel định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí của MicroScan chưa được FDA phê duyệt để sử dụng với các Hệ thống thiết bị của MicroScan. Phải đọc panel này theo cách thủ công.

KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

Phải kiểm tra khả năng chấp nhận của môi trường Định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí của MicroScan bằng cách xét nghiệm các sinh vật có các phản ứng đã biết. Có thể thu được các phản ứng âm tính bằng cách thủy hóa lại panel bằng 50 µL nước khử ion đã hấp tiệt trùng. Tất cả cơ chất phải âm tính như mô tả trong bảng diễn giải. Phải kiểm tra độ thuần nuôi cấy bằng cách nuôi cấy bậc hai từ huyền dịch được dùng làm môi trường cấy truyền trên một môi trường thạch phù hợp. Kết quả xét nghiệm không hợp lệ nếu phát hiện có nuôi cấy hỗn hợp (Xem Bảng 2).*

Bảng 2
Bảng kiểm soát chất lượng

Cơ chất	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ¹	<i>C. sordellii</i> ATCC 9714	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. magnus</i> ATCC 29328
BGAL	+	V	+	–
AGAL	+	–	+	–
BPO ₄	V	–	+	–
NGLU	+	–	+	–
AGL	+	V	+	–
BGL	–	–	+	–
PO ₄	+	V	+	–
AFU	–	V	+	–
MNP	V	–	+	–
LEU	V	–	+	+
MET	V	–	V	+
LYB	V	–	V	+
LYA	–	–	–	+
GGLY	–	–	V	+
GLY	–	–	–	+
PRO	–	+	–	–
ARG	+	–	V	+
PYR	+	–	–	+
TRY	–	V	V	V
IDX	V	–	+	–
TRE ²	V	–	–	–
URE	–	+	–	–
IND	–	+	–	–
NIT ²	V	–	–	–
CATALASE	–	–	+	–

1. Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ, Manassas, VA USA.
2. Để có kết quả tối ưu, chỉ nuôi cấy *C. perfringens* trong 24 giờ.

ĐẶC TÍNH HIỆU SUẤT

Trong các thử nghiệm lâm sàng sử dụng các sinh vật kỵ khí đại diện cho một bộ phong phú các chủng vi khuẩn phân lập lâm sàng gần đây, Panel định danh nhanh vi khuẩn kỵ khí đã định danh chính xác 92% số chủng vi khuẩn phân lập.

*Kết quả của từng phản ứng đối với sinh vật kiểm chuẩn do Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ, ATCC khuyến nghị được liệt kê trong Bảng kiểm soát chất lượng.

Bảng chú giải các ký hiệu

Bảng chú giải các ký hiệu			
Ký hiệu	Tên ký hiệu	Mô tả về tiêu chuẩn	Chuẩn
	Không sử dụng lại	Biểu thị thiết bị y tế chỉ được chế tạo cho một lần sử dụng hoặc sử dụng cho một bệnh nhân trong một quy trình duy nhất.	ISO 15223-1; 5.4.2
	Sử dụng trước ngày	Biểu thị ngày hết hạn sử dụng thiết bị y tế.	ISO 15223-1; 5.1.4
	Mã lô	Biểu thị mã lô của nhà sản xuất, có thể dùng để xác định lô hoặc mẻ.	ISO 15223-1; 5.1.5
	Số danh mục	Biểu thị số danh mục của nhà sản xuất, có thể dùng để xác định thiết bị y tế.	ISO 15223-1, khoản 5.1.6
	Nhà sản xuất	Biểu thị nhà sản xuất thiết bị y tế, như định nghĩa trong Chỉ thị 90/385/EEC, 93/42/EEC và 98/79/EC của Liên minh Châu Âu.	ISO 15223-1, khoản 5.1.1
	Ngày sản xuất	Biểu thị ngày sản xuất thiết bị y tế.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Đại diện được ủy quyền tại Cộng đồng Châu Âu	Biểu thị đại diện được ủy quyền tại Cộng đồng Châu Âu.	ISO 15223-1, khoản 5.1.2
	Đủ dùng cho <n> xét nghiệm	Biểu thị tổng số xét nghiệm IVD có thể thực hiện với IVD. (Thường thấy trên các bộ thuốc thử).	ISO 15223-1; 5.5.5
	Thiết bị y tế chẩn đoán <i>In Vitro</i>	Biểu thị thiết bị y tế được thiết kế để dùng làm thiết bị y tế chẩn đoán <i>in vitro</i> .	ISO 15223-1, khoản 5.5.1
	Giới hạn nhiệt độ	Biểu thị các giới hạn nhiệt độ mà thiết bị y tế có thể tiếp xúc an toàn.	ISO 15223-1; 5.3.7
	Tham khảo Hướng dẫn sử dụng	Biểu thị rằng người dùng cần tham khảo hướng dẫn sử dụng.	ISO 15223-1; 5.4.3
	Dấu CE	Dấu quy định tuân thủ ở Châu Âu	không áp dụng
	Thành phần	không áp dụng	không áp dụng
	Hóa chất bên trong (bao bì)	Chất kháng sinh (viết tắt)	không áp dụng
	Hóa chất bên trong (bao bì)	Cơ chất định danh (viết tắt)	không áp dụng
	Bảng dữ liệu an toàn	Biểu thị bảng dữ liệu an toàn.	không áp dụng
	Sản xuất tại Mỹ	không áp dụng	không áp dụng
	Chỉ dùng cho xuất khẩu	không áp dụng	không áp dụng
	Thể tích hoàn nguyên	không áp dụng	không áp dụng
	Dễ vỡ, thận trọng khi cầm nắm	Biểu thị thiết bị y tế có thể bị vỡ hoặc hư hỏng nếu không cầm nắm cẩn thận.	ISO 15223-1; 5.3.1
	Mặt này hướng lên trên	Biểu thị cách đặt thùng hàng thẳng đứng đúng hướng	ISO 7000: 0623
ISO 15223-1: Medical Devices – Symbols to be Used with Medical Device Labels, Labeling and Information to be Supplied. Part 1: General Requirements (ISO 15223-1: Thiết bị y tế – Các ký hiệu sẽ dùng với nhãn thiết bị y tế, việc dán nhãn và thông tin được cung cấp. Phần 1: Yêu cầu chung).			

Beckman Coulter, logo cách điệu và các nhãn hiệu sản phẩm và dịch vụ của Beckman Coulter nêu trong văn bản này đều là nhãn hiệu hoặc nhãn hiệu được đăng ký của Beckman Coulter, Inc. ở Hoa Kỳ và các quốc gia khác.

REFERENCES

1. Appel, W. 1974. Peptidases, p. 949-977. In *Methods in Enzymatic Analysis*, vol. 2. Verlag Chemie International. Deerfield Beach, FL.
2. Holdeman, L.V., E.P. Cato, and W.E.C. Moore (ed). 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.
3. MacFadden, J.F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
4. Murgier, M., C. Pelissier, A. Lazdunski, and C. Lazdunski. 1976. Existence, localization and regulation of the biosynthesis of aminoendopeptidase in Gram negative bacteria. *Eur. J. Biochem.* 65:517.
5. Porschen, R.K., and E.H. Spaulding. 1974. Phosphatase activity of anaerobic organisms. *Appl. Microbiol.* 27:744.
6. Watson, R.R. 1976. Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation, p. 1-14. In J.R. Norris and D.W. Ribbons (ed.). *Methods in Microbiology*, vol. 9, Academic Press. New York, NY.
7. Westley, J.W., P.J. Anderson, V.A. Close, B. Halpern, and E.M. Lederberg. 1967. Aminopeptidase profiles of various bacteria. *Appl. Microbiol.* 15:822.
8. Sutter, V.L., D.M. Citron, and S.M. Finegold (eds.). 1980. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*. The C.V. Mosby Company, St. Louis, MO.
9. Dowell, V.R. Jr., and T.W. Hawkins. 1979. *Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology*, CDC Laboratory Manual, Center for Disease Control, Atlanta, GA. DHEW Publication No. (CDC) 74-8272.
10. Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (eds), 1995. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.



Beckman Coulter Eurocenter SA
22, rue Juste-Olivier, Case Postale 1044,
CH-1260 Nyon 1, Switzerland.
Telephone: +41 (0)22 365 36 11

贝克曼库尔特公司，美国加利福尼亚州，
Brea市，S. Kraemer大街 250号，邮编：92821
www.beckmancoulter.com

Beckman Coulter do Brasil Com. e Imp. de Prod. de Lab. Ltda
Alameda Rio Negro, 500, 15º andar, Torre B Alphaville Industrial
CEP 06.454-00 Barueri, São Paulo, Brasil
CNPJ: 42.160.812/0001-44 Telefone: 0800-771-8818

ООО «Бекмен Культер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com



Beckman Coulter, Inc., 250 S. Kraemer Blvd., Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckmancoulter.com